



Alice Cristina Gomes Ribeiro
Desenvolvimento de métodos para a
determinação da atividade antivírica em diferentes suportes

UMinho | 2013



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Alice Cristina Gomes Ribeiro

Desenvolvimento de métodos para a
determinação da atividade antivírica em
diferentes suportes

novembro de 2013



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Alice Cristina Gomes Ribeiro

Desenvolvimento de métodos para a
determinação da atividade antivírica em
diferentes suportes

Tese de Mestrado
Ciclo de Estudos Integrados Conducentes ao
Grau de Mestre em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação de
Doutora Carla Joana dos Santos Marinho da Silva
(CeNTI)
Professora Doutora Lúgia Raquel Marona Rodrigues
(UM)

DECLARAÇÃO

Nome:

Alice Cristina Gomes Ribeiro

Endereço electrónico: alice.ribeiro1990@gmail.com

Telefone: 924300907

Número do Cartão do Cidadão: 13777252

Título da dissertação:

Desenvolvimento de métodos para a determinação da atividade antivírica de diferentes suportes utilizando bacteriófagos

Orientadoras:

Doutora Carla Joana dos Santos Marinho da Silva (CeNTI)

Professora Doutora Lúcia Raquel Marona Rodrigues (UM)

Ano de conclusão: 2013

Designação do Mestrado: Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

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

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Muitas foram as pessoas e instituições que contribuíram para realização da Tese de Mestrado, mas gostaria de deixar uma palavra especial de agradecimento:

Ao CeNTI, pela oportunidade de realizar um este projeto num ambiente empresarial e pelas condições disponibilizadas.

À Doutora Carla Silva, minha orientadora, pela confiança depositada, pelas sugestões e conhecimentos transmitidos e pela orientação e apoio que sempre me dedicou, tornando possível a realização deste projeto.

À Professora Doutora Lúcia Rodrigues, minha co-orientadora, pela orientação e dedicação manifestadas, pela disponibilidade permanente e pelas sugestões dadas ao longo da realização da Tese.

À Andreia, ao Ricardo e ao Franklin, por toda a ajuda e apoio dado no trabalho experimental, sobretudo nos momentos mais complicados, e pela disponibilidade sempre demonstrada durante a execução do trabalho.

À Plataforma de Biologia Molecular e Sintética do Departamento de Engenharia Biológica, em especial à Tânia e à Rita, pelo apoio manifestado e pela ajuda imprescindível para a conclusão do trabalho prático.

Ao Laboratório de Bioprocessos do Departamento de Engenharia Biológica, em particular à Adelaide e à Patrícia, pela motivação e ajuda oferecida em todos os momentos.

Aos meus amigos pela ajuda e apoio sempre demonstrados, especialmente nos momentos mais difíceis e aos meus colegas estagiários pela boa disposição demonstrada ao longo do estágio no CeNTI.

E por fim às pessoas mais importantes da minha vida, aos meus Pais e ao meu irmão, pela possibilidade de concluir mais uma etapa no meu percurso académico e pela motivação permanentemente manifestada, e ao meu namorado pela enorme compreensão e paciência reveladas em todos os momentos e pelo imenso apoio dado nas situações mais complicadas.

Resumo

Desenvolvimento de métodos para a determinação da atividade antivírica em diferentes suportes

Recentemente, vários grupos de investigação têm vindo a desenvolver estratégias de funcionalização de superfícies sólidas para que estas exibam características antivíricas, para além das antimicrobianas, face à capacidade dos vírus se aderirem às mesmas. Contudo, a principal dificuldade está relacionada com a limitação dos métodos existentes para determinar a sua eficácia, ou seja, a sua atividade antivírica. O objetivo fundamental do presente projeto consistiu no desenvolvimento de um método para determinar a atividade antivírica de substratos sólidos e foi proposto pelo Centro de Nanotecnologia e Materiais Técnicos, Funcionais e Inteligentes (CeNTI). Numa primeira fase, funcionalizou-se um substrato sólido rígido (aglomerado revestido com papéis melamínicos) com diferentes concentrações de agentes antivíricos comerciais, nomeadamente um zeólito de prata X (agente X), um composto orgânico Y (agente Y), e um substrato flexível (tecido de algodão) com uma proteína Z de origem natural (agente Z). Após a funcionalização, as superfícies sólidas foram caracterizadas física e quimicamente através das técnicas qualitativas de Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier com Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR), Espectroscopia de Fotoelectrões de Raios- X (XPS) e Microscopia Eletrónica de Varrimento com Espectrometria de Dispersão de Energia (SEM-EDS). Os resultados indicaram a presença dos agentes X e Y nos laminados, porém não foi possível detetar a presença da proteína Z no tecido têxtil. Numa fase posterior, desenvolveu-se um método para a determinação da atividade antivírica dos agentes na sua forma livre e adsorvidos aos substratos sólidos, utilizando para o efeito o bacteriófago MS2 de *Enterobacteria* (MS2). Os resultados demonstraram que, na sua forma livre, os agentes possuem uma atividade antivírica ligeira, a partir das 6 h de ensaio. Verificou-se igualmente que o agente Y foi o que demonstrou a maior atividade contra o fago MS2 ao final de 24 h. Nos ensaios com os substratos sólidos, os laminados com os agentes X e Y e o tecido têxtil com o agente Z revelaram não ter qualquer atividade antivírica contra o bacteriófago MS2. Porém, nos ensaios observaram-se desvios elevados, pelo que os resultados foram pouco conclusivos e requerem confirmação com mais ensaios laboratoriais. Conclui-se que o método desenvolvido neste trabalho, apesar de preliminar e de necessitar de alguns ajustes, pode ser importante para o desenvolvimento futuro de superfícies sólidas antivíricas.

Abstract

Development of methods to determine the antiviral activity in several substrates

Recently, several research groups have developed strategies for the functionalization of surfaces so that they can exhibit antiviral characteristics, in addition to the antimicrobial ones. However, the main difficulty associated with the development of these surfaces is related to the limitation of existing methods to determine their antiviral activity. This project aimed to develop a method to determine the antiviral activity of functionalized solid substrates and was proposed by the Center for Nanotechnology and Smart Materials (CeNTI). Initially, a rigid substrate (agglomerate coated with melamine paper) was functionalized with different concentrations of commercial antiviral agents, particularly a silver zeolite X (agent X) and an organic compound Y (agent Y), and a flexible substrate (cotton fabric) with a protein Z of natural origin (agent Z). After functionalization, the solid surfaces were characterized physically and chemically through qualitative techniques that included Fourier Transform Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflectance (FTIR-ATR), X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) and Scanning Electron Microscopy with Energy Dispersion Spectrometry (SEM-EDS). The results indicated the presence of agent X and Y in the laminates, but it was not possible to detect the presence of the protein in the textile. A method was later developed to determine the activity of the antiviral agents in their free form, as well as adsorbed to the solid substrates, using for this purpose the *Enterobacteria* phage MS2 (MS2). The results showed that the agents, in their free form, have a slight antiviral activity after 6 h. It was also found that agent Z showed the greatest activity against phage MS2 after 24 h. In the tests with solid substrates, laminates with agents X and Y and textile with agent Z revealed no antiviral activity against the bacteriophage MS2. However, in these assays, high deviations were observed, indicating that the results were not conclusive and require confirmation with more laboratory tests. In conclusion, the method developed in this project, although preliminary and requiring some adjustments, may be important for the future development of antiviral solid surfaces.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Índice.....	ix
Índice de tabelas.....	xiii
Índice de figuras	xv
Lista de abreviaturas e siglas	xvii
Lista de variáveis	xix
1. Enquadramento.....	1
1.1 Contexto e motivação	1
1.2 Objetivos da tese	2
1.3 Organização da tese.....	2
2. Estado de arte	3
2.1 Aplicações dos substratos sólidos antimicrobianos e antivíricos	3
2.1.1 Aplicações dos substratos sólidos flexíveis com propriedades antimicrobiana e antivírica.....	3
2.1.2 Aplicações dos substratos sólidos rígidos com propriedades antimicrobiana e antivírica.....	4
2.2 Técnicas de funcionalização dos substratos sólidos e agentes antivíricos.....	5
2.2.1 Técnicas de funcionalização dos substratos sólidos	5
2.2.1.1 Métodos químicos	5
2.2.1.2 Métodos físicos.....	6
2.2.2 Agentes antibacterianos e antivíricos	6
2.2.2.1 Metais	6
2.2.2.2 Óleos essenciais	10
2.2.2.3 Lactoferrina.....	11

2.3	Técnicas de caracterização dos substratos sólidos funcionalizados	13
2.3.1	Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier com Refletância Total Atenuada	13
2.3.2	Análise Termogravimétrica.....	14
2.3.3	Microscopia Eletrónica de Varrimento com Espectrometria de Dispersão de Energia	14
2.3.4	Espectroscopia de Fotoelectrões de raios- X.....	14
2.3.5	Calorimetria Exploratória Diferencial.....	15
2.4	Métodos de determinação da atividade antivírica	15
2.4.1	Fago MS2 de <i>Enterobacteria</i>	15
2.4.2	Métodos expeditos para a determinação da atividade antivírica de agentes presentes em meio líquido	17
2.4.2.1	PCR	17
2.4.2.2	ELISA.....	18
2.4.2.3	Biossensores	20
2.4.2.4	Citometria de fluxo.....	20
2.4.3	Métodos de determinação da atividade antivírica de substratos sólidos	21
2.4.3.1	Método de contagem em placa com diluições sucessivas.....	22
3.	Materiais e métodos	25
3.1	Funcionalização dos substratos sólidos.....	25
3.1.1	Funcionalização do substrato sólido rígido	25
3.1.2	Funcionalização do substrato sólido flexível.....	26
3.1.2.1	Testes de formação de um complexo entre o agente Z e a β -ciclodextrina	26
3.1.2.2	Técnica de funcionalização do substrato sólido flexível.....	28
3.2	Caracterização dos substratos sólidos funcionalizados	28
3.2.1	FTIR- ATR.....	28
3.2.2	XPS	29
3.2.3	SEM-EDS.....	29

3.3	Determinação da atividade antivírica	30
3.3.1	Preparação do vírus e do hospedeiro	30
3.3.1.1	Ativação e propagação da bactéria E. coli W1485.....	30
3.3.1.2	Ativação e propagação do fago MS2.....	30
3.3.1.3	Produção do fago MS2.....	31
3.3.1.4	Determinação da concentração do fago.....	32
3.3.1.5	Concentração do fago MS2 com PEG.....	32
3.3.2	Determinação da atividade antivírica dos agentes em meio líquido	33
3.3.3	Determinação da atividade antivírica dos substratos sólidos.....	34
4.	Resultados e discussão	35
4.1	Resultados dos testes de formação de complexo entre a proteína Z e a β -ciclodextrina	35
4.2	Resultados da caracterização dos substratos sólidos funcionalizados.....	37
4.2.1	FTIR – ATR.....	38
4.2.1.1	Substrato sólido rígido funcionalizado	38
4.2.1.2	Substrato sólido flexível funcionalizado	42
4.2.2	XPS.....	43
4.2.2.1	Substrato sólido rígido funcionalizado	43
4.2.3	SEM- EDS.....	44
4.2.3.1	Substrato sólido rígido funcionalizado	44
4.2.3.2	Substrato sólido flexível funcionalizado	48
4.3	Resultados da determinação da atividade antivírica	49
4.3.1	Atividade antivírica dos agentes em meio líquido.....	49
4.3.2	Atividade antivírica dos substratos sólidos funcionalizados	56
4.3.2.1	Substrato sólido rígido funcionalizado	56
4.3.2.2	Substrato sólido flexível funcionalizado	58
5.	Conclusões.....	59
6.	Recomendações.....	61

Referências bibliográficas	63
Anexos	69
Anexo A: Curvas de calibração da proteína Z	69
A.1- Curva de calibração da proteína Z em meio aquoso.....	69
A.2- Curva de calibração do agente Z em meio tamponado.....	69
Anexo B: Cálculos efetuados na funcionalização do tecido de algodão com o agente Z	71
B.1- Cálculos do teste <i>Job plot</i>	71
B.2- Cálculos do segundo teste de averiguação da formação de um complexo de inclusão.....	74
B.3- Percentagem de agente Z funcionalizada no tecido de algodão	75
Anexo C: Composição das soluções e meios de cultura utilizados nos ensaios da determinação da atividade antivírica	77
Anexo D: Cálculos efetuados na determinação da atividade antivírica	78
D.1- Volume de agente adicionado a cada solução	78
D.2- Contagem de UFP	80

Índice de tabelas

Tabela 2.1- Vantagens e desvantagens do uso de metais como agentes antivíricos ...	10
Tabela 2.2- Vantagens e inconvenientes do uso de óleos essenciais como agentes antivíricos	11
Tabela 2.3- Vantagens e desvantagens da utilização da lactoferrina como agente antivírico.....	13
Tabela 2.4- Vantagens e inconvenientes da PCR.....	18
Tabela 2.5- Vantagens e limitações da técnica ELISA.....	19
Tabela 2.6- Vantagens e inconvenientes do uso de biossensores para a deteção de vírus	20
Tabela 2.7- Vantagens e desvantagens da técnica de citometria de fluxo.....	21
Tabela 2.8- Critério de avaliação da atividade antivírica de acordo com a metodologia descrita por Hohenstein Institute	23
Tabela 2.9- Vantagens e desvantagens do método de contagem em placa com diluições sucessivas	23
Tabela 3.1- Composição do banho de funcionalização para cada amostra.....	26
Tabela 3.2- Frações molares e concentrações do agente Z e da β -ciclodextrina em cada uma das soluções utilizadas para a construção do <i>Job plot</i>	27
Tabela 3.3- Concentrações do agente Z e da β -ciclodextrina, em cada solução, no segundo teste de averiguação da formação de um complexo entre as duas moléculas	28
Tabela 4.1- Absorvâncias obtidas, a 295 nm, para cada solução do segundo teste de formação de complexo entre o agente Z e a β -ciclodextrina	37
Tabela 4.2- Percentagens atómicas relativas dos elementos presentes nos substratos sólidos rígidos obtidas por XPS	44
Tabela 4.3- Atividade antivírica dos agentes em meio líquido após 24 h de teste	55
Tabela 4.4- Atividade antivírica, após 24 h, do laminado controlo e dos laminados funcionalizados com os agentes X e Y	56

Índice de figuras

Figura 2.1- Esquema ilustrativo da possível ação antivírica de nanopartículas metálicas (retirado de (Galdiero, <i>et al.</i> 2011))	7
Figura 2.2- Redução de partículas virais nos materiais tratados e não tratados (PC: policarbonato, laminate: placa de madeira laminada e ABS: acrilonitrila-butadieno-estireno) e na amostra de vírus não exposta a nenhum material (retirado de [3])	8
Figura 2.3- Estrutura molecular da lactoferrina de origem bovina (retirado de [4])	11
Figura 2.4- Representação de diferentes modos de ação antivírica da lactoferrina: prevenção da infeção viral por ligação direta às partículas virais (A) ou por competição com o vírus para os recetores/co-recetores comuns na superfície das células alvo (B e C) e uma atividade intracelular da lactoferrina (D) (retirado de (Florian, <i>et al.</i> 2009)) .	12
Figura 2.5- Proteína de revestimento do fago MS2 (retirado de [5])	16
Figura 2.6- Ciclo viral do fago MS2 (adaptado de (Prescott, Harley e Klein 1999))	17
Figura 2.7- Esquema do método Imunoenzimático Sanduíche (adaptado de (Casseb 2010))	19
Figura 3.1- Imagem ilustrativa da produção do fago MS2	31
Figura 3.2- Ensaio experimental para a determinação da atividade antivírica dos substratos sólidos	34
Figura 4.1- Variação do deslocamento químico dos hidrogénios H5 da β - ciclodextrina em diferentes frações molares do complexo (“ <i>Job Plot</i> ”), 25 °C, pH 5,5 (retirado de (Fraceto, <i>et al.</i> 2007))	35
Figura 4.2- <i>Job plot</i> do complexo agente Z: β - ciclodextrina	36
Figura 4.3- Espetros de FTIR- ATR da folha W funcionalizada com 17,0% de agente Y	38
Figura 4.4- Espetros de FTIR- ATR do laminado funcionalizado com 17,0% de agente Y	39
Figura 4.5- Espetros de FTIR- ATR da folha W funcionalizada com 5,0% de agente Y	40
Figura 4.6- Espetros de FTIR- ATR do laminado funcionalizado com 5,0% de agente Y	41
Figura 4.7- Espetros de FTIR- ATR da folha W funcionalizada com 1,0% de agente Y	41
Figura 4.8- Espetros de FTIR- ATR do laminado funcionalizado com 1,0% de agente Y	42

Figura 4.9- Espectros de FTIR- ATR do tecido de algodão com 0,1% de agente Z	43
Figura 4.10- Micrografias obtidas por SEM do laminado controlo (A), do laminado com 1,0% de agente X (B) do laminado com 17,0% de agente X (C), do laminado com 1,0% de agente Y (D) e do laminado com 17,0% de agente Y (E)	45
Figura 4.11- Espectros obtidos por EDS do laminado controlo (A), do laminado com 1,0% de agente X (B) do laminado com 17,0% agente X (C), do laminado com 1,0% de agente Y (D) e do laminado com 17,0% agente Y (E).....	47
Figura 4.12- Micrografias obtidas por SEM do substrato têxtil controlo (F) e do substrato têxtil funcionalizado com 0,1% de agente Z (G)	48
Figura 4.13- Espectros obtidos por EDS do substrato têxtil controlo (F) e do substrato têxtil funcionalizado com 0,1% de agente Z (G)	49
Figura 4.14- Atividade antivírica ao longo do tempo das amostras com diferentes concentrações de agente X.....	50
Figura 4.15- Esquema alusivo à troca de iões positivos entre o agente e o meio onde está presente o bacteriófago MS2	51
Figura 4.16- Atividade antivírica ao longo do tempo das amostras com diferentes concentrações de agente Y.....	52
Figura 4.17- Atividade antivírica ao longo do tempo das amostras com diferentes concentrações de agente Z.....	53
Figura 4.18- Ligação do agente Z às proteínas do envelope do vírus (retirado de (Sun e Jenssen 2012))	54

Lista de abreviaturas e siglas

CeNTI	Centro de Nanotecnologia e Materiais Técnicos, Funcionais e Inteligentes
Agente X	Zeólito de prata X
Agente Y	Composto orgânico Y
Agente Z	Proteína Z de origem natural
FTIR-ATR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier com Refletância Total Atenuada
XPS	Espectroscopia de Fotoelétrons de Raios-X
SEM-EDS	Microscopia Eletrónica de Varrimento com Espectrometria de Dispersão de Energia
MS2	Bacteriófago MS2 de <i>Enterobacteria</i>
HSV-1	Vírus Herpes Simplex tipo 1
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
H1N1	Vírus Influenza A subtipo H1N1
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1
IBV	Vírus da Bronquite Infecciosa
TGA	Análise Termogravimétrica
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
HCV	Vírus da Hepatite C
HBV	Vírus da Hepatite B
UFP	Unidades formadoras de placas
UV-Vis	Espectrofotómetro UV- Visível
CEMUP	Centro de Materiais da Universidade do Porto
PEG	Polietilenoglicol
LB	Luria-Bertani
ICP-MS	Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma Indutivo

Lista de variáveis

R_s	Atividade antivírica específica da amostra funcionalizada
A	Número médio de partículas virais ativas (UFP) imediatamente após a inoculação, na amostra controlo
B	Número médio de partículas virais ativas (UFP) após 18 h de incubação, na amostra controlo
C	Número médio de partículas virais ativas (UFP) após 18 h de incubação, na amostra funcionalizada
R_{sc}	Atividade antivírica específica após 18 h de incubação da amostra controlo
C_f	Concentração de bacteriófago
UFP_p	Número de UFP contadas na placa
F	Fator de diluição
V_f	Volume de fago plaqueado
m_L	Massa do agente Z na solução
C_{L0}	Concentração inicial do agente Z na solução
V_t	Volume total da solução
N_t	Número de moles (total) fixo em cada solução
M_L	Massa molar do agente Z
F_L	Fração arbitrada do agente Z na solução
N_L	Número de moles do agente Z presente na solução
C_L	Concentração do agente Z nas soluções, à exceção da solução 1
V_L	Volume do agente Z adicionado em cada solução
C_{ML}	Concentração do agente Z na solução mãe
N_C	Número de moles de β- ciclodextrina presente na solução
A_c	Peso por área do têxtil controlo
P_{Cf}	Média do peso final do tecido de algodão controlo
A_{ac}	Área do tecido de algodão controlo
A_L	Peso por área do têxtil funcionalizado
P_{Lf}	Média do peso final do tecido de algodão funcionalizado
A_{aL}	Área do tecido de algodão funcionalizado
C_{LS}	Concentração do agente Z na solução em que foi mergulhado o tecido de algodão
P_{Lf}	Média do peso final do tecido de algodão funcionalizado com o agente Z
m_a	Massa de agente presente na solução

G	Gramagem da resina
A_q	Área do laminado utilizada no ensaio
N_a	Número de moles de agente presente na solução
M_a	Massa molar de agente
C_a	Concentração de agente presente na solução
V_m	Volume total do meio onde decorre o ensaio
V_a	Volume de agente a adicionar a cada solução

1. Enquadramento

1.1 Contexto e motivação

O tema deste trabalho de dissertação foi proposto pelo CeNTI, uma empresa situada em Famalicão e que iniciou o seu percurso em 2008. Este centro de investigação tem como principal objetivo o desenvolvimento de materiais e processos inovadores, que vão desde as fibras com vários componentes, aos materiais e dispositivos inteligentes, aos sistemas incorporados e aos revestimentos multifuncionais [1].

Para este projeto destacam-se os materiais funcionais, que são aqueles que servem para executar uma ou várias funções, ou seja, que apresentam uma ou várias características com aplicações tecnológicas importantes, sobretudo, no dia-a-dia das pessoas. Alguns exemplos são o desenvolvimento de têxteis funcionais e a modificação física e química de superfícies, através da manipulação das propriedades dos materiais (Soutinho 2006).

Em relação aos materiais funcionais que atuam contra patogénicos, sejam eles bactérias, fungos ou vírus, causadores de várias doenças, podem-se destacar os antibacterianos, uma vez que são os que se encontram mais desenvolvidos. Estes organismos crescem em diversos tipos de superfícies essencialmente devido à sua capacidade de retenção de humidade (Lim e Hudson 2004). Desta forma, vários materiais têm vindo a ser modificados pela introdução de grupos funcionais antibacterianos de modo a que possam inibir a adesão bacteriana e/ou exibam atividade antibacteriana (Kandelbauer e Widsten 2009).

No entanto, os vírus representam um problema crescente de saúde pública, uma vez que, apesar de não se poderem reproduzir fora das células hospedeiras, podem ser transmitidos através de vários tipos de superfícies e podem sobreviver nelas durante algumas horas (Rossi, Devienne e Raddi 2008) (Bean, *et al.* 1982). Neste sentido, com o intuito de diminuir o contágio de doenças infecciosas causadas pela adesão das partículas virais aos vários tipos de superfícies, diversos grupos de investigação têm vindo a desenvolver substratos funcionais com recurso a agentes que tenham características antimicrobianas e antivíricas. No presente projeto serão apenas abordadas as superfícies sólidas, flexíveis e não flexíveis, uma vez que atualmente são as únicas do interesse do CeNTI.

1.2 Objetivos da tese

O objetivo global deste trabalho consistiu no desenvolvimento de substratos sólidos funcionalizados com capacidade antivírica. O mesmo encontrou-se organizado em quatro etapas que cobriram os seguintes objetivos específicos: funcionalização de substratos sólidos rígidos e flexíveis com concentrações diferentes de três agentes antivíricos; caracterização físico-química das superfícies sólidas funcionalizadas; desenvolvimento de um método para a determinação das atividades antivíricas dos agentes na sua forma livre e dos substratos sólidos com recurso a um bacteriófago; cálculo das atividades antivíricas dos agentes presentes em meio líquido e das superfícies sólidas funcionalizadas e comparação das mesmas entre si.

1.3 Organização da tese

A tese está organizada em seis capítulos onde se descreve o trabalho realizado. A motivação e os objetivos da tese são introduzidos no presente capítulo.

No capítulo 2 apresenta-se uma introdução ao trabalho, no qual são abordadas as principais aplicações dos substratos sólidos com propriedades antivíricas, algumas técnicas habituais de funcionalização e caracterização dos materiais sólidos, fazendo também uma referência a agentes antimicrobianos e antivíricos bastante usados nesta área. São também abordados alguns métodos para a determinação da atividade antivírica de agentes presentes em meio líquido e de substratos sólidos funcionalizados.

