

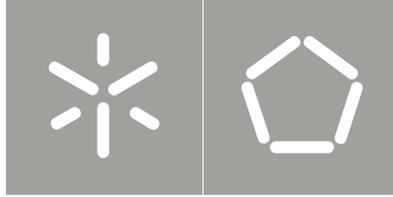


Bárbara Marques Vieira

Desenvolvimento de Materiais Têxteis com Propriedades Antimicrobianas Utilizando para o Efeito Nanopartículas de Ouro

Universidade do Minho
Escola de Engenharia





Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Bárbara Marques Vieira

Desenvolvimento de Materiais Têxteis com
Propriedades Antimicrobianas Utilizando para
o Efeito Nanopartículas de Ouro

Dissertação de Mestrado
Mestrado Integrado em Engenharia Têxtil

Trabalho efetuado sob a orientação de
Professor Doutor Andrea Zille (Universidade do Minho)
Doutora Maria Helena Pereira Vilaça (CITEVE)

Dezembro de 2021

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



**Atribuição-NãoComercial-SemDerivações
CC BY-NC-ND**

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Agradecimentos

O desenvolvimento e conclusão desta dissertação só se tornou possível devido à colaboração de diversas pessoas e entidades. Quero, desde já, expressar o meu sincero obrigado a todos que estiveram presentes e contribuíram, de alguma forma, para a conclusão desta etapa.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Departamento de Engenharia Têxtil da Universidade do Minho e ao Citeve, pelo acolhimento e pelas instalações. Acredito que não poderia ter escolhido melhor local para desenvolver a minha dissertação. Termino o estágio com uma sensação de agradecimento, por todo o apoio que me foi concedido, e de dever cumprido.

Ao meu orientador Professor Doutor Pedro Souto (*in memoriam*), não só por ter confiado nas minhas capacidades, mas sobretudo por todo o conhecimento transmitido. Foi um dos melhores professores presentes no meu percurso académico, que sempre incentivou os alunos a querer saber e a fazer mais.

Ao meu orientador Professor Doutor Andrea Zille, por me ter acolhido, ainda que a meio do ano letivo, por ter confiado nas minhas capacidades e neste projeto, e por todos os conhecimentos transmitidos.

À Doutora Helena Vilaça, a minha orientadora, pela dedicação, paciência, total disponibilidade e partilha de conhecimentos e ideias. Obrigada por ter tornado este projeto mais rico, e por ter acreditado em mim. À Doutora Carla Silva, por todo o apoio demonstrado ao longo do projeto, por sempre se prontificar a ajudar. Um enorme obrigado a ambas, pelo aliciente tema de dissertação, por me ajudarem a ultrapassar dificuldades, e por fomentarem em mim a paixão pela investigação.

Ao Centro de Investigação 2C2T, por sempre me acolherem tão bem. Um obrigado especial ao Doutor Jorge Padrão, que esteve sempre disponível não só para a realização de diversos ensaios, mas também para o esclarecimento de dúvidas. Obrigada pela partilha de ideias, que impulsionaram o desenvolvimento deste projeto. Um obrigado especial também ao Rui Fernandes, por estar sempre pronto a ajudar, independentemente da situação, e por todos os conselhos transmitidos.

Ao Jožef Stefan Institute (JSI) (Eslovénia), em especial aos doutores Marija Vukomanovic e Tomaz Lutman e à sua equipa pelo fornecimento das nanopartículas de ouro, e por realizarem alguns ensaios SEM-EDS e testes antibacterianos. Agradeço também à Ágota Kőrösi e Anna Hannauer da INNOWEAR-TEX Kft. (Hungria) pelo fornecimento das malhas para os ensaios de funcionalização.

Obrigada ainda à Fundação para a Ciência e a Tecnologia pelo financiamento do *projeto Plasmed – Bionanocomposite coatings with controllable antibacterial activity using atmospheric pressure plasma deposition* (PTDC/CTM-TEX/28295/2017), no âmbito do qual foram realizados os testes de atividade antibacteriana e antivírica.

Obrigada a todos os docentes e técnicos que estiveram presentes no meu percurso académico, por tornarem o curso mais estimulante.

Aos meus pais, pois sem eles nada disto seria possível. Obrigada por serem exigentes e por acreditarem sempre em mim, e por me tornarem no que sou hoje. À minha irmã, pela paciência e compreensão nos momentos menos bons. Ao meu namorado, pelo apoio incondicional, pela paciência, e por tornar os últimos 5 anos mais leves e bonitos, muito obrigada.