No capítulo 3 são apresentados os materiais e procedimentos laboratoriais utilizados na funcionalização das superfícies rígidas e flexíveis, na caracterização físico-química das mesmas e na determinação da atividade antivírica dos agentes na sua forma livre e dos substratos sólidos funcionalizados.

No capítulo 4 são demonstrados os resultados obtidos da funcionalização e caracterização dos substratos sólidos e da determinação da atividade antivírica dos mesmos e dos agentes na sua forma livre. A discussão dos resultados também se encontra neste capítulo.

No capítulo 5 são apresentadas as considerações finais do trabalho e no capítulo 6 são descritas algumas recomendações para trabalhos futuros.

2. Estado de arte

2.1 Aplicações dos substratos sólidos antimicrobianos e antivíricos

Os substratos sólidos com propriedades antimicrobianas e antivíricas possuem várias aplicações importantes para o dia-a-dia do homem, que são discutidas neste subcapítulo.

2.1.1 Aplicações dos substratos sólidos flexíveis com propriedades antimicrobiana e antivírica

Como já foi referido anteriormente, os vírus podem ser transmitidos através de vários tipos de superfícies, nomeadamente substratos sólidos flexíveis. Um exemplo é o Vírus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1), responsável pelo herpes labial, que se adere fortemente às fibras têxteis, tal como refere um estudo feito pelo Hohenstein Institute na Alemanha [2]. Os resultados destes investigadores demonstraram que o vírus estava presente nas amostras têxteis após 48 h do início da experiência, à temperatura ambiente, e que o seu DNA poderia ser encontrado nas amostras depois destas serem lavadas numa máquina de lavar doméstica convencional a 40° C [2].

Existe portanto uma necessidade de desenvolver superfícies sólidas flexíveis funcionalizadas que exibam características antivíricas, em adição às propriedades antimicrobianas, de modo a diminuir a transmissão de doenças infecciosas, para além do contágio através do ar contaminado e do contacto direto entre as pessoas.

As superfícies sólidas flexíveis em que se tem estudado mais frequentemente a funcionalização são as fibras têxteis, uma vez que têm aplicações importantes no vestuário usado em locais de cuidados de saúde (batas, roupa de cama, entre outros). Nestes ambientes existe uma circulação ativa de pessoas e surge constantemente um elevado número de patogénicos, sejam eles bactérias, fungos ou vírus. Além disso, estes locais são a principal fonte e origem destes contaminantes e muitos deles são persistentes, o que leva à necessidade de desenvolvimento de novas estratégias para combater a transmissão e a resistência dos mesmos (Bozja, *et al.* 2003).

Outra aplicação possível das fibras têxteis com atividade antivírica é na roupa de lazer, uma vez que no dia-a-dia e em diversos locais existe o contacto entre pessoas, que pode levar à transmissão de vírus através das roupas. Adicionalmente,

estas fibras funcionais podem ser úteis na produção de pensos curativos, por exemplo para o tratamento de queimaduras.

No entanto, esta funcionalização de substratos sólidos flexíveis com atividade antivirica, sobretudo de têxteis, está ainda pouco desenvolvida, contrariamente aos têxteis antimicrobianos, tal como se referiu anteriormente. É de notar que alguns destes têxteis funcionais já demonstraram proteção contra alergias, doenças infecciosas causadas por bactérias, odor, coloração e deterioração (Shin, Yoo e Jang 2001).

2.1.2 Aplicações dos substratos sólidos rígidos com propriedades antimicrobiana e antivírica

Os substratos sólidos não flexíveis também podem ser um meio para a propagação de vírus, tal como é mencionado no estudo realizado pelo Hohenstein Institute, onde se verificou que o vírus HSV-1 aderiu facilmente a superfícies duras e permaneceu nelas após 8 semanas [2]. Assim, torna-se igualmente essencial desenvolver superfícies sólidas rígidas que atuem contra microrganismos patogénicos e vírus.

Uma das principais aplicações das superfícies duras é também na área biomédica, uma vez que, tal como foi referido no subcapítulo anterior, os locais de cuidados de saúde são propícios à transmissão de vírus e à proliferação de bactérias e onde os níveis de esterilidade requeridos para os materiais são bastante elevados.

Outras aplicações destes materiais antivíricos incluem o seu uso em cozinhas ou na indústria alimentar. As várias superfícies de trabalho (ou não) destes locais possuem padrões de higiene bastante rigorosos e por vezes as práticas habituais de limpeza, usando detergentes e desinfetantes, não são suficientes para eliminar de uma forma adequada os contaminantes, tais como bactérias do género *Salmonella* e *Escherichia coli* (*E. coli*), e vírus como o norovírus. Além disso, os vírus causadores de doenças infecciosas do trato gastrointestinal podem ser facilmente transmitidos das instalações sanitárias para ambientes de cozinha ou restantes locais dos centros de cuidados de saúde, através de artigos de limpeza e das mãos das pessoas (Kandelbauer e Widsten 2009).

Deste modo, vários materiais podem ser funcionalizados para possuírem propriedades contra determinados microrganismos patogénicos e vírus, de forma a controlar melhor a transmissão e propagação dos mesmos. Alguns exemplos de potenciais aplicações de materiais funcionalizados, por exemplo cerâmicos, madeira,

cortiça, entre outros, incluem vários utensílios de cozinha, como tábuas, colheres e recipientes; artigos de decoração, como armários, mesas e cadeiras; pisos e revestimentos; louça sanitária, entre outros.

2.2 Técnicas de funcionalização dos substratos sólidos e agentes antivíricos

Existem várias técnicas que permitem a incorporação de agentes com capacidade antivírica nos substratos sólidos, porém a sua escolha encontra-se dependente do tipo de produto final pretendido, tal como a seleção dos próprios agentes.

2.2.1 Técnicas de funcionalização dos substratos sólidos

2.2.1.1 Métodos químicos

Nos métodos químicos destacam-se os que possibilitam a formação de ligações covalentes entre o composto antivírico e a superfície sólida, com recurso ou não a agentes de ligação cruzada (*crosslinking*). As ligações estabelecidas por estes métodos são fortes, estáveis e duradouras. Existem também processos que recorrem a um agente *crosslinking* presente numa resina, i.e. ao impregnar-se o substrato sólido nesta última, formar-se-á uma ligação cruzada entre o composto com atividade antivírica e o agente ligante e entre este e as moléculas da superfície sólida, produzindo-se no final uma rede polimérica. Apesar deste tipo de ligações resistir a possíveis processos de abrasão, deformidade e fraturas, estas não são tão fortes quanto as covalentes (Vieira 2006). Nos métodos químicos para a funcionalização de têxteis, pode-se ainda incluir moléculas adicionais, que permitam a libertação controlada e duradoura do agente antivírico, como por exemplo ciclodextrinas. O agente antivírico é encapsulado por estas moléculas, que por sua vez se ligam a um agente *crosslinking* que está ligado ao substrato têxtil. As ciclodextrinas são hidratos de carbono cíclicos de origem natural que têm vindo a ser cada vez mais usadas neste tipo de estratégias, sobretudo na indústria têxtil, por possuírem uma estrutura tridimensional com uma cavidade hidrofóbica e um exterior hidrofílico. É esta diferença de polaridades que permite a formação de complexos de inclusão solúveis em água com uma grande variedade de moléculas, alterando assim as propriedades físico-

químicas dos agentes encapsulados, devido à formação de complexos de inclusão (Andreaus, *et al.* 2010).

2.2.1.2 Métodos físicos

Nos métodos físicos pode-se realçar a tecnologia de plasma, mais direcionada para a produção de superfícies funcionais biomédicas; e a adsorção física, usada sobretudo para produtos com tempo de vida útil reduzido, tais como pensos curativos. No primeiro exemplo ocorre uma interação entre a superfície a analisar e o plasma, alterando-se a energia da primeira e tornando-a mais hidrofílica, ou seja cria-se um filme fino funcional na superfície. Por sua vez, na adsorção física ocorre uma atração entre o substrato sólido (adsorvente) e as partículas líquidas ou gasosas constituídas pelo agente antivírico (adsorvato), ficando estas últimas retidas devido a interações moleculares, como por exemplo por forças de *Van der Waals*. Contudo, os métodos físicos apresentam algumas limitações, como o facto de estas interações serem fracas, temporárias e reversíveis, tornando portanto o processo ineficaz após algum tempo (Chu, *et al.* 2002).

2.2.2 Agentes antibacterianos e antivíricos

Em relação aos agentes com capacidade antimicrobiana e antivírica podem destacar-se alguns como os metais, os óleos essenciais e a lactoferrina.

2.2.2.1 Metais

Os metais como a prata, o cobre e o zinco são os mais utilizados no desenvolvimento de substratos sólidos antimicrobianos, mas também no estudo das suas capacidades contra alguns vírus, como o H1N1, o HSV-1 e o Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1). No geral, como se tratam de agentes bacteriostáticos e/ou bactericidas, eles atuam contra a bactéria hospedeira do vírus, destruindo em simultâneo os dois, uma vez que os vírus não se replicam sem as células. Contudo, alguns estudos relatam a hipótese de alguns agentes metálicos atuarem apenas contra o vírus, impedindo a adsorção à superfície da célula, através, por exemplo, da sua ligação a glicoproteínas do envelope de vírus que o possuem, como se pode observar pela figura 2.1 (Galdiero, *et al.* 2011).

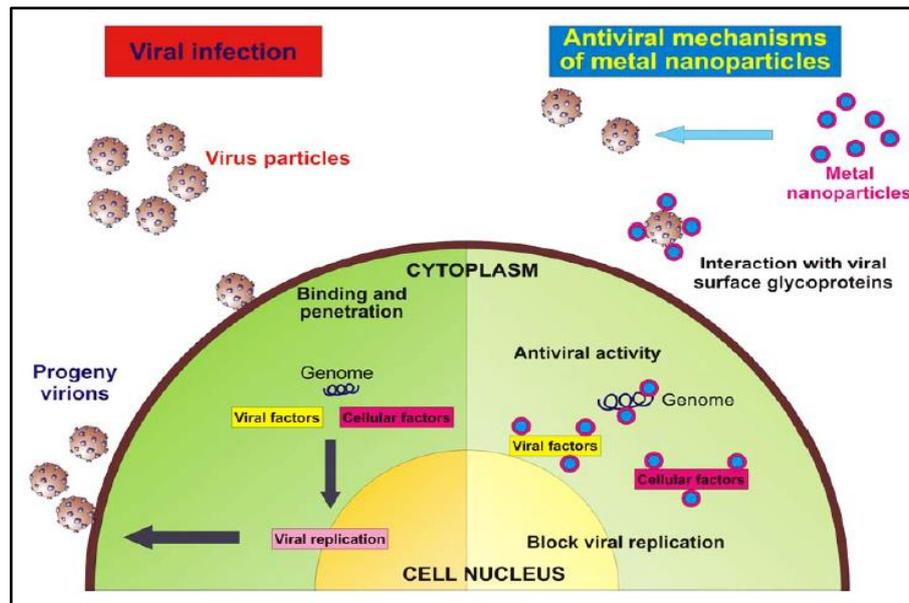


Figura 2.1- Esquema ilustrativo da possível ação antivírica de nanopartículas metálicas (retirado de (Galdiero, *et al.* 2011))

A utilização da prata como agente antimicrobiano é bastante comum, remontando a mais de um século na medicina. A prata atua contra vários microrganismos, nomeadamente bactérias resistentes como a *E. coli*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. Recentemente, tem sido bastante usada a tecnologia de nanopartículas de prata com o mesmo objetivo. Estas nanopartículas podem ser produzidas usando diversos métodos que se encontram descritos na literatura. Os mecanismos que estão por detrás da atividade destas pequenas partículas contra as bactérias têm sido bastante estudados, embora este conhecimento esteja ainda pouco consolidado, existindo mesmo várias explicações para essa atividade. Uma explicação assenta no facto do ião Ag^+ interagir com o fósforo presente no DNA e poder impedir a sua duplicação. Outra hipótese refere que este catião pode reagir com o enxofre existente em várias proteínas essenciais e assim inativar as funções enzimáticas associadas, ou então com o enxofre das proteínas da membrana da célula, conduzindo a uma maior permeabilidade da mesma e levando portanto à morte da bactéria (Ravishankar e Jamuna 2011).

Vários estudos *in vitro* sobre a potencial capacidade antivírica da prata ou partículas de prata têm sido reportados. Um estudo refere que as nanopartículas de prata podem atuar contra o vírus HIV-1, impedindo a infeção por ligação do metal com a subunidade gp120 da glicoproteína do envelope do vírus, que neste caso já não efetua a ligação do mesmo à superfície do hospedeiro (Elechiguerra, *et al.* 2005; Lara, *et al.* 2010). Outra explicação muito comum para a atividade dos metais, pode ser a

troca de íons entre o agente antivírico e a cápside do vírus, levando à danificação desta última e conseqüentemente à diminuição da capacidade de infecção pelo vírus das células (Matsuura, *et al.* 1997). Um outro mecanismo de ação poderá ser a interação direta da prata com o material genético do vírus (Lu, *et al.* 2008).

Relativamente à atividade antivírica de nanopartículas de prata presentes em substratos sólidos, os estudos existentes são mais escassos podendo contudo destacar-se um realizado pela empresa BioCote no Reino Unido. Neste estudo, uma tecnologia de íons de prata foi incorporada em alguns materiais para verificar se ocorria uma redução do número de infecções causadas pelo vírus H1N1 nessas mesmas superfícies. Os resultados obtidos demonstraram que os materiais tratados com essa tecnologia apresentavam uma quantidade final de vírus muito inferior à observada nos materiais não tratados (Figura 2.2) [3].

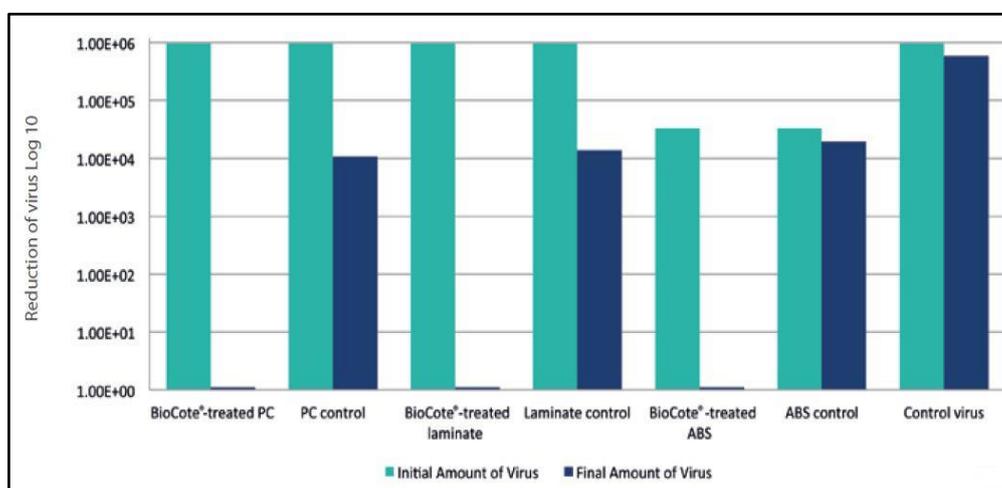


Figura 2.2- Redução de partículas virais nos materiais tratados e não tratados (PC: policarbonato, laminate: placa de madeira laminada e ABS: acrilonitrila-butadieno-estireno) e na amostra de vírus não exposta a nenhum material (retirado de [3])

Por sua vez, o cobre também tem sido bastante estudado nos últimos anos, revelando resultados muito promissores no que respeita às suas propriedades antimicrobianas, sobretudo contra bactérias causadoras de infecções hospitalares. Este metal também tem apresentado alguns resultados interessantes no que respeita às suas potenciais propriedades antivíricas. O cobre apresenta várias vantagens quando comparado com a prata, nomeadamente é mais barato, promove melhores misturas e permite a produção de superfícies funcionalizadas estáveis, quer por métodos físicos, quer por métodos químicos. No entanto, alguns ensaios experimentais demonstraram que este metal apresenta uma eficiência bactericida superior se combinado com a

prata, ou seja há uma sinergia entre os dois metais. O mecanismo exato que explica o efeito inibitório do óxido de cobre não é claro, mas no geral poderá ter a ver com a interrupção dos processos bioquímicos nas células bacterianas ou com os danos causados na membrana celular (Ravishankar e Jamuna 2011; Borkow e Gabbay 2005).

Relativamente à sua capacidade antivírica, existem estudos que demonstram que o cobre possui atividade contra alguns vírus. Um deles foi realizado por Yamamoto e os seus colegas (1964), no qual os autores demonstraram que o cobre inativava alguns bacteriófagos. Outro estudo realizado por Jordan e Nassar (1971) mostrou que o mesmo metal inativava também o Vírus da Bronquite Infecciosa. A sua forma de atuar contra as partículas virais é semelhante à da prata (Borkow e Gabbay 2005).

Não existe qualquer informação na literatura sobre o uso de cobre como agente antivírico em substratos sólidos.

Outro metal muito utilizado neste tipo de aplicações é o zinco, sob a forma de nanopartícula. Esta é muito tóxica para as bactérias e apresenta um efeito mínimo para as células humanas. Nesse sentido, tem sido recomendada a sua aplicação em indústrias agroalimentares, uma vez que pode provocar a lise total de bactérias patogénicas presentes nestes meios ou inibir o seu crescimento, sem representar um risco para humanos. Relativamente ao seu modo de atuação, tal como no caso dos metais anteriormente descritos, o mesmo não é claro, contudo pensa-se que poderá estar relacionado com a formação de peróxido de hidrogénio que impede o crescimento das células, ou com a libertação de catiões Zn^{2+} que pode danificar a membrana celular da bactéria e interagir com o seu conteúdo interno. No que respeita à sua potencial ação antivírica, sugere-se que o modo de atuação é análogo ao verificado para os outros metais anteriormente descritos (Ravishankar e Jamuna 2011).

Tal como no caso do cobre, também para o zinco não existe qualquer informação na literatura sobre o seu uso como agente antivírico em substratos sólidos.

Apesar do potencial e das vantagens destes agentes inorgânicos para o desenvolvimento de substratos sólidos funcionais (Tabela 2.1) é importante realçar que estes apresentam também alguns inconvenientes, nomeadamente encontram-se proibidos em alguns países e sobretudo na área têxtil.

Tabela 2.1-Vantagens e desvantagens do uso de metais como agentes antivíricos

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> - Eficiências antimicrobiana e antivírica muito elevadas; - Uso de uma quantidade inferior de agente devido à sua elevada eficácia no combate aos patogénicos; - Resistência considerável a detergentes, não sendo eliminado dos substratos nas lavagens sucessivas; - Maior conhecimento científico; - Preço reduzido. 	<ul style="list-style-type: none"> - Redução do metal, levando ao amarelecimento dos substratos, sobretudo fibras têxteis; - Pode levar a um aumento da concentração de metais nos esgotos que depois de libertados nos cursos de água poderão afetar negativamente vários organismos presentes no ambiente; - Menor conhecimento sobre o efeito prolongado das nanopartículas metálicas na saúde humana.

2.2.2.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são uma mistura líquida hidrofóbica, na maior parte das vezes complexa, de substâncias voláteis produzidas por plantas aromáticas, normalmente extraídos pelo processo de destilação. Têm sido usados na medicina em épocas distintas da história, mas durante séculos foram utilizados como agentes antimicrobianos. Estes agentes, produzidos como metabolitos secundários, funcionam por vezes como “sistema imunológico” da planta que os produz, permitindo combater alguns patogénicos, tais como bactérias e fungos (Ungureanu e Ferdeş 2012). A atividade dos óleos essenciais contra as células microbianas poderá estar relacionada com o aumento da fluidez e da permeabilidade da membrana celular, com a inibição da respiração da célula e com a modificação dos processos de transporte de iões. Contudo, esta ação depende dos principais constituintes do óleo essencial, da sua concentração e do tipo de bactéria (Reichling, *et al.* 2009).

Também os vírus, sobretudo com envelope, são muito sensíveis a determinados óleos essenciais e a ação antivírica destes poderá estar relacionada com o facto de interferirem no envelope dos vírus, ou modificarem constituintes fundamentais que permitem a adsorção dos mesmos na superfície da célula. Porém, estes agentes não atuam depois dos viriões terem penetrado no hospedeiro (Reichling, *et al.* 2009).

Atualmente, com o aumento da resistência das bactérias aos desinfetantes, antibióticos, esterilizantes, entre outros, estão a ser desenvolvidos novos produtos

alternativos contendo óleos essenciais antibacterianos por exemplo para materiais de embalagem, mas também para potencial ação antivírica.

De forma similar ao que se observa para os metais, também os óleos essenciais apresentam vantagens e desvantagens ao serem utilizados como agentes antivíricos (Tabela 2.2).

Tabela 2.2- Vantagens e inconvenientes do uso de óleos essenciais como agentes antivíricos

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none">- Alguns são de origem 100% natural;- A maioria não é prejudicial para o meio ambiente nem para o Homem.	<ul style="list-style-type: none">- Baixa exploração científica sobre as suas atividades antimicrobiana e antivírica;- Baixa aplicação na funcionalização de substratos sólidos;- Custos elevados.

2.2.2.3 Lactoferrina

A lactoferrina é também um exemplo de um possível agente com atividade biológica de origem natural. Trata-se de uma glicoproteína presente no leite, embora exista também noutros fluídos, que efetua o transporte do ferro. Possui cerca de 700 aminoácidos (dependendo da origem), um peso molecular de 80 kDa e o seu ponto isoelétrico é cerca de 8,7 (Adlerova, Bartoskova e Faldyna 2008; Levay e Viljoen 1995). Na figura 2.3 está ilustrada a sua estrutura 3D.

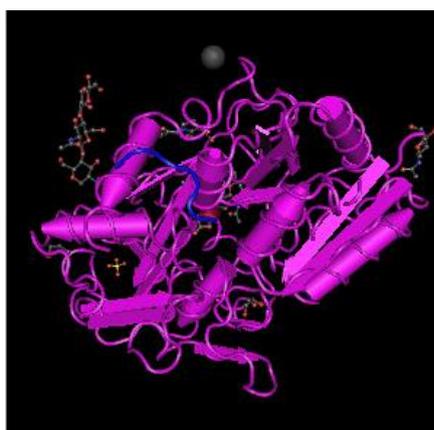


Figura 2.3- Estrutura molecular da lactoferrina de origem bovina (retirado de [4])

A lactoferrina parece ter inúmeras funções biológicas importantes tais como a ação contra alguns vírus, bactérias e fungos, e ainda a atividade anti-inflamatória e antioxidante (Adlerova, Bartoskova e Faldyna 2008).

A capacidade antibacteriana poderá estar relacionada com a ligação da lactoferrina ao ferro, impedindo as bactérias ferro-dependentes, como a *E. coli*, de adquirir e portanto provocando a sua morte celular dado que o ferro é um elemento fundamental para o seu metabolismo. Outra possível explicação poderá ser a ligação da proteína à membrana citoplasmática, induzindo a libertação de lipopolissacarídeos e provocando a morte por osmose em bactérias Gram-negativas (Adlerova, Bartoskova e Faldyna 2008).

Por sua vez, a atividade da lactoferrina contra alguns vírus poderá estar relacionada com a ligação da proteína aos ácidos nucleicos dos vírus, ou com a inibição da entrada das partículas virais nas células, quer através da sua ligação aos recetores existentes na membrana celular ou através da sua ligação direta às partículas virais. Outra explicação possível e que tem sido atualmente estudada é a sua ação antiviral posterior à infeção pelo vírus (Adlerova, Bartoskova e Faldyna 2008; Florian, *et al.* 2009). A figura 2.4 ilustra alguns destes potenciais mecanismos de ação antiviral da proteína.

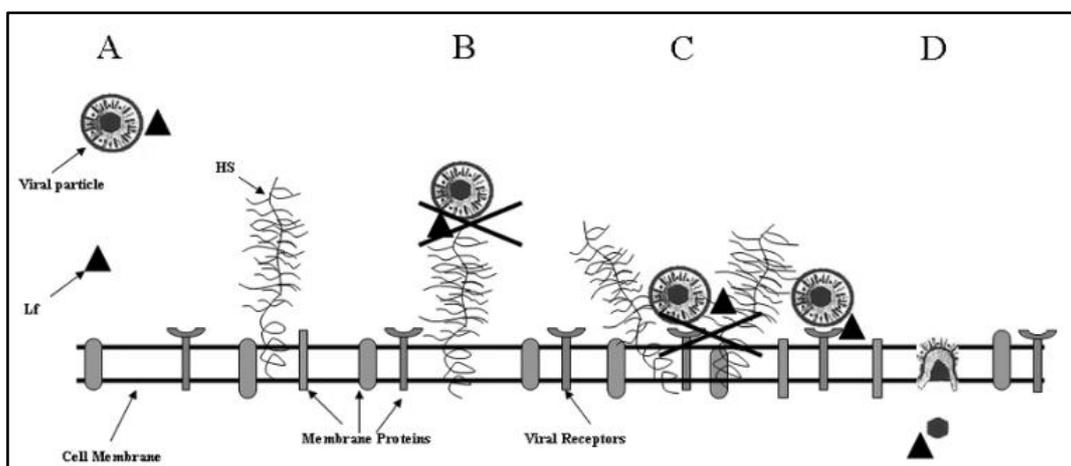


Figura 2.4- Representação de diferentes modos de ação antiviral da lactoferrina: prevenção da infeção viral por ligação direta às partículas virais (A) ou por competição com o vírus para os recetores/co-recetores comuns na superfície das células alvo (B e C) e uma atividade intracelular da lactoferrina (D) (retirado de (Florian, *et al.* 2009))

Tal como qualquer potencial agente antivírico, também a lactoferrina apresenta vantagens e desvantagens (Tabela 2.3).

Tabela 2.3- Vantagens e desvantagens da utilização da lactoferrina como agente antivírico

Vantagens	Desvantagens
- Não é prejudicial para saúde humana nem para os ecossistemas; - Origem 100% natural.	- Algumas lacunas no conhecimento científico sobre os mecanismos envolvidos na sua atividade antimicrobiana e antivírica; - Custos elevados na funcionalização de superfícies sólidas com lactoferrina.

2.3 Técnicas de caracterização dos substratos sólidos funcionalizados

A caracterização de qualquer substrato, em particular dos substratos sólidos, é extremamente importante para aferir a sua correta funcionalização, mas também para conhecer a sua composição química e perceber as suas propriedades físicas. Isto é, os materiais apresentam características físico-químicas diferentes entre si e como tal, respondem de forma distinta à incorporação dos agentes antivíricos ou qualquer outra molécula ou agente que se pretenda usar na funcionalização. Estas alterações precisam de ser confirmadas por recurso a várias técnicas de caracterização de superfícies sólidas funcionalizadas em comparação com amostras controlo.

As técnicas mais utilizadas na caracterização de materiais funcionalizados (ou não) são FTIR- ATR, Análise Termogravimétrica (TGA), SEM- EDS, XPS e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

2.3.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier com Refletância Total Atenuada

A técnica de FTIR permite a identificação de compostos presentes em vários tipos de compostos através da interpretação do espectro de absorção infravermelha. Ou seja, os valores obtidos da absorção de energia da radiação infravermelha por parte dos compostos são comparados com os valores específicos (de referência) de cada substância ou mesmo molécula, uma vez que a radiação absorvida por cada uma corresponde a módulos de vibração que são próprios de cada substância ou molécula (Lopes 2009). No entanto, dos vários modos que existem para a obtenção dos espectros de absorção infravermelha, destaca-se o modo ATR. A partir da técnica

de caracterização de FTIR- ATR é possível adquirir-se espectros de amostras que não podem ser diluídas, como é o caso dos substratos sólidos utilizados neste projeto, colocando os mesmos em contacto com um cristal que pode ser de seleneto de zinco ou de germânio (Monteiro 2011).

2.3.2 Análise Termogravimétrica

A tecnologia de TGA possibilita a análise da estabilidade térmica de uma superfície sólida mas também a determinação da fração de compostos voláteis que a mesma possui. Desta forma, mede-se a alteração de massa de uma substância em função da temperatura, e isso pode ser feito à medida que a substância é sujeita a um programa controlado de temperatura ou quando é avaliada em função do tempo a uma temperatura não variável (Lopes 2009).

2.3.3 Microscopia Eletrónica de Varrimento com Espetrometria de Dispersão de Energia

A técnica de SEM permite a obtenção de imagens da superfície dos substratos sólidos funcionalizados e a sua caracterização a uma escala micro e nanométrica. Isso é conseguido através da interação do substrato com um feixe fino de eletrões, conseguindo-se analisar a topografia da superfície, bem como a sua composição química, estrutura cristalina, entre outras propriedades relevantes em engenharia dos materiais, desde que os detetores apropriados estejam disponíveis e o microscópio esteja associado a um espectrómetro de Raios-X. Assim, através do EDS, é possível estudar a composição local das superfícies sólidas utilizando um feixe de eletrões como radiação primária (Lopes 2009; Monteiro 2011).

2.3.4 Espetroscopia de Fotelectrões de raios- X

A tecnologia de XPS possibilita várias análises, nomeadamente a identificação de moléculas presentes na superfície dos substratos sólidos e o seu estado químico através das alterações nas energias de ligações. Além disso, permite a quantificação, concentração e análise do tipo de ligações químicas dos componentes aos substratos mas também a distribuição eletrónica dos átomos que se encontram na superfície do substrato sólido (Cunha 2000).

2.3.5 Calorimetria Exploratória Diferencial

A DSC é uma técnica de caracterização que mede as diferenças de fluxo de calor fornecida à amostra e a um material de referência, em função da temperatura e à medida que ambos são sujeitos a um programa de temperatura controlada. Deste modo, pode-se observar os eventos físicos e químicos que resultam da variação de energia da amostra em função da razão de aquecimento aplicada sobre ela (Lopes 2009).

2.4 Métodos de determinação da atividade antivírica

Nos últimos tempos, tem-se verificado o desenvolvimento e a melhoria de técnicas rápidas e fiáveis para a deteção e quantificação de patogénicos que auxiliam na determinação da atividade antimicrobiana e antivírica de diversos agentes. No entanto, os procedimentos complicam-se quando se pretende determinar essa atividade em substratos sólidos. Neste subcapítulo destacam-se alguns métodos para a determinação da atividade antivírica de agentes presentes em meio líquido e de superfícies sólidas funcionalizadas com esses agentes, fazendo uma prévia referência ao vírus mais utilizado neste tipo de ensaios.

2.4.1 Fago MS2 de *Enterobacteria*

Na determinação da atividade antivírica de substratos sólidos funcionalizados, é habitual utilizar-se o fago MS2. Este bacteriófago é um bom modelo dos vírus humanos e muito utilizado em trabalhos de investigação que envolvem a determinação da atividade antivírica, devido ao facto de ser semelhante aos vírus sem envelope relevantes a nível clínico, como o da hepatite A, norovirus e enterovirus. Além disso, o MS2 não é patogénico para os humanos e é relativamente fácil de manipular em trabalhos laboratoriais (Rengasamy, Fisher e Shaffer 2010; Drees, Abbaszadegan e Maier 2003; Gerhardtts, Mucha e Höfer 2012).

O fago MS2 pertence à família de bacteriófagos *Leviviridae* e ao género *Levivirus*, e possui no seu material genético uma única cadeia de RNA linear de polaridade positiva (RNA+) com 3 569 nucleótidos. O virião possui, geralmente, um diâmetro de 26 nm e é constituído por uma cópia da proteína de maturação A e por 180 cópias da proteína de revestimento com o número de triangulação $T = 3$, sendo

esta proteína importante para a proteção do RNA. O fago MS2 ainda transporta informação para a codificação de quatro proteínas, nomeadamente a proteína de maturação, a proteína de revestimento (Figura 2.5), a replicase e a proteína de lise, sendo que a tradução dos genes é regulada pela estrutura secundária do RNA nos locais de ligação ao ribossoma (Harper 2011; Brennecke 2009; Kuzmanovic, *et al.* 2003).

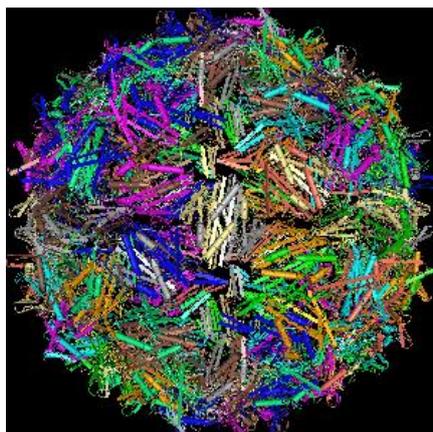


Figura 2.5- Proteína de revestimento do fago MS2 (retirado de [5])

No que respeita à sua replicação, este bacteriófago apenas infeta bactérias de *E. coli* que possuam *pilus*, célula F^+ , pois adsorvem-se a esta estrutura recetora para introduzir o seu material genético na célula. Contudo, o mecanismo preciso de infeção é bastante complexo e ainda pouco conhecido. Nas etapas seguintes do ciclo de replicação, a molécula de RNA⁺ pode servir como mRNA para codificar uma replicase que, por sua vez usa a cadeia de RNA⁺ como molde para formar uma cadeia de RNA⁻, que posteriormente é utilizada para produzir mais cadeias de RNA⁺ (Kuzmanovic, *et al.* 2003; Brennecke 2009; Ferreira e Sousa 1998). A figura 2.6 ilustra o esquema do ciclo de replicação do bacteriófago MS2.

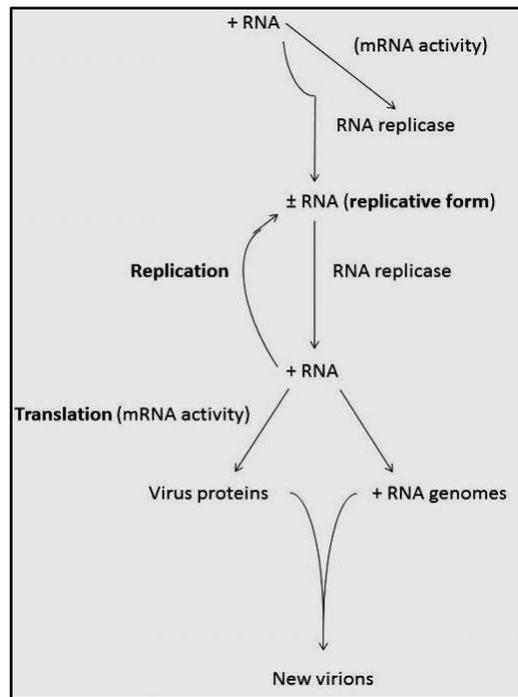


Figura 2.6- Ciclo viral do fago MS2 (adaptado de (Prescott, Harley e Klein 1999))

2.4.2 Métodos expeditos para a determinação da atividade antivírica de agentes presentes em meio líquido

Na determinação da atividade antivírica, os métodos em que o agente e o vírus se encontram na fase líquida são os mais desenvolvidos. A literatura menciona diversas tecnologias que possibilitam uma análise rápida da ação de agentes contra vírus, nomeadamente a sua contagem comparativamente com um controlo (sem o agente). Destacam-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), ensaios imunoenzimáticos (ELISA), diversos tipos de biossensores e citometria de fluxo.

2.4.2.1 PCR

A PCR permite a identificação e distinção de organismos patogénicos e não patogénicos, com recurso à etapa posterior denominada de eletroforese em gel. É uma tecnologia que possui diversas variantes, porém apenas a PCR em Tempo Real permite quantificar os patogénicos. Esta possibilita que a amplificação, a deteção e a quantificação do material genético dos vírus sejam efetuadas numa única etapa, sem necessitar da eletroforese, o que diminui o risco de contaminação, e permite obter uma maior reprodutibilidade e resultados mais precisos, uma vez que determina valores durante a fase exponencial da reação. Recorre a um marcador fluorescente, como o

SYBR®Green ou TaqMan®, para efetuar a quantificação exata, ou seja, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado, em comparação com um controle. É uma técnica bastante usada para detetar e quantificar diversos vírus humanos, como o Vírus da Hepatite C (HCV), o Vírus da Hepatite B (HBV), o HIV, entre outros (Oliveira 2010). Alguns destes vírus podem ainda ser sujeitos previamente à PCR Transcriptase Reversa, uma vez que o seu material genético é composto por RNA.

Além disso, alguns *Kits* para a identificação de vírus já foram desenvolvidos, como o *QuantiTect Virus Kit* da empresa QIAGEN que deteta até 4 ácidos nucleicos alvo por PCR Transcriptase Reversa em Tempo Real com recurso a sondas específicas de sequências [6].

A tabela 2.4 sumariza as principais vantagens e desvantagens desta tecnologia (Oliveira 2010).

Tabela 2.4- Vantagens e inconvenientes da PCR

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> - Processo de amplificação económico; - Processo muito rápido; - Elevada especificidade, não necessário isolar o DNA de interesse; - Técnica muito conhecida. 	<ul style="list-style-type: none"> - É necessário conhecer o vírus, ou seja, a sequência a amplificar e selecionar <i>primers</i> específicos; - Risco de contaminação por DNA estranho; - Baixa reprodutibilidade; - Custo de aquisição do equipamento elevado.

2.4.2.2 ELISA

O ELISA é um método que combina a especificidade de um anticorpo com a sensibilidade de um ensaio enzimático, baseando-se no princípio anticorpo- antigénio.

Tal como a tecnologia de PCR, existem vários tipos de ELISA, no entanto a utilizada para a identificação e quantificação de vírus ou antigénios é a chamada ELISA Sanduíche, uma vez que nas outras se detetam anticorpos. Desta forma, o anticorpo primário específico para o vírus é adsorvido a uma superfície insolúvel, onde de seguida o vírus adicionado reage com ele. Posteriormente, é adicionado um novo anticorpo primário e um anticorpo secundário conjugado com uma enzima que reage

com o antígeno. Porém, este último anticorpo também é específico para o vírus mas com um epítipo diferente do primeiro. Depois de um substrato ser introduzido, ocorre a catálise da reação, a formação de um produto colorido e a análise da resposta, por exemplo por calorimetria (Dantas 2004). A figura 2.7 ilustra um esquema do método ELISA Sanduíche.

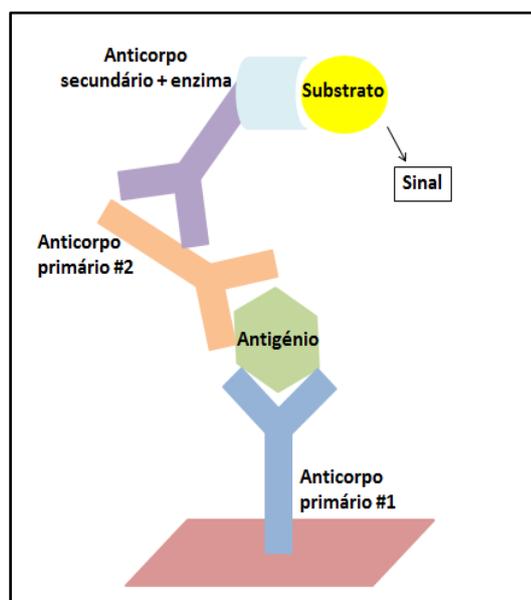


Figura 2.7- Esquema do método Imunoenzimático Sanduíche (adaptado de (Casseb 2010))

Esta técnica apresenta inúmeras aplicações, sendo um exemplo a detecção e quantificação do HIV em testes sorológicos (Costa e Machado 1999).

Como em todas as tecnologias, a ELISA apresenta vantagens mas também alguns inconvenientes (Tabela 2.5) (Dantas 2004).

Tabela 2.5- Vantagens e limitações da técnica ELISA

Vantagens	Desvantagens
- Muito conhecida e económica;	- É necessário conhecer o vírus, ou seja, os anticorpos a utilizar;
- Elevada sensibilidade e alta reprodutibilidade;	- Suscetível a erros de manipulação;
- Análise rápida;	- Instabilidade dos reagentes.
- Permite a análise de várias amostras ao mesmo tempo.	

2.4.2.3 Biossensores

Outras tecnologias que são aplicadas para a análise da atividade antivírica são os biossensores que, de um modo geral possibilitam a identificação e a quantificação de vírus ou organismos patogénicos presentes numa determinada amostra, com recurso a entidades como anticorpos, antígenos, enzimas, ácidos nucleicos, entre outras. Assim, um destes elementos é imobilizado num dispositivo, o transdutor, que transforma a resposta biológica num sinal de saída que pode ser medido. Este último pode advir, por exemplo, da libertação de calor, da transferência de eletrões ou das variações de massa (J. J. Silva 2004).

Vários são os exemplos de biossensores, como os de ondas acústicas de superfície, que utilizam o princípio anticorpo- antígeno para detetar patogénicos; ou a fixação de uma sonda de DNA no dispositivo que hibridiza com a cadeia de DNA que se pretende identificar (Länge, Rapp e Rapp 2008). Além destes existem igualmente os biossensores com transdutores de DNA, como os óticos, eletroquímicos e os piezelétricos, que se destacam por serem muito usados para a deteção de doenças infecciosas e genéticas. Nestes sensores ocorre a fixação de uma sonda de DNA na superfície de um cristal oscilante, como quartzo, e a medição da frequência alterada por aumento do peso devido à hibridização (J. J. Silva 2004).

A tabela 2.6 sumariza os benefícios e as limitações do uso de biossensores na deteção de vírus (J. J. Silva 2004).

Tabela 2.6- Vantagens e inconvenientes do uso de biossensores para a deteção de vírus

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> - Elevada sensibilidade e seletividade; - Dispositivo pequeno; - Resposta rápida. 	<ul style="list-style-type: none"> - Os custos de aquisição são elevados; - Dificuldade ao nível do fabrico de alguns biossensores; - São pouco comerciais; - É necessário conhecer o vírus a analisar;

2.4.2.4 Citometria de fluxo

Os citómetros de fluxo mais recentes têm sido usados na área clínica para efetuar análises qualitativas e quantitativas de vírus, visto que com os convencionais era quase impossível identificar a presença dos mesmos por serem muito pequenos.

O citómetro de fluxo direciona perpendicularmente um feixe de luz de um comprimento de onda específico a um meio líquido em fluxo laminar, onde os corantes fluorescentes que se encontram nos ácidos nucleicos previamente marcados excitam e, por comparação com outro fluido, permitem o cálculo da concentração de vírus presente na amostra através de um *software* próprio (Beirão 2011). Num estudo realizado há alguns anos conseguiu-se detetar, após a coloração com SYBR Green I, a presença de vírus de diferentes famílias, em que alguns possuíam tamanhos de RNA muito pequenos (7,4- 14,5 kb) e foram detetados no limite de deteção do instrumento (Brussaard, Marie e Bratbak 2000). A tabela 2.7 resume as vantagens e inconvenientes da citometria de fluxo na deteção de vírus (Brussaard, Marie e Bratbak 2000).

Tabela 2.7- Vantagens e desvantagens da técnica de citometria de fluxo

Vantagens	Desvantagens
- Método rápido, direto e preciso;	- Custo de aquisição do equipamento
- Permite a visualização dos resultados;	elevado;
- Fácil utilização;	- Em alguns instrumentos o limite de
- Grande reprodutibilidade.	deteção pode ser elevado ou, no caso de
	vírus muito pequenos, pode ser impossível
	a sua deteção.

2.4.3 Métodos de determinação da atividade antivírica de substratos sólidos

Relativamente aos substratos sólidos, existem mais procedimentos para a determinação da sua atividade antibacteriana do que da antivírica, sendo que alguns já se encontram normalizados, tais como a medição da atividade antibacteriana em superfícies de plástico pela ISO 22196:2007 e a medição da atividade antibacteriana dos produtos têxteis acabados antibacterianos pela ISO 20743:2007. Os métodos de deteção das atividades antivíricas de superfícies sólidas são mais escassos e ainda pouco desenvolvidos quando comparados com os do subcapítulo anterior. De todas as formas, pode-se destacar o método de contagem em placa com diluições sucessivas, que também costuma ser bastante usado quando o agente e o vírus se encontram na fase líquida.

2.4.3.1 Método de contagem em placa com diluições sucessivas

A contagem em placa com diluições sucessivas é um método indireto comum para a inoculação e contagem de Unidades Formadoras de Colónias de uma cultura microbiana. É um método muito empregue, uma vez que está descrito nas ISO's (mencionadas anteriormente) como um dos métodos possíveis de serem usados para ajudar a calcular a atividade antibacteriana de substratos sólidos.

O que tem sido feito é a adaptação destas normas e deste método para a determinação da capacidade de agentes atuarem contra os vírus, nomeadamente através da contagem de Unidades Formadoras de Placa (UFP). Um exemplo é o referido pelo Hohenstein Institute que determina a atividade total antivírica num substrato sólido com recurso ao fago MS2 e alterando apenas alguns critérios da ISO 20743:2007. Na adaptação feita por este instituto, é colocada uma determinada quantidade de suspensão viral, com concentração inicial conhecida, sobre o substrato sólido, e é posteriormente adicionada uma película para promover uma distribuição uniforme sobre o mesmo. Após 18 h de incubação, essa suspensão é lavada com um tampão e sujeita a diluições sucessivas. Estas são plaqueadas juntamente com o hospedeiro apropriado e os resultados expressos em UFP por unidade de volume da amostra, tendo em consideração a diluição feita em cada ensaio (Hohenstein Laboratories 2010).

O Hohenstein Institute baseia-se na equação 2.1 para validar os seus testes (Hohenstein Laboratories 2010), sendo que o valor de R_{sc} tem de estar no intervalo $]-1,5 ; 0,0]$.

$$R_{sc} = B - A$$

Equação 2.1

Onde:

R_{sc} é a atividade antivírica específica após 18 h de incubação da amostra controlo.

B é o número médio de partículas virais ativas (UFP) após 18 h de incubação, na amostra controlo.

A é o número médio de partículas virais ativas (UFP) imediatamente após a inoculação, na amostra controlo.

Para o cálculo da atividade antivírica das superfícies sólidas, o Hohenstein Institute utiliza a equação 2.2, baseada na equação da atividade antibacteriana presente na ISO 20743:2007 (Hohenstein Laboratories 2010).

$$R_s = (A - C) - (A - B) \Leftrightarrow R = (B - C) \quad \text{Equação 2.2}$$

Onde:

R_s é a atividade antivírica específica da amostra funcionalizada.

C é o número médio de partículas virais ativas (UFP) após 18 h de incubação, na amostra funcionalizada.

Após a determinação da atividade antivírica das amostras, o Hohenstein Institute baseia-se na tabela 2.8 para avaliar a mesma (Hohenstein Laboratories 2010).

Tabela 2.8- Critério de avaliação da atividade antivírica de acordo com a metodologia descrita por Hohenstein Institute

Atividade antivírica	Redução de partículas [Log(UFP)]
Inexistente	[0,0 ; 1,5[
Ligeira	[1,5 ; 4,0]
Significante	> 4,0

O método de contagem em placa com diluições sucessivas apresenta vantagens e desvantagens que estão resumidas na tabela 2.9 (Rengasamy, Fisher e Shaffer 2010).

Tabela 2.9- Vantagens e desvantagens do método de contagem em placa com diluições sucessivas

Vantagens	Desvantagens
- Método bastante conhecido e muito empregue;	- Não permite a contagem absoluta de partículas virais;
- Obtenção de UFP isoladas, permitindo um melhor estudo quantitativo e qualitativo.	- Método lento;
	- É necessário muito material laboratorial;
	- Suscetível a erros de manipulação e contagem.

3. Materiais e métodos

3.1 Funcionalização dos substratos sólidos

No subcapítulo 3.1 são descritos os processos utilizados para a funcionalização dos substratos sólidos, rígido e flexível, com os agentes antivíricos a estudar.

3.1.1 Funcionalização do substrato sólido rígido

O substrato sólido rígido utilizado foi o aglomerado revestido com papéis melamínicos e os agentes antivíricos comerciais selecionados foram um zeólito de prata X e um composto orgânico Y. As fórmulas químicas de ambos estão demonstradas a seguir de acordo com a informação dos fornecedores.

Fórmula química do agente X: $X_{2/n}O-Na_2O-Al_2O_3-2SiO_2$

Fórmula química do agente Y: $C_{10}H_8N_2O_2S_2Zn$

O processo utilizado para a funcionalização do substrato rígido foi a impregnação em resina, que possui um agente *crosslinking*, formando uma rede polimérica. O procedimento experimental iniciou-se com a submersão de uma folha W (tamanho A5) numa tina contendo resina melamínica. Este processo foi repetido duas vezes e posteriormente a folha foi mergulhada numa outra tina contendo a mesma resina, o agente antivírico com diferentes concentrações e outros componentes de acordo com o descrito na tabela 3.1. O catalisador foi o último componente adicionado. As folhas foram retiradas da tina depois de estarem completamente mergulhadas. Após cada banho, o excesso de solução foi removido espremendo o material entre duas varetas. Por fim, secou-se a folha W funcionalizada durante 1 min numa estufa a 120 °C e depois à temperatura ambiente durante a noite. O controlo foi preparado de forma similar excetuando a adição do agente antivírico.