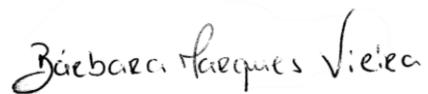
Aos meus amigos e colegas de curso, com os quais vivi esta aventura. Obrigada, não só pela partilha de ideias, motivação e atenção, mas também pelo companheirismo, pelos momentos de descontração e convívio.

A todos, muito obrigada.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho acadêmico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.



Bárbara Marques Vieira

Desenvolvimento de Materiais Têxteis com Propriedades Antimicrobianas Utilizando para o Efeito Nanopartículas de Ouro

Resumo

Os hospitais são locais onde o risco de infecção é maior, devido à concentração e variedade de microrganismos presentes nos mesmos, incluindo de variantes resistentes a antibióticos. Para além disso, o surto da doença por coronavírus - 2019 (COVID-19), causado pelo vírus denominado síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2), assim como a exposição dos profissionais de saúde e pacientes a este, levou a um considerável aumento nos casos de infecção nos hospitais. Isto, juntamente com o aumento exponencial da utilização de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) descartáveis durante a pandemia, mostrou a necessidade de uma atualização da indústria têxtil, de forma a produzir mais e melhores EPIs, que sejam mais seguros e sustentáveis, não apenas para os profissionais de saúde, mas também para os restantes cidadãos.

No presente trabalho, foi estudada a funcionalização de substratos têxteis à base de algodão, poliéster e misturas destes com nanopartículas de ouro e hidroxiapatite, com elevadas propriedades antimicrobianas. O propósito principal passou por entender quais as melhores condições para a funcionalização dos têxteis, de modo a obter elevado rendimento e uniformidade, assim como solidez à lavagem, até 20 ciclos. Foram analisados diversos fatores, entre eles, o pré-tratamento dos substratos têxteis, processos de funcionalização, agentes de ligação, pH, tempo, temperatura, auxiliares têxteis, entre outros. Aplicou-se também a metodologia *Design of Experiments* (DoE), que permite otimizar processos (neste caso, para prever qual era a melhor relação entre tempo e temperatura), com uma limitada quantidade de ensaios. Neste ponto, foram avaliadas a atividade antimicrobiana dos substratos funcionalizados, bem como a sua durabilidade à lavagem. A avaliação da quantidade de nanopartículas ligadas ao substrato foi feita por meio de análises da Espectrometria UV-Vis, Microscopia Eletrónica de Varrimento acoplada com espectroscopia de raios X por dispersão de energia (SEM-EDS) e Espectroscopia de Absorção Atómica (AAS).

O processo de funcionalização que se revelou mais eficiente foi por esgotamento. Por sua vez, o uso de surfactantes conduziu a melhorias significativas quanto à dispersão das nanopartículas e a uniformidade dos têxteis acabados. Foi possível obter substratos têxteis com um bom rendimento de nanopartículas ligadas e com boa solidez à lavagem. Os substratos mostraram ainda boa atividade antibacteriana, inclusive, após 20 ciclos de lavagem.

Palavras-chave: Antimicrobiano; Desenho de Experiências; funcionalização; nanopartículas; ouro.

Abstract

Hospitals are places where the risk of infection is higher, due to the concentration and variety of microorganisms present in them, including antibiotic resistant strains. Added to this, the outbreak of coronavirus disease 2019 (COVID-19), caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), and the exposure of healthcare workers and patients to this new virus, led to a great increase of infection cases in the hospitals. This, summed to the huge amounts of disposable Personal Protection Equipment (PPEs) used during the pandemic, clearly called for an update from the textile industry, to produce more and better PPE, including safer and more sustainable ones, not only for the healthcare workers, but also for the remaining citizens.

This work focused on the functionalization of textile fabrics based on cotton, polyester and their combination with gold-hydroxyapatite nanoparticles (NPs), with high antimicrobial properties and. The main goal of this work was to find the most suitable conditions for the textile functionalization, to obtain high yields and uniformity, and washing fastness up to 20 washing cycles. Many factors were analysed, such as textile substrates pre-treatments, functionalization processes, crosslinking agents, pH, time and temperature, textile auxiliaries, etc. Design of Experiments (DoE) was applied, as this allows to optimize the process (in this case to predict the most suitable relation time *vs.* temperature) with a limited number of experiments. The functionalized substrates' antimicrobial activity and its durability to washing was evaluated. The assessment of the NPs bonded to the substrates was done by UV-vis analysis, Scanning Electron Microscopy coupled with energy-dispersive X-ray Spectrometry (SEM-EDS) and Atomic Absorption Spectroscopy (AAS).