Tabela 3.1- Composição do banho de funcionalização para cada amostra

Amostras	Agente (%)			Controlo
	1,0	5,0	17,0	
Resina melamínica (%)	93,45	93,45	81,79	93,45
Água destilada (%)	4,34	0,34	0,00	5,34
Composto A (%)	0,40	0,40	0,40	0,40
Composto B (%)	0,40	0,40	0,40	0,40
Catalisador (%)	0,41	0,41	0,41	0,41

Posteriormente, as folhas W funcionalizadas foram prensadas no aglomerado, por um técnico, na empresa SI- PSCM situada em Oliveira do Hospital. Para prensar os aglomerados foi utilizada uma prensa piloto existente nas instalações da empresa, usando-se uma pressão de 20 bar e uma temperatura de 120 °C.

3.1.2 Funcionalização do substrato sólido flexível

Utilizou-se o tecido de algodão como substrato sólido flexível e a proteína Z de origem natural como potencial agente antivirico.

Inicialmente, testou-se a formação de um complexo entre o agente Z e a β -ciclodextrina, com o objetivo de encapsular a proteína e permitir a sua libertação controlada e gradual. A β -ciclodextrina liga-se de forma permanente ao tecido de algodão, devido à formação de uma ligação covalente entre esta molécula e o substrato têxtil através de um agente de *crosslinking*.

3.1.2.1 Testes de formação de um complexo entre o agente Z e a β -ciclodextrina

Por forma a verificar a formação de um complexo entre a β -ciclodextrina e o agente Z adotou-se o método de Job. Este método, também designado de Variação Contínua, é usado para determinar a estequiometria entre duas espécies, mantendo o número de moles total de ambas constante e variando as suas frações molares. Desta forma permite uma determinação indireta da “afinidade” entre duas espécies químicas através da construção e análise de um gráfico (*Job plot*).

O *Job plot* foi obtido pela monitorização da absorvância da solução, recorrendo a um Espectrofotómetro UV- Visível (UV-Vis) e operando a um comprimento de onda fixo igual a 294 nm. Prepararam-se sete soluções com diferentes concentrações de β -ciclodextrina e proteína Z, mantendo o número de moles total igual ($6E-07$ moles)

(Tabela 3.2). Na primeira solução, a concentração do agente Z foi de $4,0E-03$ g/ml, i.e. igual à concentração máxima da curva de calibração previamente determinada (Anexo A.1).

Tabela 3.2- Frações molares e concentrações do agente Z e da β -ciclodextrina em cada uma das soluções utilizadas para a construção do *Job plot*

Solução (12 ml)	Fração molar do agente Z	Fração molar de β -ciclodextrina	Concentração do agente Z (g/ml)	Concentração de β -ciclodextrina (g/ml)
1	1,0	0,0	$4,0E-03$	$0,0E-05$
2	0,8	0,2	$3,2E-03$	$1,0E-05$
3	0,7	0,3	$2,8E-03$	$2,0E-05$
4	0,5	0,5	$2,0E-03$	$3,0E-05$
5	0,3	0,7	$1,2E-03$	$4,0E-05$
6	0,2	0,8	$0,8E-03$	$5,0E-05$
7	0,0	1,0	$0,0E-03$	$6,0E-05$

Posteriormente, testou-se um segundo método para averiguar a formação de um complexo entre o agente Z e a β -ciclodextrina. Este baseou-se no aumento da concentração desta última em relação à da proteína, de modo a verificar se a absorvância aumentava como resultado da formação do complexo.

Assim, prepararam-se oito soluções diferentes, em meio tampão carbonato (pH=9), onde nas primeiras cinco se manteve a concentração da proteína constante e se variou a da β -ciclodextrina, nomeadamente 5, 10, 15, 18 e 20 vezes superior à do agente Z (Tabela 3.3). Nas outras combinações apenas se colocou β -ciclodextrina com concentrações iguais às das soluções 1, 3 e 5, para averiguar se as ciclodextrinas absorviam no comprimento de onda selecionado para a realização do ensaio. Posteriormente, leu-se as absorvâncias das soluções, através do UV-Vis, num comprimento de onda fixo e igual a 295 nm, tendo sido feita previamente uma nova curva de calibração do agente Z em tampão carbonato (Anexo A.2).

Tabela 3.3- Concentrações do agente Z e da β -ciclodextrina, em cada solução, no segundo teste de averiguação da formação de um complexo entre as duas moléculas

Solução (12 ml)	Concentração do agente Z (g/ml)	Concentração de β-ciclodextrina (g/ml)
1	1,2E-03	6,0E-03
2	1,2E-03	12,0E-03
3	1,2E-03	18,0E-03
4	1,2E-03	21,6E-03
5	1,2E-03	24,0E-03
6	0,0E-03	6,0E-03
7	0,0E-03	18,0E-03
8	0,0E-03	24,0E-03

3.1.2.2 Técnica de funcionalização do substrato sólido flexível

Para a funcionalização do substrato sólido flexível optou-se pela adsorção física do agente Z ao tecido de algodão. Assim, pesou-se três vezes um tecido de algodão de aproximadamente 1g e o mesmo foi mergulhado numa solução de 2% de agente Z durante 5 min. Em seguida, escorreu-se o excesso de solução com a ajuda de duas varetas, secou-se o tecido à temperatura ambiente, durante a noite, e voltou-se a pesar três vezes. O controlo foi preparado de forma similar mas a proteína foi substituída por água destilada.

3.2 Caracterização dos substratos sólidos funcionalizados

As técnicas utilizadas para a caracterização dos materiais funcionais foram FTIR- ATR, XPS e SEM- EDS.

3.2.1 FTIR- ATR

Os espetros de absorção infravermelha foram obtidos no CeNTI, usando um espectrofotómetro Perkin-Elmer Spectrum one com um acessório de ATR. Foram efetuados 16 ciclos de varrimento no intervalo de 4000 a 650 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} .

Relativamente aos substratos sólidos rígidos, apenas foram analisados o controlo e o material funcionalizado com o agente Y. Assim, adquiriram-se vários

espectros de absorção infravermelha, nomeadamente da resina melamínica, do agente Y, da folha W, da folha controlo e das folhas W com 1,0%, 5,0% e 17,0% de agente Y, de modo a verificar se o processo de funcionalização foi bem-sucedido, ou seja se as folhas foram devidamente funcionalizadas. Para além disso, também foram obtidos espectros vibracionais dos respetivos laminados com 1,0%, 5,0% e 17,0% de agente Y e do laminado controlo, de modo a verificar se depois da prensagem das folhas no aglomerado ocorreu alguma alteração na composição das amostras.

Quanto ao substrato sólido flexível, foram adquiridos os espectros de FTIR-ATR da proteína Z, do tecido de algodão sem agente, ou seja do controlo e do tecido de algodão funcionalizado o agente Z.

3.2.2 XPS

As amostras foram analisadas por um técnico no Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP), com um espectrómetro VG Scientific ESCALAB 200A, usando radiação Al K α não monocromática (1486,6 eV). Para a correção de eventuais desvios que possam ocorrer devido a efeitos de carga, a banda C 1s do carbono a 285,0 eV foi considerada como padrão interno. A técnica de XPS foi usada para analisar unicamente o laminado controlo e os laminados funcionalizados com 17,0% de agente X e 17,0% de agente Y.

3.2.3 SEM-EDS

As micrografias adquiridas por SEM e os espectros de EDS foram obtidos por um técnico no CEMUP, num microscópio eletrónico de varrimento ambiental de alta resolução Field Emission FE Quanta 400 FEG ESEM, equipado com um espectrofotómetro de microanálise de Raios-X Genesis X4M. As amostras analisadas por SEM foram revestidas com ouro uma vez que os substratos sólidos em estudo são materiais não condutores. As amostras para EDS não foram revestidas.

Através da tecnologia SEM-EDS analisou-se o laminado controlo, os laminados funcionalizados com 1,0% e 17,0% de agente X e os laminados com 1,0% e 17,0% de agente Y. Relativamente aos substratos flexíveis, analisou-se o tecido de algodão controlo e o tecido de algodão com o agente Z.

3.3 Determinação da atividade antivírica

No subcapítulo 3.3 são descritos os métodos utilizados para a determinação da atividade antivírica dos agentes X, Y e Z presentes em meio líquido e das superfícies sólidas funcionalizadas, fazendo uma prévia referência à preparação do vírus utilizado e do seu hospedeiro.

3.3.1 Preparação do vírus e do hospedeiro

Para os ensaios de determinação da atividade antivírica das amostras, selecionou-se o bacteriófago MS2.

A preparação do fago MS2 e do seu hospedeiro *E. coli* W1485 (célula F⁺), ambos da ATCC – American Type Culture Collection comprados à empresa Life Technologies, para os ensaios experimentais envolveu várias etapas como a ativação dos *stocks* de bactéria e fago e sua posterior propagação, a produção do fago MS2, a determinação do título do fago e a concentração do bacteriófago MS2 com polietilenoglicol (PEG).

3.3.1.1 Ativação e propagação da bactéria *E. coli* W1485

Nesta primeira etapa retirou-se aproximadamente 1ml de suspensão celular do frasco de *stock*, colocou-se num tubo de 5 ml e hidratou-se o *pellet* inteiro. Transferiu-se esta amostra de novo para o frasco e misturou-se. Seguidamente, utilizou-se algumas gotas da suspensão para inocular a bactéria em meio Luria-Bertani (LB) líquido e em placa com meio LB ágar (Anexo C). Incubou-se os tubos, de forma inclinada para promover o arejamento, a 200 rpm e a 37 °C, e as placas numa posição invertida, à mesma temperatura [7].

3.3.1.2 Ativação e propagação do fago MS2

Nesta fase, preparou-se uma cultura fresca da bactéria *E. coli* W1485 a partir do *stock* congelado. Depois do hospedeiro ter crescido durante 6 h, adicionou-se aproximadamente 1,0 ml da suspensão celular para um frasco de fago liofilizado e 0,5 ml para um frasco de congelação de 2,0 ml. Colocou-se uma gota de bactéria crescida numa placa previamente preparada e colocou-se LB *top agar* para solidificar (Anexo

C). Por fim, colocou-se uma gota de fago MS2 no centro da placa, deixou-se secar e incubou-se a placa, numa posição invertida, a 37 °C durante a noite [8].

3.3.1.3 Produção do fago MS2

A produção de bacteriófago tem como principal objetivo a obtenção de uma concentração elevada do mesmo, para ser utilizada em ensaios posteriores, e pode ser feita em placa ou em meio líquido.

Ao usar-se a primeira via de produção, colocou-se em várias placas, com meio LB ágar previamente preparadas, 100 µl de suspensão celular e LB *top agar* e deixou-se secar à temperatura ambiente durante 10 min. Seguidamente, com a ajuda de palitos, picou-se a gota de fago produzida anteriormente, fez-se duas linhas de picotado nas novas placas e, através de tiras pequenas de papéis, deslizou-se no ágar ao longo das linhas de picotado de cima para baixo (Figura 3.1). Rodou-se as placas 90° e repetiu-se o procedimento, de modo a permitir a infeção do bacteriófago em toda a placa. Incubou-se as placas a 37 °C durante a noite e, no dia seguinte, colocou-se tampão SM (Anexo C) nas mesmas, de modo a recuperar o bacteriófago. Voltou-se a incubar as placas durante a noite a 4°C, recuperou-se o líquido das mesmas usando uma micropipeta e colocou-se em tubos de Falcon de 50 ml.



Figura 3.1- Imagem ilustrativa da produção do fago MS2 em placa, onde previamente foi colocada uma mistura de suspensão celular com LB *top agar*

Na propagação de bacteriófago em meio líquido, colocou-se em balões de Erlenmeyer 100 ml de meio LB líquido e 1 ml de suspensão celular crescida e incubou-se a 37 °C e a 200 rpm durante o dia. Adicionou-se 10 ml de fago, voltou-se a incubar

nas mesmas condições durante a noite e posteriormente deitou-se o conteúdo de cada Erlenmeyer em tubos de Falcon de 50 ml.

Posteriormente, para ambas as vias de produção, centrifugou-se os tubos de Falcon durante 20 min, a 4000 g e 4 °C, de modo a separar as células do fago. De seguida, transferiu-se o sobrenadante para tubos novos, colocou-se umas gotas de clorofórmio e voltou-se a centrifugar nas mesmas condições. Ao transferir novamente o sobrenadante para tubos novos, adicionou-se por cada 10 ml de amostra cerca de 1 µg de DNase I e deixou-se à temperatura ambiente durante 30 min. Por fim, purificou-se o bacteriófago usando filtros de 0,22 µm, de modo a remover quaisquer bactérias que pudessem ainda estar presentes na amostra. As amostras filtradas foram então guardadas a 4 °C até serem utilizadas.

3.3.1.4 Determinação da concentração do fago

Para determinar a concentração das várias produções de bacteriófago realizadas, utilizou-se o método referido no ponto 2.4.3.1 do Estado de arte, expresso em UFP. Assim, fez-se diluições decimais das amostras em tampão SM, de 10⁻¹ até 10⁻⁸, e adicionou-se a placas devidamente preparadas com o hospedeiro. Estas foram incubadas a 37 °C durante a noite e no dia seguinte procedeu-se à contagem de UFP. Para determinar a concentração de fago nas várias propagações efetuadas utilizou-se a equação 3.1.

$$C_f = \frac{UFP_p \times F}{V_f} \quad \text{Equação 3.1}$$

Onde:

C_f é a concentração de bacteriófago expressa em UFP/ml da amostra.

UFP_p é o número de UFP contadas na placa.

F é o fator de diluição.

V_f é o volume de fago plaqueado expresso em ml.

3.3.1.5 Concentração do fago MS2 com PEG

A concentração do bacteriófago foi efetuada sempre que o seu título resultante das produções realizadas era demasiado baixo para prosseguir com o trabalho. Para o efeito, adicionou-se 0,584 g de NaCl por cada 10 ml de amostra e deixou-se os tubos

de Falcon em gelo durante 1 h. Estes foram centrifugados durante 10 min, a 11 000 g e a 4 °C, e adicionou-se 1 g de PEG 8000 por cada 10 ml de amostra, deixando-se dissolver à temperatura ambiente. Transferiu-se o sobrenadante para tubos novos, guardou-se os mesmos no gelo durante 2 h e voltou-se a centrifugar nas mesmas condições. Retirou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* em tampão SM (160 µl/10 ml de amostra) e deixou-se os tubos no gelo durante 1 h. Adicionou-se um igual volume de clorofórmio nos tubos, colocou-se os mesmos no vórtex durante 30 s e centrifugou-se durante 15 min a 3000 g e a 4 °C. Por último, recolheu-se a fase aquosa, fez-se diluições decimais e plaqueou-se para determinar a sua concentração.

3.3.2 Determinação da atividade antivírica dos agentes em meio líquido

A realização deste ensaio teve como objetivo a determinação da atividade antivírica dos agentes presentes em meio líquido, ou seja no seu estado livre, de modo a comparar com os ensaios em que os mesmos se encontram associados ao substrato sólido e averiguar se a funcionalização altera essa capacidade de atuar contra os vírus.

Deste modo, testou-se em 20 ml de meio, 1,0%, 5,0% e 20,0 % em massa de agente X e de agente Z; 0,8%, 3,8% e 15,4% em massa de agente Y¹; e um controlo (sem qualquer agente) (Anexo D.1). Foram realizados 3 ensaios, sendo que no primeiro se utilizou uma concentração inicial de fago de 9,7E+07 UFP/ml, no segundo de 4,6E+07 UFP/ml e no terceiro de 1,1E+07 UFP/ml.

Os balões de Erlenmeyer foram colocados numa incubadora a 170 rpm de modo a promover uma mistura homogénea e à temperatura ambiente do laboratório (o produto final será utilizado a esta temperatura). Retirou-se amostras de 1 ml ao final de 1, 2, 4, 6 e 24 h após o início do ensaio, de modo a avaliar a atividade antivírica dos agentes ao longo do tempo. Fez-se diluições decimais das várias amostras em tampão SM, até 10⁻⁸, plaqueou-se em meio LB e incubou-se a 37 °C durante a noite. Posteriormente, contou-se as UFP de todas as amostras (Anexo D.2), validou-se o teste pela equação 2.1 e calculou-se a atividade antivírica dos agentes através da equação 2.2.

¹ As concentrações são diferentes devido ao ajuste efetuado com a densidade do composto

3.3.3 Determinação da atividade antivírica dos substratos sólidos

Neste ensaio experimental foram analisados os substratos sólidos rígidos e os substratos têxteis. Em relação aos primeiros foram estudados os laminados com 1,0%, 5,0% e 17,0% de agente X e de agente Y; o laminado controle; e o controle da experiência que não possui laminado nenhum. Quanto aos substratos sólidos flexíveis foram analisadas duas amostras, o algodão com a proteína Z e o algodão controle.

Os laminados foram cortados em quadrados de 2,5 cm² e previamente autoclavados. A única exceção foi o laminado com 17,0% de agente X, que foi esterilizado numa câmara de luz UV durante 30 min, uma vez que na autoclave o efeito da precipitação da prata foi visível, devido à concentração elevada deste composto no laminado. Em relação aos tecidos de algodão procedeu-se da mesma forma, sendo que todas as amostras foram esterilizadas através de luz UV, uma vez que a proteína desnatura a elevadas temperaturas.

Para os substratos sólidos rígidos foram realizados três ensaios, sendo que no primeiro se utilizou uma concentração inicial de fago de 2,4E+09 UFP/ml, no segundo de 1,8E+08 UFP/ml e no terceiro de 1,1E+08 UFP/ml. De notar que, por falta de tempo, não foi possível concentrar o fago MS2 em duas produções, de modo a partir de uma concentração inicial igual nos três ensaios, não havendo assim um triplicado nesta experiência. Nos substratos têxteis partiu-se de uma concentração inicial de fago de 4,0E+08 UFP/ml, para os três ensaios efetuados.

As amostras foram colocadas em tubos de Falcon para estarem em contacto com a solução de 20 ml contendo o fago MS2, como ilustrado na figura 3.2. Posteriormente, procedeu-se de forma idêntica ao ensaio com os agentes em meio líquido acima descrito.



Figura 3.2- Ensaio experimental para a determinação da atividade antivírica dos substratos sólidos

4. Resultados e discussão

Neste capítulo serão apresentados e discutidos todos os resultados obtidos durante a realização do presente projeto, desde os testes com a proteína Z e a β -ciclodextrina, à caracterização das superfícies sólidas funcionalizadas e à determinação da sua atividade antivírica.

4.1 Resultados dos testes de formação de complexo entre a proteína Z e a β -ciclodextrina

O método de Job monitoriza o sinal obtido resultante da formação do complexo entre duas moléculas e caso estas formem o tal complexo, é expectável que se verifique uma variação na concentração de complexo formado provocada pela variação das concentrações das espécies envolvidas. Isto é, o sinal aumenta até que a concentração do complexo formado seja máxima (ponto em que a estequiometria é determinada) e diminui de seguida devido ao desaparecimento do complexo causado pela redução da concentração de uma das espécies. A figura 4.1 ilustra um típico *Job plot* da formação do complexo Ropivacaína: β -ciclodextrina.

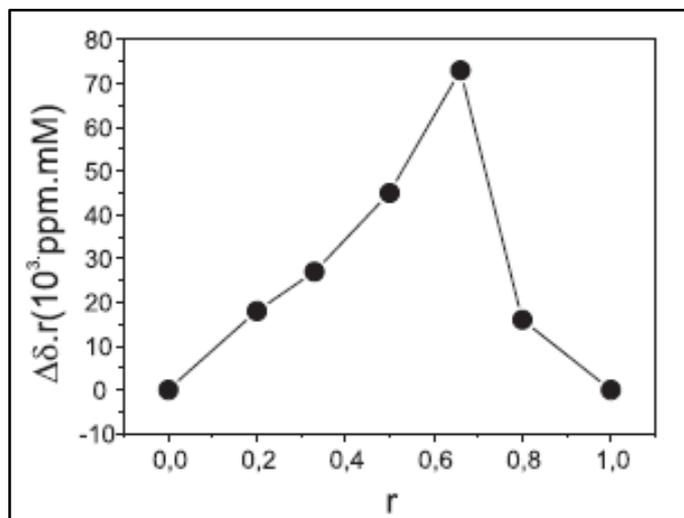


Figura 4.1- Variação do deslocamento químico dos hidrogénios H5 da β -ciclodextrina em diferentes frações molares do complexo ("*Job Plot*"), 25 °C, pH 5,5 (retirado de (Fraceto, *et al.* 2007))

A figura 4.2 ilustra o *Job plot* construído através da representação gráfica da absorvância a 294 nm registada para o complexo de inclusão agente Z: β -ciclodextrina em função da razão molar das duas espécies envolvidas na reação de complexação.

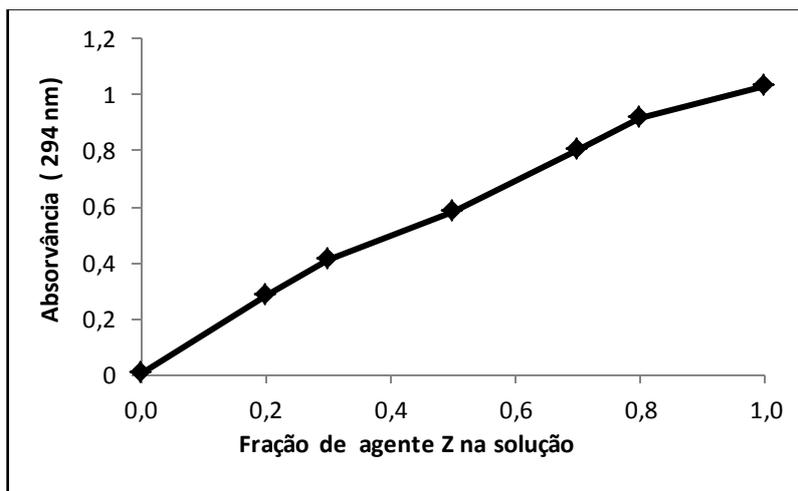


Figura 4.2- Job plot do complexo agente Z: β - ciclodextrina

Pela análise da figura não se verifica a tendência expectável que foi descrita acima, ou seja a absorbância aumenta sempre à medida que a concentração do agente Z aumenta, o que demonstra que não há formação de um complexo entre a proteína e a β -ciclodextrina quando a razão molar entre ambas é 1:1. Isto pode ser explicado pelo facto de o agente Z possuir uma massa molar cerca de 70 vezes superior à da ciclodextrina utilizada, não conseguindo esta última encapsular a proteína. Dado que estes resultados foram inconclusivos experimentou-se uma estratégia diferente para aferir a complexação da proteína à ciclodextrina (segundo teste).

Relativamente ao segundo teste de formação do complexo entre o agente Z e a β -ciclodextrina, é possível observar na tabela 4.1 as absorbâncias obtidas num comprimento de onda de 295 nm para as oito soluções preparadas.

Tabela 4.1- Absorvâncias obtidas, a 295 nm, para cada solução do segundo teste de formação de complexo entre o agente Z e a β -ciclodextrina

Solução	Concentração do agente Z (g/ml)	Concentração de β -ciclodextrina (g/ml)	Absorvância (295 nm)
1	1,2E-03	6,0E-03	0,4356
2	1,2E-03	12,0E-03	0,4543
3	1,2E-03	18,0E-03	0,4942
4	1,2E-03	21,6E-03	0,5048
5	1,2E-03	24,0E-03	0,5102
6	0,0E-03	6,0E-03	0,0535
7	0,0E-03	18,0E-03	0,0669
8	0,0E-03	24,0E-03	0,0748

Pela análise da tabela verifica-se que ocorre um aumento de absorvância desde 0,4356 até 0,5102 para as primeiras cinco soluções. Este ligeiro aumento da absorvância deve-se ao facto de a concentração de β -ciclodextrina não ser muito superior à da proteína Z, sendo no máximo 20 vezes superior na solução 5. No entanto, os resultados sugerem que poderá haver a formação do complexo entre as duas moléculas, uma vez que a ciclodextrina não absorve neste comprimento de onda, tal como se pode verificar pelas absorvâncias obtidas para as soluções 6, 7 e 8 em que apenas a ciclodextrina estava presente. Desta forma, o sinal pode aumentar devido à complexação e não pelo simples facto da concentração de β -ciclodextrina aumentar. Contudo, a utilização desta estratégia de encapsulação requer um estudo mais aprofundado e, tendo em conta os objetivos deste projeto, optou-se por não encapsular a proteína e apenas adsorvê-la ao substrato flexível, tal como descrito em 3.1.2.2. A concentração final de proteína obtida no tecido de algodão foi de 0,1% (Anexo B.3).