The results showed that the best functionalization process was by exhaustion, and the use of surfactants highly improved the dispersion of the NPs and the uniformity of finished textiles. It was possible to obtain textile substrates with a good yield of linked NPs and with a good washing fastness. The textile substrates showed good antimicrobial activity, even after 20 washing cycles.

Keywords: Antimicrobial; Design of Experiments; functionalization; gold; nanoparticles.

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo	v
Abstract	vi
Índice de Figuras.....	x
Índice de Tabelas.....	xv
Índice de Gráficos	xvi
Lista de Abreviaturas.....	xix
1. Introdução	1
1.1. Objetivos	2
2. Enquadramento Teórico	4
2.1. Microrganismos (vírus, bactérias e fungos).....	4
2.2. Acabamentos Funcionais	5
2.3. Acabamentos Antimicrobianos	5
2.3.1. Nanopartículas metálicas e de óxidos de metal.....	6
2.3.2. Nanopartículas de Ouro	7
2.4. Aplicação de Nanopartículas em Têxteis.....	10
2.4.1. Pré-Tratamentos	11
2.4.2. Funcionalização dos Têxteis	17
2.4.3. Caracterização Físico-química e Morfológica dos Têxteis Funcionalizados	21
2.4.4. Métodos Para Avaliar a Atividade Antimicrobiana	23
3. Materiais e Métodos	25
3.1. Substratos usados	25
3.2. Pré-tratamentos dos substratos.....	27
3.3. Nanopartículas de ouro.....	29
3.4. Funcionalização dos substratos.....	29

3.4.1.	Impregnação.....	30
3.4.2.	Esgotamento.....	33
3.4.3.	<i>Design of Experiments</i> (DoE)	39
3.5.	Avaliação da Funcionalização dos substratos.....	41
3.5.1.	Lavagens	41
3.5.2.	Análise UV-Vis	41
3.5.3.	Absorção Atômica	41
3.5.4.	Microscopias SEM, TEM e Espetroscopia EDX	42
3.5.6.	Solidez ao Suor	43
3.5.7.	Avaliação da Atividade Antimicrobiana	43
4.	Análise e Discussão de Resultados	50
4.1.	Caracterização Físico-Química das AuNPs.....	50
4.1.1.	Absorbância UV-Vis	51
4.2.	Pré-Tratamentos dos Substratos	56
4.2.1.	CO.....	56
4.2.2.	CO/PES.....	58
4.2.3.	PES	61
4.3.	Funcionalização dos Substratos	63
4.3.1.	Concentração de NPs	63
4.3.2.	Tipo de tratamento.....	66
4.3.3.	Influência do pH	69
4.3.4.	Influência dos surfactantes.....	71
4.3.5.	Influência da razão de banho	75
4.3.6.	Influência dos crosslinkers	78
4.3.7.	DoE	80
4.3.8.	Funcionalização nos diferentes substratos	85

4.4.	Avaliação da Funcionalização dos substratos.....	90
4.4.1.	Absorção atômica	90
4.4.2.	SEM-EDS	92
4.4.3.	Solidez ao suor	99
4.4.4.	Ensaio Antimicrobiano	101
5.	Conclusões e Perspectivas Futuras.....	118
5.5.	Perspectivas Futuras	120
	Referências Bibliográficas.....	122