4.2 Resultados da caracterização dos substratos sólidos funcionalizados

No subcapítulo 4.2 são apresentados e discutidos os resultados obtidos pelas técnicas de FTIR-ATR, XPS e SEM-EDS dos substratos sólidos funcionalizados com os agentes X, Y e Z.

4.2.1 FTIR – ATR

4.2.1.1 Substrato sólido rígido funcionalizado

A análise qualitativa dos laminados com o agente Y por FTIR- ATR permitiu adquirir os espectros vibracionais das seguintes amostras: resina melamínica (cor rosa), agente Y (cor verde), folha W sem nenhuma impregnação (cor azul), folha W controlo (cor vermelha), folhas W com 1,0%, 5,0% ou 17,0% de agente Y (cor cinza), laminados com 1,0%, 5,0% ou 17,0% de agente Y (cor roxa), e do laminado controlo (cor amarelo torrado).

Para cada amostra com 1,0%, 5,0% e 17,0% de agente Y foram construídos dois gráficos, um referente às folhas W impregnadas e outro aos laminados. A discussão destes gráficos refere-se apenas à presença de dois compostos, nomeadamente a resina melamínica e o agente Y.

A próxima figura refere-se à amostra da folha W funcionalizada com 17,0% de agente Y.

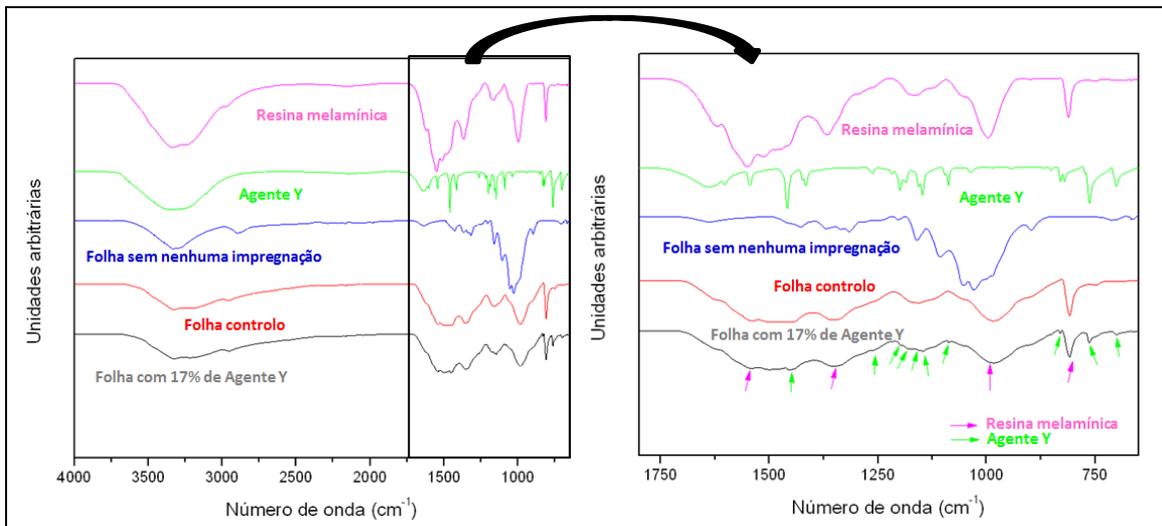


Figura 4.3- Espectros de FTIR- ATR da folha W funcionalizada com 17,0% de agente Y

Analisando a figura 4.3 pode verificar-se a presença das bandas características da resina melamínica, identificadas com a seta rosa no espetro. A primeira banda surge a 1550 cm^{-1} e diz respeito às vibrações de alongamento do anel de triazina; a segunda e a terceira banda, que surgem a 1367 cm^{-1} e 996 cm^{-1} , respetivamente, correspondem à vibração de alongamento C-O; e a última, nomeadamente a 811 cm^{-1} ,

corresponde de novo às vibrações de alongamento do anel de triazina (Socrates 2001; Batista 2004). Como seria de esperar, estas bandas são também visíveis no espectro infravermelho da folha W controlo, ao contrário do espectro da folha W sem nenhuma impregnação.

Relativamente ao agente Y, foi possível observar as bandas que evidenciam a sua presença na folha W impregnada (17,0% de agente Y). A primeira surge a 1459 cm^{-1} e corresponde à vibração de alongamento da ligação C=C do anel aromático; as bandas que surgem a 1262 cm^{-1} , 1198 cm^{-1} , 1184 cm^{-1} , 1155 cm^{-1} , 1146 cm^{-1} , 1088 cm^{-1} e a 830 cm^{-1} dizem respeito à vibração de alongamento da ligação C-N no anel aromático; e a nona e a décima banda surgem a 763 cm^{-1} e 701 cm^{-1} , respetivamente, e correspondem à vibração de alongamento C-S da ligação C-S no agente (Socrates 2001). Assim, pode-se concluir que apenas se verificou a presença do agente Y na folha W impregnada com 17,0% deste agente como seria de esperar.

A figura 4.4 compara entre si os espectros de infravermelho da folha W cuja terceira impregnação foi com 17,0% de agente Y, do laminado com 17,0% de agente Y e do laminado controlo.

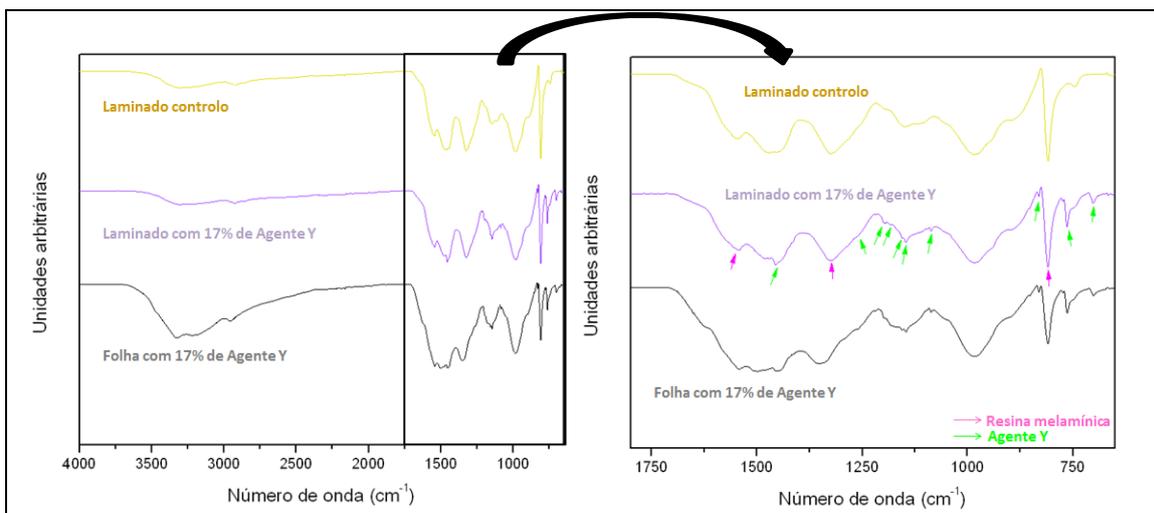


Figura 4.4- Espectros de FTIR- ATR do laminado funcionalizado com 17,0% de agente Y

Tal como observado para a folha W funcionalizada com 17,0% de agente Y, também no laminado com 17,0% deste agente é possível encontrar as quatro bandas características da resina melamínica e as dez bandas que indiciam a presença do agente, sendo que estas últimas não se verificam no laminado controlo como seria expectável (Figura 4.4).

A figura 4.5 ilustra os espectros vibracionais de FTIR- ATR obtidos para a análise da folha W impregnada com 5,0% de agente Y.

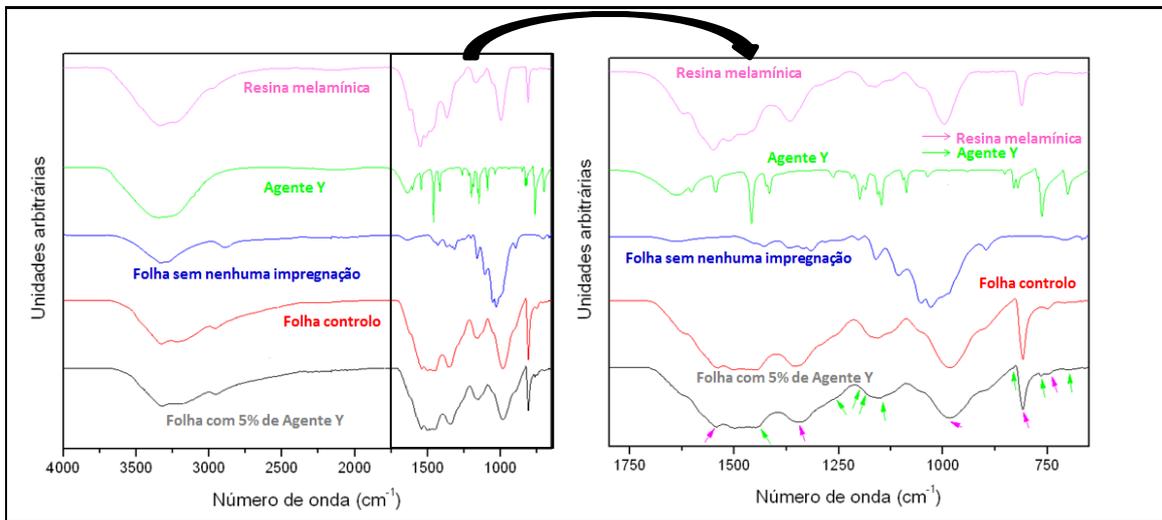


Figura 4.5- Espectros de FTIR- ATR da folha W funcionalizada com 5,0% de agente Y

Pela análise da figura 4.5 é possível verificar a existência de algumas diferenças nas bandas características do agente Y comparativamente com os gráficos anteriores. Ou seja, quase todas as bandas que surgem na folha W funcionalizada com 17,0% deste agente (figura 4.3) foram identificadas, à exceção das que surgem a 1155 e 1088 cm^{-1} . Isto pode dever-se ao facto de a quantidade de agente Y adicionada à solução ser inferior e portanto a deteção destas bandas ser mais difícil. Contudo, uma vez que o FTIR-ATR não permite uma análise quantitativa, estes resultados teriam que ser confirmados por outras técnicas para suportar inequivocamente esta conclusão. Um exemplo poderia ser a Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma Indutivo (ICP-MS) que ioniza as amostras com recurso a um plasma e recorre a um espectrómetro de massa para separar e quantificar os iões presentes na mesma.

Na figura 4.6 é possível comparar os espectros vibracionais da folha W cuja terceira impregnação foi com 5,0% de agente Y, do laminado com 5,0% de agente Y e do laminado controlo.

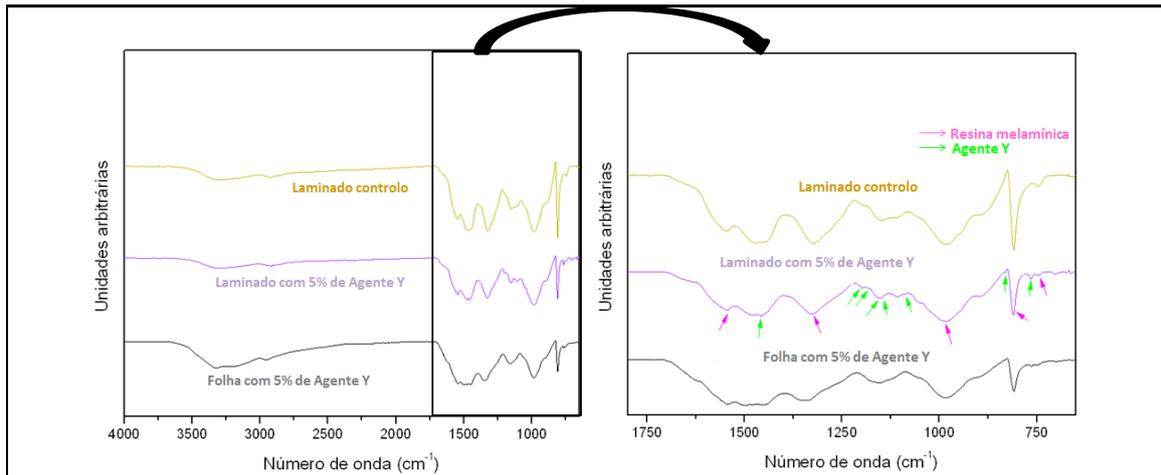


Figura 4.6- Espetros de FTIR- ATR do laminado funcionalizado com 5,0% de agente Y

As diferenças registadas nestes espetros em relação aos anteriores são igualmente nas bandas que indiciam a presença do agente Y. Neste caso verifica-se a presença das duas bandas que não foram anteriormente observadas (Figura 4.5), e verifica-se a ausência de duas bandas, nomeadamente a que surge a 1262 cm^{-1} e a que surge a 701 cm^{-1} no espetro infravermelho do laminado com 17,0% de agente Y (Figura 4.4). Isto poderá indicar que a folha W impregnada com 5,0% deste agente não é a mesma que foi prensada no laminado analisado, podendo existir uma variabilidade no material independentemente da correta (ou não) funcionalização do mesmo.

A figura 4.7 ilustra os espetros infravermelhos obtidos para a análise da folha W funcionalizada com 1,0% de agente Y.

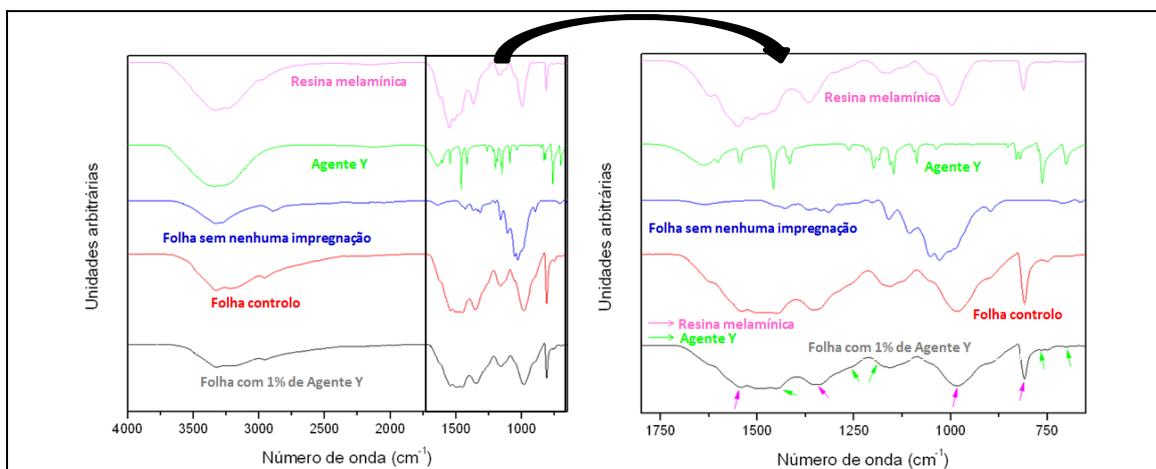


Figura 4.7- Espetros de FTIR- ATR da folha W funcionalizada com 1,0% de agente Y

Pela análise da figura 4.7 confirma-se a presença de cinco bandas características do agente Y apenas na folha W funcionalizada com 1,0% deste agente, nomeadamente as que surgem a 1459, 1262, 1184, 763 e 701 cm^{-1} .

Por fim, na figura 4.8 compara-se os espectros de infravermelho da folha W cuja terceira impregnação foi com 1,0% de agente Y, do laminado com 1,0% de agente Y e do laminado controlo.

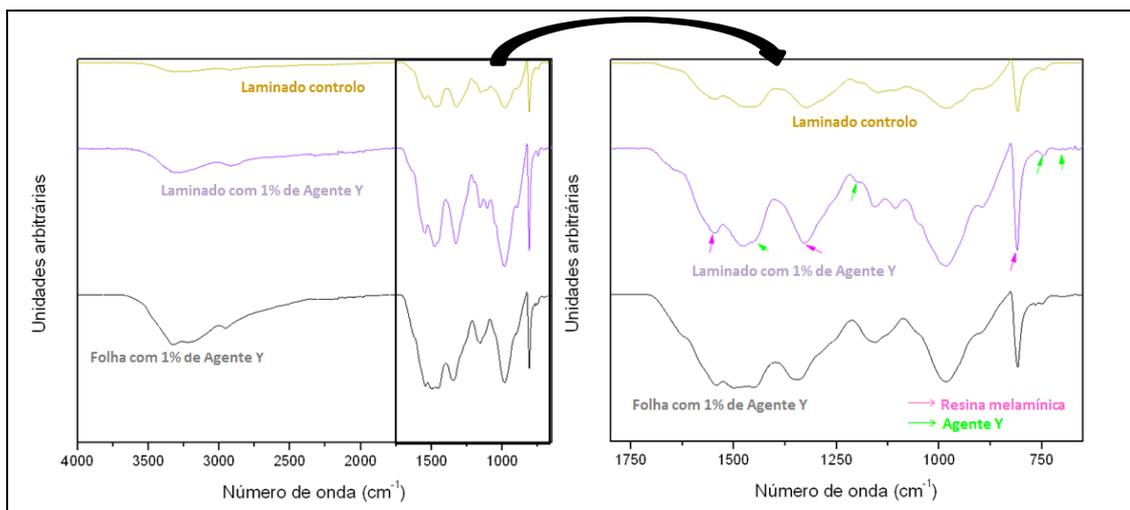


Figura 4.8- Espectros de FTIR-ATR do laminado funcionalizado com 1,0% de agente Y

Pela análise da figura 4.8, confirma-se a existência de quatro bandas que indicam a presença deste agente, nomeadamente a 1459, 1198, 763 e 701 cm^{-1} . Contudo, estas bandas não são as mesmas que foram detetadas no espectro anterior referente à folha W impregnada com 1,0% de agente Y. Novamente, esta folha poderá não ser a mesma que foi prensada no laminado analisado, podendo existir uma variabilidade no material como já foi referido anteriormente.

Por fim, conclui-se, após a caracterização qualitativa por FTIR-ATR, que todas as amostras funcionalizadas com o agente orgânico Y apresentam bandas que indicam a presença do mesmo, indicando portanto que a funcionalização ocorreu como esperado.

4.2.1.2 Substrato sólido flexível funcionalizado

Os tecidos de algodão impregnados com o agente Z foram também analisados por FTIR-ATR, tendo-se obtido três espectros vibracionais que se

encontram ilustrados na figura 4.9 (proteína Z- cor azul, tecido de algodão controlo- cor preta e tecido de algodão funcionalizado com 0,1% de agente Z - cor vermelha).

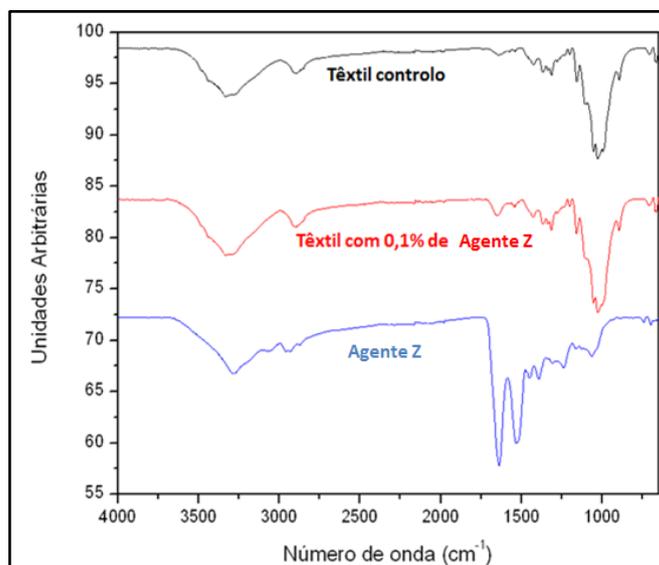


Figura 4.9- Espectros de FTIR- ATR do tecido de algodão com 0,1% de agente Z

Da análise da figura 4.9 é possível verificar que o espectro vibracional do algodão com o agente Z é muito semelhante ao do algodão controlo, sendo quase imperceptível a presença das bandas características da proteína no espectro do algodão com a mesma. Uma das possíveis causas é o facto de a concentração desta proteína no tecido ser demasiado baixa para ser detetada por esta técnica de caracterização. Desta forma, conclui-se que através do FTIR- ATR não se consegue detetar a presença da proteína no tecido de algodão funcionalizado.

4.2.2 XPS

4.2.2.1 Substrato sólido rígido funcionalizado

Através da técnica de XPS analisou-se o laminado controlo e os laminados funcionalizados com 17,0% de agente X e 17,0% de agente Y. As percentagens atómicas relativas dos elementos químicos presentes nos substratos sólidos rígidos encontram-se sumarizadas na tabela 4.2.

Tabela 4.2- Percentagens atômicas relativas dos elementos presentes nos substratos sólidos rígidos obtidas por XPS

Amostra	Percentagem atômica						
	C 1s	N 1s	O 1s	Si 2p	S 2p	Zn 2p3	Ag 3d5
Laminado controlo	86,99	3,43	8,23	1,35	-	-	-
Laminado com 17,0% de agente X	87,45	3,47	7,87	1,20	-	-	0,01
Laminado com 17,0% de agente Y	86,02	2,73	9,50	1,57	0,09	0,08	-

Após a funcionalização do substrato sólido rígido com 17,0% de agente X, evidencia-se a presença deste composto na superfície do substrato através da deteção do elemento prata (0,01%). O mesmo acontece com o laminado modificado com 17,0% de agente Y, para o qual se verifica a presença de enxofre (0,09%) e de zinco (0,08%), elementos químicos presentes na sua fórmula química. Estes resultados sugerem que a funcionalização dos substratos rígidos com os agentes em estudo foi bem-sucedida.

4.2.3 SEM- EDS

4.2.3.1 Substrato sólido rígido funcionalizado

Os laminados funcionalizados com 1,0% e 17,0% de agente X e de agente Y e o laminado controlo foram analisados por SEM-EDS. Na figura 4.10 estão ilustradas as micrografias obtidas para cinco amostras analisadas com uma resolução de 5 000 x.

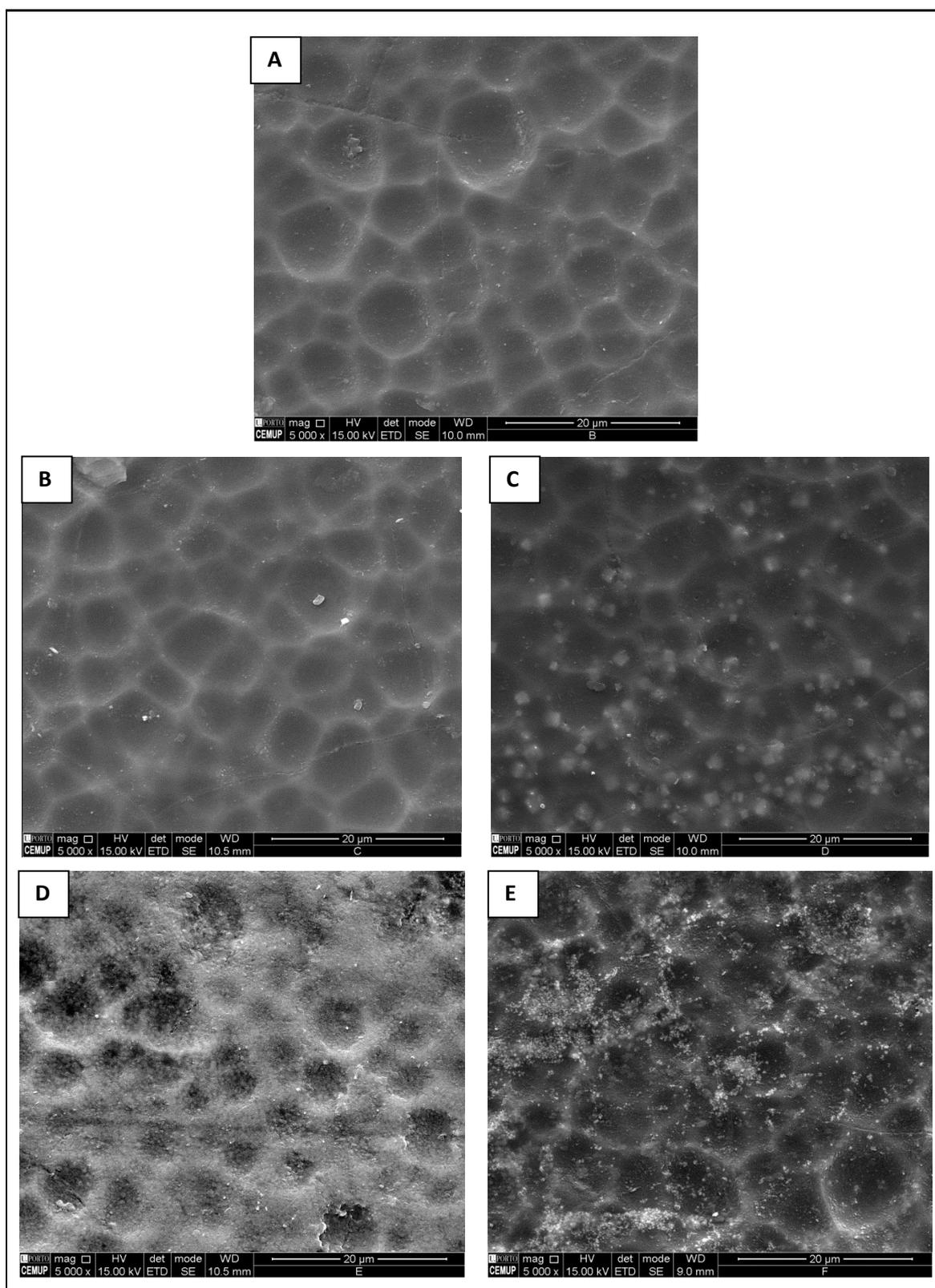


Figura 4.10- Micrografias obtidas por SEM do laminado controlo (A), do laminado com 1,0% de agente X (B) do laminado com 17,0% de agente X (C), do laminado com 1,0% de agente Y (D) e do laminado com 17,0% de agente Y (E)

Comparando as imagens de SEM dos laminados funcionalizados com a do laminado controlo, é possível verificar alterações na morfologia dos substratos sólidos rígidos após a funcionalização com os agentes antivíricos. As diferenças observadas na morfologia dos substratos sugerem a presença do agente X e do agente Y, sendo que estas são mais pronunciadas no caso das amostras funcionalizadas com 17,0% de agente.

Por sua vez, na figura 4.11 estão representados os espetros de EDS das superfícies sólidas rígidas funcionalizadas e do laminado controlo. Para cada amostra analisada é apresentada uma micrografia, com uma resolução de 500 x, da fração da mesma onde foi posteriormente realizada a análise por EDS.

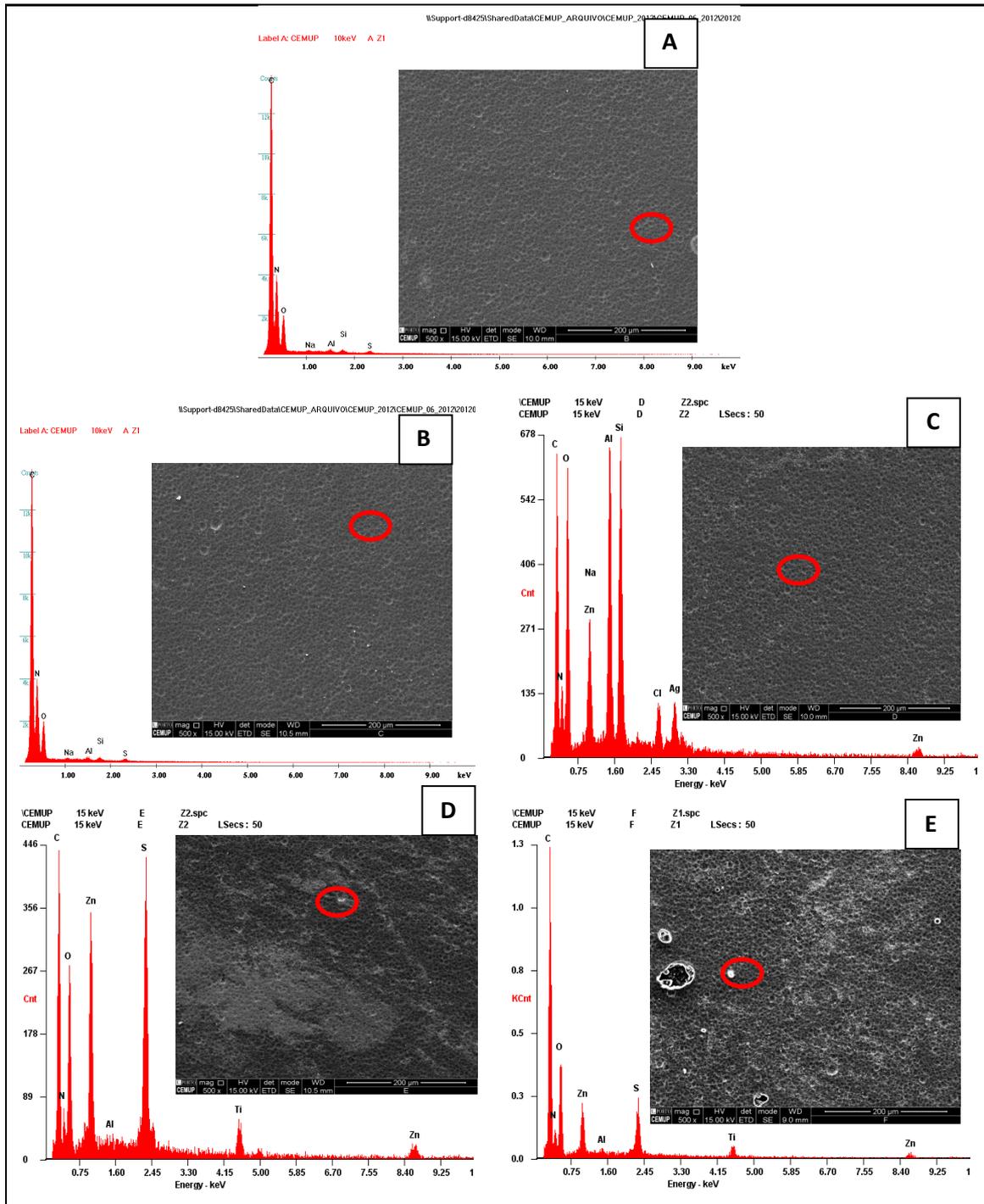


Figura 4.11- Espectros obtidos por EDS do laminado controle (A), do laminado com 1,0% de agente X (B) do laminado com 17,0% agente X (C), do laminado com 1,0% de agente Y (D) e do laminado com 17,0% agente Y (E)

Apesar de na micrografia obtida por SEM se verificarem ligeiras alterações na morfologia da superfície rígida funcionalizada com 1,0% de agente X, o espectro de EDS da mesma amostra é idêntico ao do laminado controle o que sugere que o agente X não está presente na superfície. Por sua vez, na amostra com 17,0% de agente X é

possível confirmar a presença de zinco e de prata, elementos característicos do agente usado. Nos espectros de EDS dos substratos rígidos funcionalizados com 1,0% e 17,0% de agente Y é possível observar-se picos do zinco e do enxofre, o que seria de esperar uma vez que estes elementos estão presentes na fórmula química do composto. Estes resultados permitem confirmar que pelo menos para a concentração mais elevada de agentes a funcionalização dos substratos foi bem-sucedida.

A presença de titânio nos espectros D e E pode ter-se devido a contaminações durante a funcionalização das amostras no laboratório ou à preparação das mesmas para a análise em questão.

4.2.3.2 Substrato sólido flexível funcionalizado

No que respeita ao substrato flexível, é possível observar na figura 4.12 as micrografias obtidas por SEM, com uma resolução de 1000 x, dos tecidos de algodão inicial (controlo) e funcionalizado com 0,1% de agente Z.

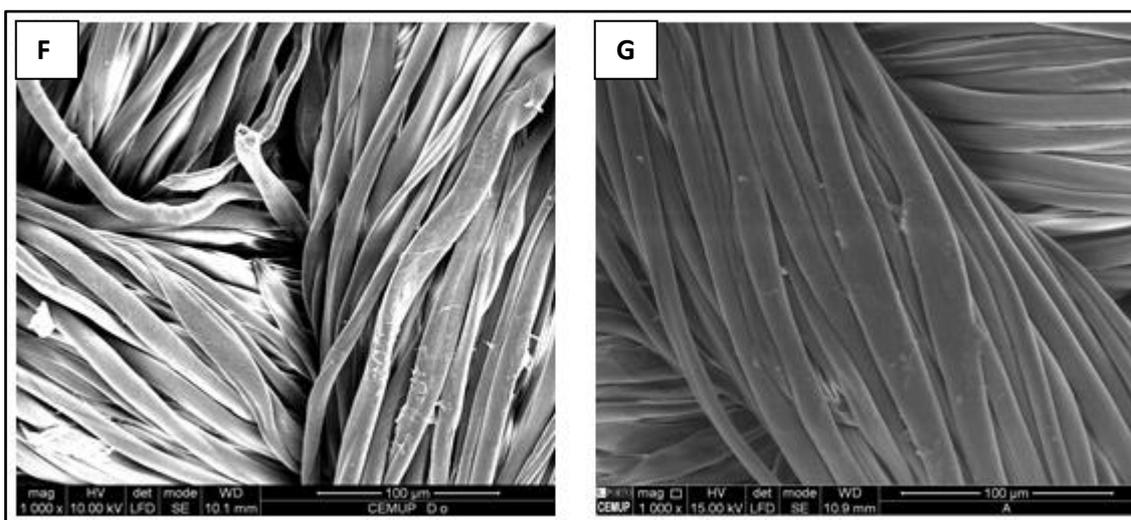


Figura 4.12- Micrografias obtidas por SEM do substrato têxtil controlo (F) e do substrato têxtil funcionalizado com 0,1% de agente Z (G)

A comparação das duas micrografias sugere que não ocorreu nenhuma modificação na morfologia da superfície do tecido têxtil após a funcionalização com o agente Z, confirmando-se os resultados previamente obtidos por FTIR- ATR.

A figura 4.13 ilustra os espectros de EDS obtidos para o tecido de algodão controlo e para o mesmo substrato funcionalizado com 0,1% de proteína.

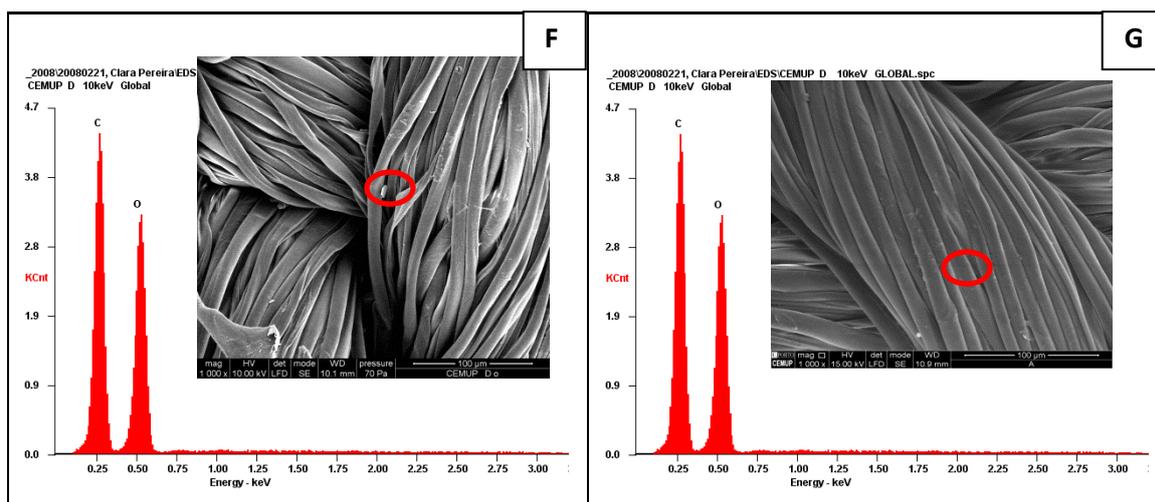


Figura 4.13- Espectros obtidos por EDS do substrato têxtil controlo (F) e do substrato têxtil funcionalizado com 0,1% de agente Z (G)

Como seria expectável também os espectros de EDS confirmam a ausência do agente Z na superfície do substrato têxtil após o procedimento de funcionalização. Estes resultados sugerem por um lado que não terá ocorrido a funcionalização desejada, ou eventualmente que a concentração de proteína à superfície é demasiado baixa para poder ser detetada pelas técnicas usadas.

4.3 Resultados da determinação da atividade antivírica

No presente subcapítulo são discutidos todos os resultados obtidos na determinação da atividade antivírica dos três agentes em meio líquido e dos substratos sólidos funcionalizados.

4.3.1 Atividade antivírica dos agentes em meio líquido

Numa etapa inicial e por forma a validar o teste de atividade antivírica implementado, foram calculadas as atividades antivíricas específicas das amostras controlo pela equação 2.1. Os resultados obtidos foram de -0,03 para o ensaio 1, de -0,42 para o ensaio 2 e de -1,14 para o ensaio 3. Estes resultados validam o método dado que apresentam valores que estão incluídos no intervalo $]-1,5; 0,0]$, o que indica a ausência de atividade antivírica da amostra controlo.

Posteriormente, para uma melhor análise dos resultados, foram construídos três gráficos que demonstram a atividade média de cada agente (agente livre) contra o bacteriófago MS2 ao longo do tempo e para cada concentração testada. Desta forma,

a figura 4.14 ilustra a comparação entre as médias das atividades antivíricas de cada concentração estudada do composto X ao longo de 24 h de ensaio.

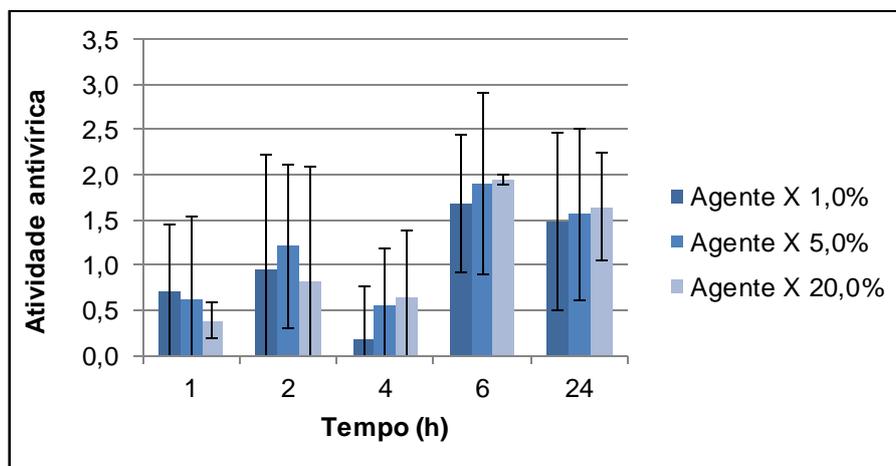


Figura 4.14- Atividade antivírica ao longo do tempo das amostras com diferentes concentrações de agente X

Analisando a figura 4.14 é possível verificar que a atividade antivírica do agente X aumenta até às 6 h e diminui passadas 24 h de teste, à exceção das 4 h em que decresce também. Porém, é de referir que estas diferenças não são estatisticamente significativas tendo em conta os elevados desvios observados nos resultados. Estes desvios podem estar associados a erros experimentais durante a realização das diluições decimais das amostras ou à tardia análise das mesmas o que pode danificar o fago. Adicionalmente, o método poderá não ter sensibilidade suficiente para permitir verificar diferenças claras entre diferentes ensaios.

Pela análise da figura 4.14, é possível ainda confirmar que a partir das 6 h os valores das atividades antivíricas são superiores a 1,5 e inferiores a 4,0, indicando uma atividade ligeira contra o bacteriófago MS2 (Tabela 2.8).

Os resultados obtidos são de um modo geral bastante animadores e podem ser justificados pelo facto de existir um mecanismo eficiente de libertação tridimensional de iões de prata, devido ao cristal de zeólito multifacetado (Figura 4.15), que se vão trocar com outros iões positivos, nomeadamente das proteínas do envelope do bacteriófago MS2, danificando-o. Desta forma, a capacidade do vírus infectar células *E. coli* W1485 é reduzida, uma vez que as moléculas do envelope que permitem a ligação do vírus à bactéria foram destruídas (Matsuura, *et al.* 1997; Prescott, Harley e Klein 1999). Este mecanismo é em tudo idêntico à forma de atuar do agente X contra as bactérias (Matsuura, *et al.* 1997).

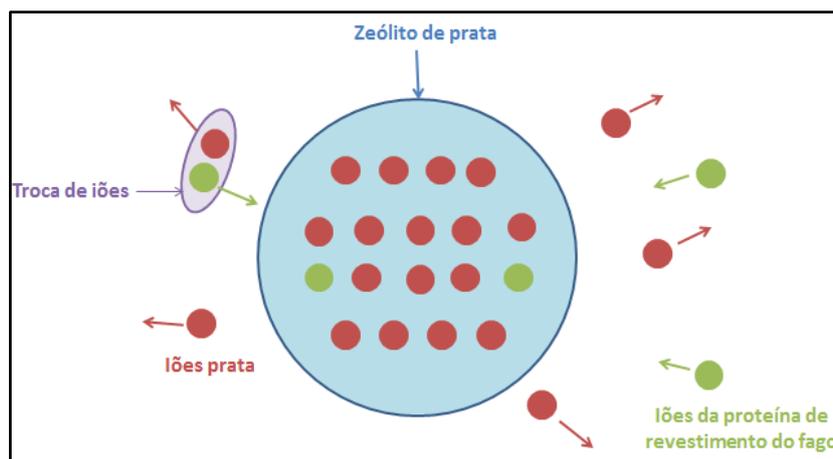


Figura 4.15- Esquema alusivo à troca de íons positivos entre o agente e o meio onde está presente o bacteriófago MS2

Outro possível mecanismo de ação antiviral do agente X pode ser a sua interação com o material genético, neste caso RNA, após danificar o envelope e a cápside do bacteriófago MS2 através do processo referido anteriormente. Esta explicação tem como base algumas investigações efetuadas com outros vírus. Um exemplo é o estudo realizado com o HBV, que demonstrou que as nanopartículas de prata interagem com o dsDNA do vírus e impediam a produção *in vitro* de RNA, que é utilizado pela retrotranscriptase para a formação de um RNA- DNA que é posteriormente convertido em DNA para um novo genoma viral (Lu, *et al.* 2008; Ferreira e Sousa 1998).

Outra observação que pode ser inferida da figura 4.14 é que, a partir das 4 h, a atividade antivírica da amostra com 20,0% de agente X é superior à das outras concentrações testadas, tal como seria de esperar uma vez que a concentração do agente no meio líquido é bastante superior. No entanto, nas primeiras 2 h, verifica-se precisamente o contrário, o que indica alguma variabilidade dos resultados até este instante.

Ainda assim, seria expectável que os resultados obtidos com o zeólito de prata fossem melhores, uma vez que na literatura este agente é reportado por possuir, *in vitro*, valores de atividade antivírica elevados contra diversos vírus (Lu, *et al.* 2008; Lara, *et al.* 2010). Para além disso, os desvios padrão associados aos resultados são bastante grandes em alguns casos, tal como foi referido anteriormente. Para além das possíveis justificações já adiantadas para esta variabilidade é também de realçar que se verificou alguma instabilidade no hospedeiro (*E. coli* W1485) ao longo de todo o trabalho experimental o que levou por vezes a tempos de experiência mais

prolongados que poderão ter também afetado o fago. Algumas das causas da instabilidade do hospedeiro foi a ocorrência de contaminações, uma vez que no laboratório onde se realizou a atividade experimental estavam a decorrer simultaneamente muitos trabalhos com outros microrganismos, mas também por causa da dificuldade da *E. coli* W1485 crescer passadas algumas gerações, não permitindo uma distribuição adequada na placa para a visualização das partículas fágicas.

Relativamente ao agente Y, é possível comparar as médias das atividades antivíricas obtidas ao longo do tempo para cada concentração testada (Figura 4.16).

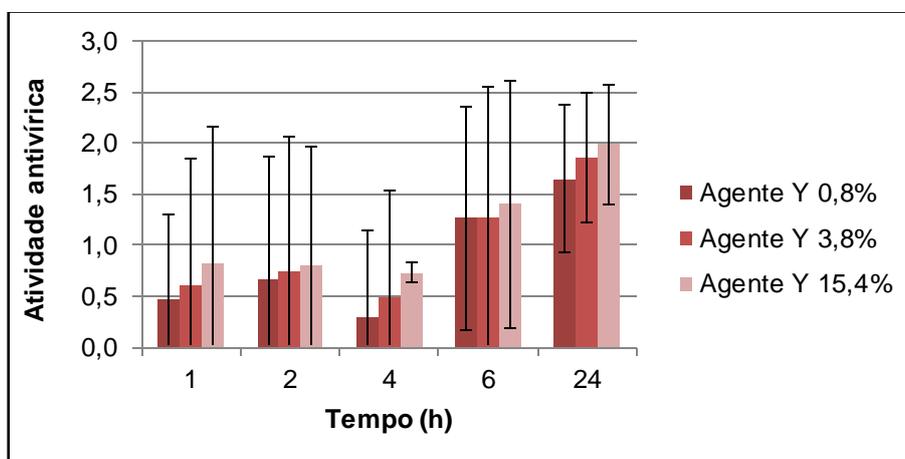


Figura 4.16- Atividade antivírica ao longo do tempo das amostras com diferentes concentrações de agente Y

Pela análise da figura anterior é possível observar que as atividades antivíricas do agente Y aumentam até às 24 h, à exceção das 4 h, o que pode ser justificado pelos possíveis erros mencionados na discussão do gráfico referente ao agente X. Também neste caso é de realçar a existência de desvios padrão muito elevados e de as diferenças observadas não terem significado estatístico.

As atividades contra o fago MS2 de todas as concentrações testadas são ligeiras apenas a partir das 24 h, à exceção da amostra com 15,4% de agente Y que apresenta um valor acima de 1,5 ($1,58 \pm 1,68$) logo após as 6 h de teste. Não se conhece bem qual o mecanismo pelo qual este composto orgânico exerce a sua atividade contra vírus. Contudo, pensa-se que o mecanismo de ação antiviral mais provável, no contexto da experiência, é a interação direta com o envelope do fago

MS2. Isto é, poderá ocorrer uma troca de íons Zn^{2+} com as proteínas do envelope viral, tal como acontece no caso do agente X (Korant, Kauer e Butterworth 1974).

Da análise da figura 4.16, é ainda possível verificar que a atividade contra o vírus MS2 da amostra com 15,4% de agente Y é superior às das outras amostras, tal como seria expectável. Contudo, existe uma inconstância nos resultados obtidos nas primeiras 2 h de ensaio, tal como ocorreu com os valores obtidos para o agente X.

Por fim, a figura 4.17 ilustra a relação entre as médias das atividades antivíricas das várias concentrações estudadas de agente Z.

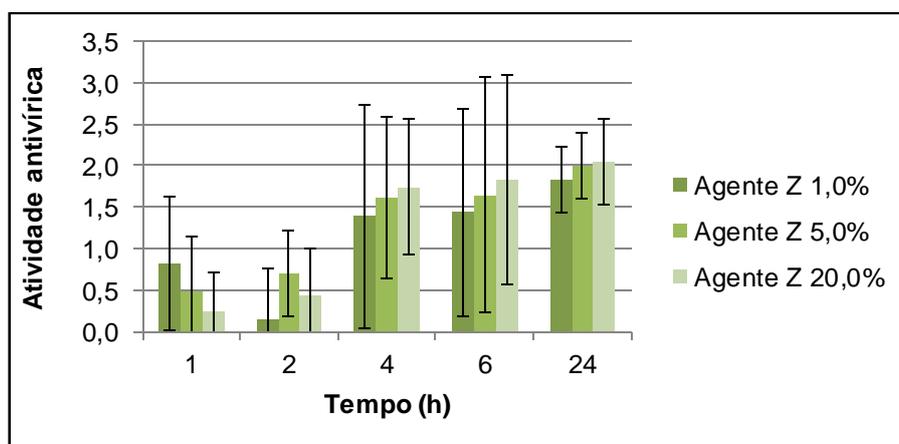


Figura 4.17- Atividade antivírica ao longo do tempo das amostras com diferentes concentrações de agente Z

Pela análise figura 4.17 é possível verificar que globalmente, os valores das atividades contra o fago MS2 aumentam até às 24 h, à exceção da amostra com 1,0% de agente Z, cuja atividade decresce após 2 h ($0,15 \pm 0,62$) e volta a subir de seguida. Novamente, este resultado pode ser justificado por possíveis erros cometidos durante a realização das diluições decimais ou pelo atraso na análise das amostras que pode afetar a capacidade de infeção do vírus.

Adicionalmente, observa-se que nas primeiras 4 h de teste as atividades antivíricas das amostras com 5,0% e 20,0% de proteína já apresentam valores acima de 1,5, indicando portanto uma atividade antivírica ligeira; e que a partir das 6 h, todos os resultados são superiores a esse valor de referência.

Um dos mecanismos de ação antiviral do agente Z é a possível interação direta com as proteínas presentes no envelope do fago MS2, que pode levar à fragilização do mesmo e diminuir a sua capacidade de infeção, uma vez que as moléculas de ligação deixam de reconhecer as estruturas recetoras da membrana celular (Figura

4.18). Esta provável explicação está descrita em alguns estudos realizados com outros vírus, como o HCV e o HIV. No primeiro, a proteína Z liga-se às proteínas E1 e E2 do envelope viral e no segundo, liga-se à glicoproteína gp 120 impedindo a adsorção do vírus na membrana celular (Florian, *et al.* 2009).

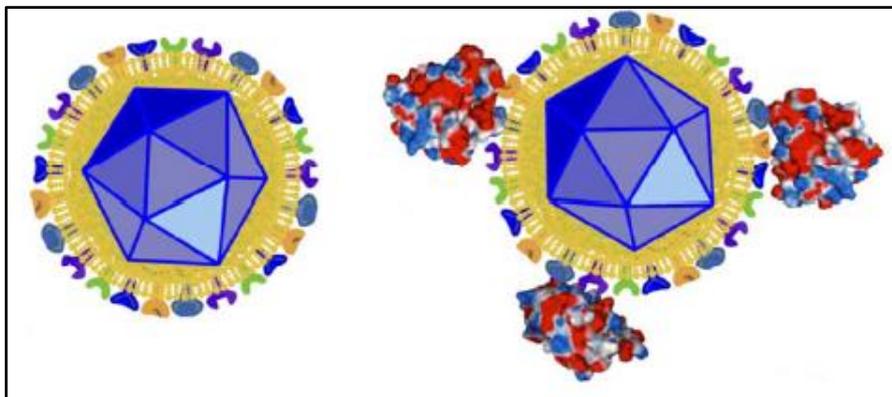


Figura 4.18- Ligação do agente Z às proteínas do envelope do vírus (retirado de (Sun e Jenssen 2012))

Outra razão possível para a ação antiviral do agente Z pode ser a sua ligação a um determinado elemento do DNA ou RNA, uma vez que já foi estudada essa sua capacidade com material genético de células, interferindo com a transcrição (He e Furmanski 1995). Neste caso em particular, o agente Z pode ligar-se ao RNA do bacteriófago MS2 após danificar o envelope e a cápside do mesmo (que protege o material genético), pelo processo referido acima para os compostos X e Y. É provável que esta hipótese esteja correta, uma vez que o pH do meio onde decorreu o ensaio encontrava-se a 7,5 e o ponto isoelétrico da proteína é cerca de 8,7, o que lhe permite trocar iões com o envelope do fago devido à carga elétrica adquirida (Levay e Viljoen 1995). No entanto, este mecanismo de ação antiviral referido foi muito pouco estudado até ao momento e pode ocorrer apenas com alguns vírus/bactérias, desconhecendo-se se o bacteriófago MS2 está incluído nesse grupo, dado que não existe nenhum estudo reportado sobre o efeito do agente Z no fago (Adlerova, Bartoskova e Faldyna 2008). Comparando as atividades contra o fago MS2 das várias concentrações testadas, verifica-se que a amostra com 20,0% de agente Z apresenta valores de atividade superiores às outras, a partir das 4 h, revelando igualmente alguma variabilidade nas primeiras 2 h de ensaio.

Por último, tal como para os outros agentes também no caso do agente Z se observou a existência de elevados desvios nos resultados, o que limita naturalmente as conclusões.

A tabela 4.3 compara as atividades dos três agentes para cada concentração estudada e após 24 h de ensaio experimental.

Tabela 4.3- Atividade antivírica dos agentes em meio líquido após 24 h de teste

Amostra		Atividade antivírica após 24 h
Agente X (%)	1,0	1,53 ± 0,91
	5,0	1,61 ± 0,88
	20,0	1,69 ± 0,52
Agente Y (%)	0,8	1,70 ± 0,65
	3,8	1,91 ± 0,65
	15,4	2,04 ± 0,53
Agente Z (%)	1,0	1,88 ± 0,33
	5,0	2,04 ± 0,33
	20,0	2,09 ± 0,45

Analisando apenas os resultados obtidos para as 24 h de contacto entre os agentes e o fago MS2 foi possível confirmar (Tabela 4.3) que o composto que demonstra ter uma maior capacidade de atuar contra o vírus é o agente Z, ou seja é aquele que para todas as concentrações testadas possui valores de atividade superiores. No entanto, as concentrações de agente Y usadas nestes ensaios são inferiores o que pode significar que numa mesma gama de concentrações este agente pode ter uma atividade antivírica mais pronunciada comparativamente com os outros dois. Verifica-se ainda que o agente X é o que apresenta valores de atividade antivírica mais baixos para todas as concentrações.

Os resultados obtidos não são os expectáveis, uma vez que o composto metálico X deveria demonstrar à partida uma atividade contra o bacteriófago MS2 superior à da proteína, tendo em conta os vários relatos na literatura relativamente ao seu excelente desempenho como agente antivírico. Esta atividade do agente Z poderá eventualmente dever-se a uma maior eficácia do seu mecanismo de ação antiviral, na medida em que pode ligar-se diretamente às proteínas do envelope do fago MS2, conseguindo inativá-lo eficientemente. Ainda assim realça-se a importância destes resultados, uma vez que o agente Z pode ser um bom substituto aos compostos metálicos para a funcionalização de têxteis, dadas as suas desvantagens descritas na tabela 2.1. Relativamente à sua incorporação em superfícies rígidas, será necessário

aferir quais os custos envolvidos no processo de modificação para analisar a viabilidade económica desta estratégia.

Contudo, os resultados obtidos para os agentes antivíricos na sua forma livre deveriam ser confirmados com mais ensaios experimentais.

4.3.2 Atividade antivírica dos substratos sólidos funcionalizados

4.3.2.1 Substrato sólido rígido funcionalizado

Por forma a validar o método de determinação da atividade antivírica em substratos sólidos funcionalizados, determinou-se as atividades antivíricas específicas da amostra controlo para os três ensaios realizados. Os resultados obtidos foram de -2,22 para o primeiro ensaio, de -1,46 para o segundo e de -0,21 para o terceiro, o que parece indicar que o método é válido apenas para os dois últimos ensaios. Contudo, o valor obtido para o ensaio 1 pode estar associado a erros e/ou a incidentes ocorridos no trabalho que poderão ter afetado o fago MS2, já referidos acima, e portanto seria necessário a realização de mais ensaios para comprovar a sua invalidação. Assim, os resultados do ensaio 1 serão discutidos neste subcapítulo.

Na tabela 4.4 estão descritos os valores obtidos para as atividades antivíricas das amostras funcionalizadas com os agentes X e Y e do laminado controlo, para os três ensaios realizados e após 24 h.

Tabela 4.4- Atividade antivírica, após 24 h, do laminado controlo e dos laminados funcionalizados com os agentes X e Y

Amostra	Atividade antivírica após 24 h		
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
Agente X (%)	1,0	1,69	0,43
	5,0	0,74	1,32
	17,0	1,72	0,90
Agente Y (%)	1,0	1,66	0,68
	5,0	2,25	0,69
	17,0	2,42	1,49
Laminado controlo	0,89	0,48	0,03

Analisando a tabela 4.4, verifica-se que os valores das atividades antivíricas determinados nos ensaios 2 e 3 foram inferiores a 1,5, ou seja os laminados não

possuem atividade contra o fago MS2 (tendo por referência os valores da tabela 2.8), mesmo confirmando a presença dos agentes nos substratos pelas técnicas qualitativas de FTIR- ATR, XPS e SEM-EDS. É contudo de realçar a amostra com 17,0% de agente Y para a qual se obteve um valor muito próximo da referência (1,49), no segundo ensaio experimental. Tendo em conta os estudos reportados na literatura seria expectável que os laminados de agente X apresentassem resultados de atividade antivírica elevados, o que na prática não se verificou [3]. Contudo, não se pode afirmar convictamente que as superfícies rígidas funcionalizadas não possuem atividade antivírica, dado que não foi possível obter, por falta de tempo, resultados de três réplicas em cada concentração inicial de fago MS2. De forma similar, também não se pode concluir sobre a influência da concentração inicial de vírus na atividade antivírica dos laminados, isto é se a variação da concentração inicial de fago MS2 tem um efeito nos valores das atividades antivíricas. Seriam necessários, desta forma, mais ensaios laboratoriais para a confirmação destes resultados.

Comparando os laminados com agente X e os laminados com agente Y não se verificam grandes diferenças nos resultados obtidos para os dois ensaios válidos. Por sua vez, ao confrontar-se os valores de atividade antivírica do ensaio 2 com os do 3, verificam-se algumas discrepâncias, como por exemplo na amostra com 5,0% de agente X, que no segundo ensaio experimental possui um valor de 1,32 e no terceiro de 0,28. Uma possível razão para estes desvios é o facto dos laminados não estarem funcionalizados de forma homogênea, ou seja como não se caracterizou os substratos rígidos através de uma técnica quantitativa desconhece-se a concentração do agente X ou do agente Y em cada ponto do laminado.

Adicionalmente, realça-se o facto dos agentes antivíricos poderem libertar-se das superfícies sólidas, uma vez que não estão ligados irreversivelmente e portanto pode-se estar a analisar amostras que efetivamente possuem concentrações de agente bem inferiores às que supostamente deveriam possuir. Nesse sentido, a análise dos resultados obtidos neste trabalho deverá ter em consideração estas ressalvas. É de realçar que este trabalho é bastante preliminar e que a maioria dos resultados carecem de validação por técnicas complementares tal como se sugere nas recomendações de trabalho futuro.

Analisando os resultados obtidos nos ensaios 2 e 3 para o laminado controlo verifica-se que este não possui igualmente atividade contra o bacteriófago MS2. Seria expectável que esta amostra apresentasse também uma atividade antivírica ligeira, devido à presença de resina melamínica que possui formaldeído, composto que já foi

alvo de alguns estudos devido à sua capacidade de atuar contra bactérias e alguns vírus (Kandelbauer e Widsten 2009; David, Ellaby e Taylor 1969).

Pela análise da tabela 4.4, verifica-se ainda que o ensaio 1 é o que apresenta melhores resultados, na medida em que todas as amostras apresentam uma ação ligeira contra o bacteriófago MS2, com exceção da amostra com 5,0% de agente X que apenas possui uma atividade de 0,74. Se ensaios posteriores permitissem a validação deste ensaio e obtivessem resultados semelhantes, estes seriam positivos porque uma atividade significativa (\log_{10} UFP > 4,0) revelava que a superfície rígida poderia ser agressiva para a saúde humana, pelo facto dos agentes se libertarem ao longo do tempo. Assim, o ideal será sempre que os laminados possuam uma atividade antivírica ligeira, até porque desconhece-se os efeitos secundários destes agentes na saúde humana.

Comparando os valores para as atividades antivíricas das superfícies rígidas com os dos agentes em meio líquido, verifica-se uma clara disparidade. Como seria de esperar, os resultados foram melhores em meio líquido, uma vez que o agente se encontra no seu estado livre. A capacidade dos agentes atuarem contra o fago MS2 pode ser afetada pela funcionalização dos substratos sólidos, uma vez que os grupos funcionais não estão tão disponíveis para atuar como nos agentes em meio líquido.

4.3.2.2 Substrato sólido flexível funcionalizado

O teste realizado para o substrato flexível foi considerado válido, depois da determinação das atividades antivíricas específicas das amostras controlo após 24 h, cujos resultados foram de -1,30 para o ensaio 1, de -1,19 para o ensaio 2 e de -1,15 para o ensaio 3.

O valor médio da atividade antivírica da amostra têxtil com 0,1% de agente Z após 24 h foi de $0,08 \pm 0,07$, o que sugere que o substrato funcionalizado não possui atividade contra o bacteriófago MS2. O facto de a concentração da proteína ser muito baixa no tecido de algodão poderá ser uma explicação para o resultado obtido, corroborada com os resultados negativos na caracterização do substrato funcionalizado através do FTIR- ATR e SEM- EDS. No entanto, outros ensaios deveriam ser realizados para a comprovação destes resultados.

5. Conclusões

Os resultados obtidos durante a realização do presente trabalho permitiram tirar algumas conclusões importantes.

Relativamente aos substratos sólidos funcionalizados, usando as técnicas de caracterização foi possível confirmar a presença dos agentes X e Y nos laminados, embora não tenha sido evidente a funcionalização do têxtil como o agente Z. Adicionalmente, os testes para aferir a formação de um complexo agente Z:ciclodextrina foram inconclusivos, o que sugere uma baixa “afinidade” entre as duas moléculas.

Na determinação da atividade dos agentes antivíricos na sua forma livre contra o fago MS2, verificou-se que a partir das 6 h os valores das atividades das concentrações testadas são, de um modo geral, superiores a 1,5, o que indica que possuem uma capacidade antivírica ligeira. As amostras com a concentração mais elevada de agente demonstraram genericamente possuir uma atividade superior. No entanto, é de realçar que se observou alguma variabilidade nos resultados obtidos para as primeiras 4 h de ensaio. Comparando os diferentes agentes verificou-se que o agente Z possuiu uma maior capacidade de atuar contra o vírus e que o agente X foi o composto que apresentou valores de atividade inferiores.

Os resultados observados com os agentes livres não puderam ser confirmados aquando da sua ligação aos substratos sólidos. Verificou-se que os laminados com os agentes X e Y e o laminado controlo não possuíam qualquer atividade antivírica contra o bacteriófago MS2. O mesmo foi observado no caso do têxtil com o agente Z adsorvido. Contudo, uma vez que estes resultados são preliminares não se pode afirmar que as superfícies sólidas funcionalizadas não possuem qualquer atividade contra vírus, carecendo os resultados de confirmação pela realização de réplicas.

Em suma, conclui-se que o método desenvolvido para a determinação da atividade antivírica apresentou desvios padrões elevados e uma maior instabilidade nos resultados obtidos nas primeiras horas de ensaio experimental, o que pode limitar a sua utilização como ferramenta de deteção de atividade antivírica.

6. Recomendações

Com o intuito de melhorar o desenvolvimento de substratos sólidos com capacidade antivírica apresentam-se algumas recomendações que podem ser importantes para trabalhos futuros.

A primeira consiste na utilização de métodos mais adequados para a incorporação dos agentes antivíricos nas superfícies sólidas, ou seja métodos que permitam tornar a ligação entre o agente e a superfície do material mais forte e estável, impedindo que o composto se liberte de forma fácil e rápida. No caso particular da proteína Z, será de explorar a possibilidade de a encapsular pois essa estratégia permite uma melhor inclusão no substrato têxtil e além disso permite controlar a sua libertação para o meio. Para o efeito, será essencial encontrar outro solvente compatível com a proteína (que não promova a sua desnaturação) e que permita simultaneamente aumentar a concentração relativa de β - ciclodextrina.

Relativamente à caracterização dos materiais, sugere-se a utilização de técnicas de análise quantitativa, como ICP-MS, que permitam aferir a uniformidade da funcionalização do substrato, bem como determinar a quantidade de agente que se liberta ao longo do tempo para o meio.

Nos ensaios de determinação da atividade antivírica dos substratos flexíveis e rígidos, será preferível estudar somente os tempos de amostragem 0h e 24 h, reduzindo assim possíveis erros de pipetagem nas diluições decimais das amostras e os atrasos verificados na análise das mesmas.

Referências bibliográficas

- Adlerova, L. , A. Bartoskova, e M. Faldyna. “Lactoferrin: a review.” *Veterinari Medicina* 53 (2008): 457–468.
- Andreas, J., M. C. Dalmolin, I. B. O. Junior, e I. O. Barcellos. “Aplicação de ciclodextrinas em processos têxteis.” *Química Nova* 33 (2010): 929-937.
- Batista, M. A. J. “Síntese de poliésteres e caracterização de revestimentos poliéster/melamina após degradação em intemperismo acelerado.” Dissertação de Mestrado em Engenharia de Materiais, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena/SP, Brasil, 2004.
- Bean , B., B. M. Moore, B. Sterner , L. R. Peterson , D. N. Gerding , e H. H. Jr. Balfour. “Survival of influenza viruses on environmental surfaces.” *The Journal of Infectious Diseases* 146 (1982): 47-51.
- Beirão, B. C. B. “Avaliação do perfil imune de aves empregando citometria de fluxo.” Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 2011.
- Borkow, G., e J. Gabbay. “Copper as a Biocidal Tool.” *Current Medicinal Chemistry* 12 (2005): 2163-2175.
- Bozja, J., J. Sherrill, S. Michielsen, e I. Stojilkovic. “Porphyrin-Based, Light-Activated Antimicrobial Materials.” *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 41 (2003): 2297–2303.
- Brennecke, M. “Disinfection Kinetics of Virus Aggregates of Bacteriophage MS2.” Master Thesis , Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, Switzerland, 2009.
- Brussaard, C. P.D., D. Marie, e G. Bratbak. “Flow cytometric detection of viruses.” *Journal of Virological Methods* 85 (2000): 175-182.
- Casseb, A. R. “Soroprevalência de anticorpos e padronização do teste ELISA Sanduíche Indireto para 19 tipos de arbovírus em herbívoros domésticos.” Tese de Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, Universidade Federal do Pará, Belém- Pará, Brasil, 2010.

- Chu, P.K., J.Y. Chen, L.P. Wang, e N. Huang. "Plasma-surface modification of biomaterials." *Materials Science and Engineering R* 36 (2002): 143-206.
- Costa, J. C., e A. A. Machado. "Métodos laboratoriais para o diagnóstico da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)." *Medicina, Ribeirão Preto* 32 (1999): 138-146.
- Cunha, L. A. C. G. "Estudo dos mecanismos de degradação em revestimentos PVD baseados em nitretos metálicos no processamento de materiais plásticos." Dissertação de Doutorado em Ciências - Área de conhecimento em Física, Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2000.
- Dantas, T. V. M. "Desenvolvimento e padronização de ELISA indireto para diagnóstico de Maedi-Visna vírus em ovinos." Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Brasil, 2004.
- David, W.A.L. , S. Ellaby, e G. Taylor. "Formaldehyde as an antiviral agent against a granulosis virus of *Pieris brassicae*." *Journal of Invertebrate Pathology* 14 (1969): 96–101.
- Drees, K. P., M. Abbaszadegan, e R. M. Maier. "Comparative electrochemical inactivation of bacteria and bacteriophage." *Water Research* 37 (2003): 2291–2300.
- Elechiguerra, J.L., J.L. Burt, J.R. Morones, A. Camacho-Bragado, X. Gao, H.H. Lara, e M.J. Yacaman. "Interaction of silver nanoparticles with HIV-1." *Journal of Nanobiotechnology* 3 (2005): 6.
- Ferreira, W. F. C., e J. C. F. Sousa. *Microbiologia*. Vol. 1. LIDEL, 1998.
- Florian, P. E. , M. Trif, R. W. Evans, e A. Roseanu. "An overview on the antiviral activity of Lactoferrin." *Journal of Biochemistry* 46 (2009): 187–197.
- Fraceto, L. F., M.M. Gonçalves, C.M. Moraes, D. R. Araújo, L. Zanella, E. Paula, e T.A. Pertinhez. "Caracterização do complexo de inclusão Ropivacaína:β-ciclodextrina." *Química Nova* 30 (2007): 1203-1207.
- Galdiero, S., A. Falanga, M. Vitiello, M. Cantisani, V. Marra, e M. Galdiero. "Silver Nanoparticles as Potential Antiviral Agents." *Molecules* 16 (2011): 8894-8918.

- Gerhardts, A., H. Mucha, e D. Höfer. "Testing linen disinfection procedures in practice with phage-charged-bioindicators." *International Journal of Health Care Quality Assurance* 25 (2012): 519 - 531.
- Harper, D. "Chapter 7- Beneficial Use of Viruses." In *Viruses: Biology, Applications, and Control*, 163-184. GARLAND SCIENCE, 2011.
- He, J., e P. Furmanski. "Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA." *Nature* 373 (1995): 721-724.
- Hohenstein Laboratories. "Teste Report No. 10.8.3-0006 Part 2." Internal Report, Germany, 2010.
- Kandelbauer, A., e P. Widsten. "Antibacterial melamine resin surfaces for wood-based furniture and flooring." *Progress in Organic Coatings* 65 (2009): 305-313.
- Korant, B. D. , J. C. Kauer, e B. E. Butterworth. "Zinc ions inhibit replication of rhinoviruses." *Nature* 248 (1974): 588 - 590.
- Kuzmanovic, D. A. , I. Elashvili, C. Wick, C. O'Connell, e S. Krueger. "Bacteriophage MS2: Molecular Weight and Spatial Distribution of the Protein and RNA Components by Small-Angle Neutron Scattering and Virus Counting." *Structure* 11 (2003): 1339–1348.
- Länge, K., B. E. Rapp, e M. Rapp. "Surface acoustic wave biosensors: a review." *ANAL BIOANAL CHEM* 391 (2008): 1509–1519.
- Lara, H. H., N. V. Ayala-Nuñez, L. Ixtepan-Turrent, e C. Rodriguez-Padilla. "Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1." *Journal of Nanobiotechnology* 8 (2010): 1.
- Levay, P.F., e M. Viljoen. "Lactoferrin: a general review." *Haematologica* 80 (1995): 252-267.
- Lim, S. H., e S. M. Hudson. "Application of a fiber-reactive chitosan derivative to cotton fabric." *Carbohydrate Polymers* 56 (2004): 227-234.
- Lopes, A. C. T. C. "Desenvolvimento de compósitos poliméricos baseados em zeólitos." Dissertação de Mestrado em Física (área de especialização em Ensino), Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2009.

Lu, L., R. W. Sun, R. Chen, C. K. Hui, C. M. Ho, J. M. Luk, G. K. Lau, e C. M. Che. "Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication." *Antiviral Therapy* 13 (2008): 253-262.

Matsuura, T., Y. Abe, Y. Sato, K. Okamoto, M. Ueshige, e Y. Akagawa. "Prolonged antimicrobial effect of tissue conditioners containing silver-zeolite." *Journal of Dentistry* 25 (1997): 373-377.

Monteiro, A.S.S. "Incorporação de argilas e nanopartículas sílica em substratos têxteis." Tese de Mestrado em Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2011.

Oliveira, T. M. S. "PCR em tempo real: métodos e aplicações." Dissertação de Mestrado em Toxicologia e Ecotoxicologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal, 2010.

Prescott, L. M., J. P. Harley, e D. A. Klein. *Microbiology*. 4ª. Wm. C. Brown Publishers, 1999.

Ravishankar, R. V., e B. A. Jamuna. "Nanoparticles and their potential application as antimicrobials." In *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, de Formatex Research Center, 197-209. A. Méndez-Vilas, 2011.

Reichling, J., P. Schnitzler, U. Suschke, e R. Saller. "Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties – an Overview." *Forsch Komplementmed* 16 (2009): 79–90.

Rengasamy, S., E. Fisher, e R. E. Shaffer. "Evaluation of the survivability of MS2 viral aerosols deposited on filtering face piece respirator samples incorporating antimicrobial technologies." *American Journal of Infection Control* 38 (2010): 9-17.

Rossi, D., K.F. Devienne, e M.S.G. Raddi. "Influência de fluidos biológicos na sobrevivência de *Staphylococcus aureus* sobre diferentes superfícies secas." *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 29 (2008): 209-2012.

Shin, Y., D.I. Yoo, e J. Jang. "Molecular Weight Effect on Antimicrobial Activity of Chitosan Treated Cotton Fabrics." *Journal of Applied Polymer Science* 80 (2001): 2495–2501.

- Silva, J. J. B. “Desenvolvimento de biossensores eletroquímico e piezelétrico de DNA para diagnósticos clínicos.” Dissertação de Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 2004.
- Socrates, G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*. 3ª. John Wiley & Sons, Ltd, 2001.
- Soutinho, H. F. C. “Design Funcional de Vestuário Interior.” Dissertação de Mestrado em Design e Marketing, Universidade do Minhol, Braga, Portugal, 2006.
- Sun, H., e H. Jenssen. “Chapter 2: Milk Derived Peptides with Immune Stimulating Antiviral Properties.” In *Milk Protein, de Genetics and Molecular Biology Biochemistry*, 45-82. InTech, 2012.
- Ungureanu, C., e M. Ferdeş. “Antimicrobial activity of essential oils against four food-borne fungal strains.” *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science* 74 (2012): 87-98.
- Vieira, R. “Estudo da eficiência e durabilidade de diversos métodos de fixação de produtos antimicrobianos em fibras celulósicas.” Dissertação de Mestrado em Química Têxtil, Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2006.

Referências eletrônicas:

- [1] **CeNTI**. About CeNTI: Welcome to CeNTI.
http://www.centi.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=327&Itemid=137&lang=en. Consultado em 12 de dezembro de 2012.
- [2] **Informationsdienst Wissenschaft**. Press Release: Can contact with textiles spread herpes simplex? <https://idw-online.de/pages/en/news306381>. Consultado em 3 de fevereiro de 2013.
- [3] **Armstrong Medical**. Case Study: Proven reduction of the H1N1 influenza virus on BioCote-containing materials.
http://www.armstrongmedical.net/images/uploads/user_guides/H1N1_Virus_Case_Study. Consultado em 28 de março de 2013.

[4] **NCBI**. Crystal Structure of C-lobe of Bovine Lactoferrin Complexed With Ketorolac at 1.68 Å Resolution.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=103105>. Consultado em 3 de outubro de 2013.

[5] **NCBI**. MS2 Protein Capsidrna Complex.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=54838>. Consultado em 3 de outubro de 2013.

[6] **QIAGEN**. QuantiTect Virus Kits: For highly sensitive detection of viral RNA and/or DNA. <http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Assay-Technologies/Real-Time-PCR-and-RT-PCR-Reagents/QuantiTect-Virus-Kits>. Consultado em 8 de setembro de 2013.

[7] **ATCC**. *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers.

<https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/10798.aspx?slp=1>. Consultado em 15 de setembro de 2013.

[8] **ATCC**. MS2 bacteriophage. <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/15597-B1.aspx>. Consultado em 15 de setembro de 2013.

Anexos

Anexo A: Curvas de calibração da proteína Z

A.1- Curva de calibração da proteína Z em meio aquoso

A curva de calibração do agente Z, em meio aquoso, foi determinada através da leitura da absorvância de soluções obtidas a partir de uma solução mãe 0,006 g/ml de agente Z. A absorvância está compreendida entre 0,4 e 1,1 num comprimento de onda de 294 nm, como se pode observar pela figura A.1. O limite de detecção é de 0,0003 e o limite de quantificação de 0,0008.

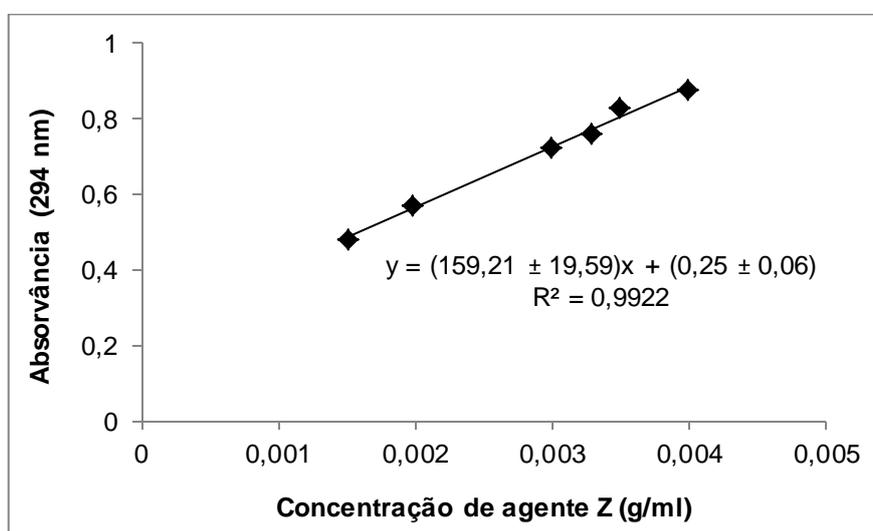


Figura A.1 -Curva de calibração do agente Z em meio aquoso

A.2- Curva de calibração do agente Z em meio tamponado

A curva de calibração agente Z, em meio tampão carbonato (pH=9), foi determinada através da leitura da absorvância de soluções obtidas a partir de uma solução mãe 0,006 g/ml de agente Z. A absorvância está compreendida entre 0,2 e 0,9 num comprimento de onda de 295 nm, como se pode observar pela figura A.2. O limite de detecção é de 0,0002 e o limite de quantificação de 0,0007.

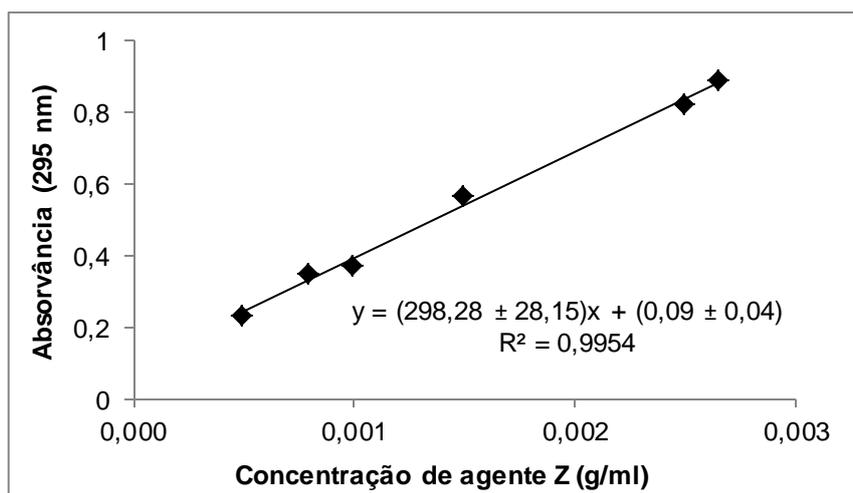


Figura A.2 - Curva de calibração do agente Z em tampão carbonato

Anexo B: Cálculos efetuados na funcionalização do tecido de algodão com o agente Z

B.1- Cálculos do teste *Job plot*

Para a construção do *Job plot*, foram preparadas sete soluções de 12 ml com concentrações diferentes de agente Z e β - ciclodextrina, feitas a partir de uma solução mãe de agente Z de 0,006 g/ml e de uma solução mãe de β - ciclodextrina de 0,0001 g/ml. De modo a determinar que volume de cada espécie seria colocado em cada solução, foram efetuados alguns cálculos através das equações que se enunciam a seguir.

Para calcular a massa de agente Z presente na solução 1 foi utilizada a seguinte equação, partindo-se de um valor inicial de concentração da proteína de 4,0E-03 g/ml.

$$m_L = C_{L0} \times V_t \quad \text{Equação B.1}$$

Onde:

m_L é a massa de agente Z na solução (g)

C_{L0} é a concentração inicial de agente Z na solução 1 (g/ml)

V_t é o volume total da solução (12 ml)

Na determinação do número de moles total em cada solução empregou-se a equação B.2.

$$N_t = \frac{m_L}{M_L} \quad \text{Equação B.2}$$

Onde:

N_t é o número de moles total (fixo) em cada solução (mol)

M_L é a massa molar do agente Z (80 000 g/mol)

A equação B.3 foi usada para o cálculo do número de moles do agente Z presente em cada uma das soluções.

$$N_L = N_t \times F_L \quad \text{Equação B.3}$$

Onde:

F_L é a fração arbitrada do agente Z na solução

N_L é o número de moles do agente Z presente na solução (mol)

Para determinar a massa de proteína presente nas soluções seguintes à solução 1, utilizou-se a seguinte equação.

$$m_L = N_L \times M_L \quad \text{Equação B.4}$$

O cálculo da concentração do agente Z nas soluções seguintes à solução 1 foi feito a partir da equação B.5.

$$C_L = \frac{m_L}{V_t} \quad \text{Equação B.5}$$

Onde:

C_L é a concentração do agente Z nas soluções, à exceção da solução 1 (g/ml)

Na determinação do volume de agente Z a adicionar a cada solução foi empregue a seguinte equação.

$$V_L = \frac{C_{ML} \times C_L}{V_t} \quad \text{Equação B.6}$$

Onde:

V_L é o volume de agente Z adicionado em cada solução (ml).

C_{ML} é a concentração do agente Z na solução mãe (g/ml).

Para calcular o número de moles de β - ciclodextrina presente em cada uma das soluções utilizou-se a equação B.7.

$$N_C = N_t \times (1 - F_L) \quad \text{Equação B.7}$$

Onde:

N_c é o número de moles de β - ciclodextrina presente na solução (mol)

Os restantes cálculos para a β - ciclodextrina foram feitos com equações semelhantes às B.4, B.5 e B.4, sendo a massa molar de β - ciclodextrina de 1135,01g/mol. Acrescentou-se água destilada até perfazer os 12 ml.

A tabela B.1 demonstra os resultados obtidos para cada variável através das equações acima mencionadas.

Tabela B.1 - Valores obtidos para o teste do *Job plot*

Solução (12 ml)	1	2	3	4	5	6	7
Fração molar de agente Z	1,0	0,8	0,7	0,5	0,3	0,2	0,0
Concentração de agente Z (g/mol)	4,0E-03	3,2E-03	2,8E-03	2,0E-03	1,2E-03	0,8E-03	0,0E-03
Massa de agente Z (g)	4,80E-02	3,84E-02	3,36E-02	2,40E-02	1,44E-02	0,96E-02	0,00E-02
Moles de agente Z (mol)	6,00E-07	4,80E-07	4,20E-07	3,00E-07	1,80E-07	1,20E-07	0,00E+00
Volume de agente Z (ml)	8,00	6,40	5,60	4,00	2,40	1,60	0,00
Fração molar de β - ciclodextrina	0,0	0,2	0,3	0,5	0,7	0,8	1,0
Concentração de β - ciclodextrina (g/mol)	0,0E-05	1,0E-05	2,0E-05	3,0E-05	4,0E-05	5,0E-05	6,0E-05
Massa de β - ciclodextrina (g)	0,00E+00	1,36E-04	2,04E-04	3,41E-04	4,77E-04	5,45E-04	6,81E-04
Moles de β - ciclodextrina (mol)	0	1,20E-07	1,80E-07	3,00E-07	4,20E-07	4,80E-07	6,00E-07
Volume de β - ciclodextrina (ml)	0,00	1,36	2,04	3,41	4,77	5,45	6,81
Volume de água destilada (ml)	4,00	4,24	4,36	4,59	4,83	4,95	5,19

B.2- Cálculos do segundo teste de averiguação da formação de um complexo de inclusão

No segundo teste, preparou-se oito soluções diferentes, feitas a partir de uma solução mãe de agente Z de 0,006 g/ml e de uma solução mãe de β - ciclodextrina de 0,030 g/ml. Para determinar que volume de cada espécie seria colocado em cada solução, foram realizados alguns cálculos através de uma equação semelhante à da B.6. Para perfazer os 12 ml utilizou-se tampão carbonato. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela B.2.

Tabela B.2 - Valores obtidos para o segundo teste de averiguação da formação de um complexo entre o agente Z e a β - ciclodextrina

Solução (12 ml)	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentração de agente Z (g/ml)	1,20E-03	1,20E-03	1,20E-03	1,20E-03	1,20E-03	0,0E-03	0,0E-03	0,0E-03
Volume de agente Z (ml)	2,39	2,39	2,39	2,39	2,39	0,00	0,00	0,00
Concentração de β- ciclodextrina (g/ml)	6,00E-03	1,20E-02	1,80E-02	2,16E-02	2,40E-02	6,00E-03	1,80E-02	2,40E-02
Volume de β- ciclodextrina (ml)	2,40	4,80	7,20	8,64	9,60	2,40	7,20	9,60
Volume de tampão carbonato (ml)	7,21	4,81	2,41	0,97	0,01	9,60	4,80	2,40

B.3- Percentagem de agente Z funcionalizada no tecido de algodão

Na tabela B.3 encontram-se apresentados os resultados obtidos para as pesagens feitas dos substratos têxteis controlo e funcionalizado com a proteína Z.

Tabela B.3 – Resultados obtidos para as pesagens dos substratos têxteis controlo e funcionalizado

	Têxtil controlo	Têxtil funcionalizado
Peso inicial (g)	0,9772 ± 0,0001	0,9981 ± 0,0001
	0,9777 ± 0,0001	0,9982 ± 0,0001
	0,9779 ± 0,0001	0,9980 ± 0,0001
Média (g)	0,9776 ± 0,0003	0,9981 ± 0,0003
Peso final (g)	0,9921 ± 0,0001	1,0403± 0,0001
	0,9920 ± 0,0001	1,0404± 0,0001
	0,9920 ± 0,0001	1,0403± 0,0001
Média (g)	0,9920 ± 0,0003	1,0403 ± 0,0003

Para determinar o peso por área do tecido de algodão controlo utilizou-se a seguinte equação.

$$A_c = \frac{P_{Cf}}{A_{ac}} \quad \text{Equação B. 8}$$

Onde:

A_c é o peso por área do têxtil controlo (g/cm^2)

P_{Cf} é a média do peso final do tecido de algodão controlo (g)

A_{ac} é a área do tecido de algodão controlo (61 cm^2)

O peso por área do tecido de algodão funcionalizado com o agente Z foi calculado pela equação B.9.

$$A_L = \frac{P_{Lf}}{A_{aL}} \quad \text{Equação B. 9}$$

Onde:

A_L é o peso por área do têxtil funcionalizado (g/cm^2)

P_{Lf} é a média do peso final do tecido de algodão funcionalizado (g)

A_{aL} é a área do tecido de algodão funcionalizado (63 cm²)

Para determinar a percentagem em massa de agente Z que ficou incorporada no tecido de algodão modificado aplicou-se a seguinte equação.

$$\% \text{ Agente Z} = \left(\frac{[(A_L - A_c) \times C_{Ls}] \times A_{aL}}{P_{Lf}} \right) \times 100\% \quad \text{Equação B. 10}$$

Onde:

C_{Ls} é a concentração de agente Z na solução em que foi mergulhado o tecido de algodão (g/ml)

P_{Lf} é a média do peso final do tecido de algodão funcionalizado com o agente Z (g)

Anexo C: Composição das soluções e meios de cultura utilizados nos ensaios da determinação da atividade antivírica

O meio utilizado para o crescimento da bactéria *E. coli* foi o LB da NZYTech e na tabela C.1 encontra-se a sua composição:

Tabela C.1 - Composição do meio LB (25 g/l)

Composto	Concentração (g/l)
Triptona	10
Cloreto de sódio	10
Extracto de levedura	5

A composição do meio LB ágar da NZYTech para a cultura em placa encontra-se na tabela C.2:

Tabela C.2 - Composição do meio LB ágar (40 g/l)

Composto	Concentração (g/l)
Triptona	10
Cloreto de sódio	10
Extracto de levedura	5
Ágar	15

O meio LB *top ágar* 0,7% para a cultura em placa é constituído por 25 g/l de meio LB e por 7 g/l de Ágar.

A composição do tampão SM é demonstrada na tabela C.3:

Tabela C.3 - Composição do Tampão SM

Composto	Concentração
Cloreto de sódio	5,8 g/l
Sulfato de magnésio heptahidratado	2 g/l
1M Tris- HCl, pH=7,5	50 ml/l

Anexo D: Cálculos efetuados na determinação da atividade antivírica

D.1- Volume de agente adicionado a cada solução

Para a determinação do volume de agente adicionado a cada solução foram necessários alguns cálculos preliminares realizados a partir de equações que se enunciam a seguir. A tabela D.1 demonstra alguns dados sobre os agentes antivíricos.

Tabela D.1 – Massa molar e densidade de cada agente

Agente	Massa molar (g/mol)	Densidade
Agente X	300,1	1,0
Agente Y	317,7	1,3
Agente Z	80 000,0	1,0

O cálculo da massa de agente presente no meio foi efetuado com recurso à equação D.1.

$$m_a = \frac{G \times A_q}{1000} \quad \text{Equação D.1}$$

Onde:

m_a é a massa de agente presente na solução (g)

G é a gramagem da resina (0,15 mg/cm²)

A_q é a área do laminado utilizada no ensaio (6,25 cm²)

Na determinação do número de moles de agente empregou-se a equação seguinte.

$$N_a = \frac{m_a}{M_a} \quad \text{Equação D.2}$$

Onde:

N_a é o número de moles de agente presente na solução (mol)

M_a é a massa molar de agente (g/mol)

A equação D.3 foi utilizada para calcular a concentração micromolar de agente presente no meio.

$$C_a = \left(\frac{N_a}{V_m} \right) \times 1E^{+06} \quad \text{Equação D.3}$$

Onde:

C_a é a concentração de agente presente na solução (μM)

V_m é o volume total do meio onde decorre o ensaio (20 ml)

Para determinar o volume de agente adicionado a cada solução empregou-se a seguinte equação.

$$V_a = \left(\frac{V_m \times C_a}{100} \right) \times 1000 \quad \text{Equação D.4}$$

Onde:

V_a é o volume de agente a adicionar a cada solução (μl)

Os resultados obtidos para o cálculo do volume a adicionar de cada agente encontram-se apresentados na tabela D.2. Previamente foram feitas soluções mãe de cada agente com uma concentração de $1E-04$ mol/l.

Tabela D.2 - Quantidade de agente adicionado a cada solução

Agente	Volume de agente determinado (μl)		
	Concentração baixa	Concentração média	Concentração alta
Agente X	31,24	156,21	624,77
Agente Y	23,44	117,20	468,75
Agente Z	0,12	0,60	2,34

D.2- Contagem de UFP

Na tabela D.3 demonstram-se os resultados obtidos após a contagem de UFP de cada amostra, ao longo das 24 h de ensaio experimental, no ensaio com os agentes em meio líquido.

Tabela D.3 - Log₁₀ (UFP) ao longo do tempo para cada amostra do ensaio em meio líquido

Ensaio 1						
Amostra	Log₁₀ (UFP) para cada tempo de amostragem					
	0h	1h	2h	4h	6h	24h
Agente X	1,0%	5,94	6,39	7,24	6,12	7,57
	5,0%	6,13	6,56	6,81	6,23	7,35
	20,0%	7,26	6,59	6,60	5,11	6,99
Agente Y	0,8%	6,09	6,76	6,72	7,00	7,13
	3,8%	5,52	6,56	6,20	7,04	5,97
	15,4%	5,15	6,68	7,22	7,34	6,50
Agente Z	1,0%	5,76	8,53	4,95	7,00	6,55
	5,0%	6,57	7,66	5,20	6,99	6,29
	20,0%	7,23	8,70	5,52	6,62	6,43
Controlo	7,99	7,51	8,81	7,88	7,00	7,95
Ensaio 2						
Amostra	Log₁₀ (UFP) para cada tempo de amostragem					
	0h	1h	2h	4h	6h	24h
Agente X	1,0%	7,54	7,57	8,10	5,34	5,18
	5,0%	8,36	7,08	7,76	5,08	4,95
	20,0%	7,65	7,95	7,76	5,75	5,36
Agente Y	0,8%	8,02	7,86	8,13	5,81	5,32
	3,8%	8,37	7,88	7,90	5,26	5,04
	15,4%	7,91	7,72	6,76	5,59	4,85
Agente Z	1,0%	7,61	8,17	7,20	5,69	5,26
	5,0%	8,19	7,52	6,20	5,23	5,04
	20,0%	8,19	7,54	5,56	5,15	4,90
Controlo	7,88	7,94	7,65	7,60	7,74	7,46

Ensaio 3

Amostra		Log₁₀ (UFP) para cada tempo de amostragem					
		0h	1h	2h	4h	6h	24h
Agente X	1,0%		7,88	7,64	7,40	5,90	5,11
	5,0%		7,15	7,18	7,04	5,36	5,32
	20,0%		7,40	7,46	6,95	5,71	5,03
Agente Y	0,8%		7,98	7,83	7,51	5,79	4,90
	3,8%		7,76	7,77	7,67	6,26	5,73
	15,4%		7,95	7,61	7,08	5,69	5,00
Agente Z	1,0%		7,64	7,28	6,90	5,40	5,02
	5,0%		7,23	7,18	6,99	5,23	4,99
	20,0%		7,34	6,90	6,95	5,11	4,85
Controlo		8,04	8,02	7,98	7,76	7,66	6,90

Na tabela D.4 apresentam-se os valores adquiridos após a contagem de UFP de cada amostra, ao longo das 24 h de ensaio experimental, no ensaio dos substratos rígidos funcionalizados.

Tabela D.4 - Log₁₀ (UFP) ao longo do tempo para cada amostra do ensaio com os laminados

Amostra		Log₁₀ (UFP) para cada tempo de amostragem					
		0h	1h	2h	4h	6h	24h
Laminado com agente X	1,0%		6,32	5,52	8,12	5,36	5,48
	5,0%		6,64	8,88	7,31	6,06	6,42
	17,0%		6,94	7,99	8,65	7,24	5,45
Laminado com agente Y	1,0%		6,32	8,07	6,12	5,64	5,51
	5,0%		6,50	8,11	8,67	5,78	4,91
	17,0%		6,94	8,39	8,17	5,57	4,74
Laminado controlo			6,56	7,17	7,30	7,25	6,28
Controlo		9,38	7,72	8,14	8,57	7,81	7,16

Ensaio 2							
Amostra		Log₁₀ (UFP) para cada tempo de amostragem					
		0h	1h	2h	4h	6h	24h
Laminado	1,0%		8,62	8,52	8,91	5,81	6,37
com	5,0%		9,89	7,08	7,04	6,38	5,48
agente X	17,0%		9,03	8,88	8,08	6,63	5,90
Laminado	1,0%		9,84	8,15	7,00	7,13	6,12
com	5,0%		9,57	7,85	6,75	6,86	6,11
agente Y	17,0%		9,69	7,54	8,40	7,32	5,31
Laminado controlo			8,62	8,76	8,28	7,18	6,32
Controlo		8,26	9,43	9,47	8,67	7,00	6,80

Ensaio 3							
Amostra		Log₁₀ (UFP) para cada tempo de amostragem					
		0h	1h	2h	4h	6h	24h
Laminado	1,0%		7,43	7,59	7,56	7,72	7,06
com	5,0%		7,26	5,00	7,20	7,26	7,56
agente X	17,0%		7,38	6,64	7,78	7,74	7,11
Laminado	1,0%		7,81	7,43	7,52	7,00	6,96
com	5,0%		7,91	7,63	7,48	7,22	7,43
agente Y	17,0%		7,37	7,45	7,56	7,29	7,65
Laminado controlo			7,40	7,93	8,05	8,00	7,80
Controlo		8,04	7,78	7,98	7,58	7,85	7,83

Os resultados obtidos após a contagem de UFP dos têxteis controlo e funcionalizado com o agente Z, ao longo das 24 h de ensaio experimental, encontram-se representados na tabela D.5.

Tabela D.5 - Log₁₀ (UFP) ao longo do tempo para cada amostra do ensaio com os substratos flexíveis

Ensaio 1							
Amostra		Log₁₀ (UFP) para cada tempo de amostragem					
		0h	1h	2h	4h	6h	24h
Têxtil com 0,1% de			8,58	8,43	8,39	7,38	7,37
agente Z							
Têxtil controlo		8,60	8,62	8,45	8,45	7,33	7,30

Ensaio 2

Amostra	Log₁₀ (UFP) para cada tempo de amostragem					
	0h	1h	2h	4h	6h	24h
Têxtil com 0,1% de agente Z		8,58	8,41	8,60	7,38	7,33
Têxtil controlo	8,60	8,61	8,46	8,56	7,47	7,41

Ensaio 3

Amostra	Log₁₀ (UFP) para cada tempo de amostragem					
	0h	1h	2h	4h	6h	24h
Têxtil com 0,1% de agente Z		8,60	8,43	8,32	7,47	7,41
Têxtil controlo	8,60	8,60	8,51	8,38	7,47	7,45