Índice de Figuras

Figura 1: Esquema das nanopartículas utilizadas, na estrutura de hidroxiapatite (Vukomanovic, Skapin and Suvorov, 2013) (utilização da imagem autorizada).....	10
Figura 2: Oxidação do algodão (a) para posterior introdução do polímero HBP-NH ₂ (b) (Zhang <i>et al.</i> , 2009)(adaptado).	12
Figura 3: Reação de aminólise (Wei <i>and</i> Gu, 2001) (adaptado).....	14
Figura 4: Degradação das cadeias moleculares do poliéster tratado com plasma (Khalifa <i>et al.</i> , 2016) (adaptado).....	16
Figura 5: Esquema da ligação das AgNPs ao substrato de algodão, por meio da carboximetilcelulose (Xu <i>et al.</i> , 2018) (adaptado).....	18
Figura 6: Ligação da celulose com quitosano através do agente ligante BTCA (Sharaf <i>et al.</i> , 2011) (adaptado).....	19
Figura 7: Criação de grupos -COOH num substrato de CO/PES para posterior ligação ao quitosano (Ibrahim <i>et al.</i> , 2017) (adaptado).....	21
Figura 8: Estruturas das malhas utilizadas. (A) Single Jersey; (B) Bird Eye (agulha dupla).	26
Figura 9: Esquema do processo de impregnação utilizado.....	30
Figura 10: Esquema do processo de esgotamento utilizado.....	33
Figura 11: Representação esquemática das amostras com estrutura tubular.	34
Figura 12: Procedimento experimental dos ensaios antimicrobianos realizado na Universidade do Minho. (A) recolha da estirpe bacteriana para preparação do pré-inóculo; (B) Inoculação da suspensão com o microrganismo na amostra têxtil; (C) Diluições seriadas; (D) Plaqueamento.....	47
Figura 13: Exemplos de placas resultantes dos ensaios antimicrobianos realizados na Universidade do Minho. (A) Placa com crescimento de UFCs de <i>P. aeruginosa</i> ; (B) Placa sem crescimento de UFCs de <i>P. aeruginosa</i> ; (C) Placa com propagação de UFPs de vírus MS2, e hospedeiro <i>E. coli</i> ; (D) Placa sem propagação de UFPs de vírus MS2, com hospedeiro <i>E. coli</i>	48
Figura 14: Placa de 96 poços, com AuNPs e <i>E. coli</i>	49
Figura 15: Imagem de TEM com a estrutura de hidroxiapatite e as nanopartículas de ouro depositadas na mesma (Instituto Jožef Stefan).	50
Figura 16: Absorbância das AuNPs (Instituto Jožef Stefan).	52
Figura 17: Cinética de crescimento de PAO1 na presença de AuNPs com diferentes concentrações (Instituto Jožef Stefan).	53

Figura 18: Densidade ótica das dispersões com AuNPs e microrganismos após 24h.	54
Figura 19: MBC e MVC das AuNPs.	54
Figura 20: Substrato de CO/PES com lavagem, à esquerda sem qualquer funcionalização, e à direita funcionalizado com AuNPs.	64
Figura 21: Substrato de PES, à esquerda sem qualquer funcionalização, e à direita funcionalizado com AuNPs.....	64
Figura 22: Substrato de CO com lavagem, à esquerda sem qualquer funcionalização, e à direita funcionalizado com AuNPs.	65
Figura 23: Substrato de CO com meia-branqueação, à esquerda sem qualquer funcionalização, e à direita funcionalizado com AuNPs.	65
Figura 24: Substratos de CO impregnados com diferentes concentrações de AuNPs. (A) 1,2 mg/mL; (B) 0,9 mg/mL; (C) 0,6 mg/mL; (D) 0,3 mg/mL.....	66
Figura 25: Substrato CO após funcionalização com diferentes tratamentos e com diferentes concentrações. (A) Esgotamento 0,1 mg/mL; (B) Esgotamento 0,3 mg/mL; (C) Impregnação 0,1 mg/mL; (D) Impregnação 0,3 mg/mL.	67
Figura 26: Amostras de CO funcionalizadas com 0,3 mg/mL de AuNPs sem ajuste de pH (esquerda) e com ajuste de pH (direita).	70
Figura 27: Substrato CO funcionalizado com AuNPs. (A) Esgotamento com surfactante A; (B) Esgotamento com surfactante B; (C) Esgotamento com surfactante C; (D) Impregnação com surfactante A; (E) Impregnação com surfactante B; (D) Impregnação com surfactante C.....	73
Figura 28: Substratos CO funcionalizados com AuNPs. Esquerda: Esgotamento com surfactante A + surfactante D; Direita: Esgotamento com surfactante B + surfactante D.....	74
Figura 29: Da esquerda para a direita: Dispersão Mãe; Dispersão após esgotamento RB 1:20; Dispersão após esgotamento RB 1:12; Dispersão após esgotamento RB 1:07.	76
Figura 30: Amostras de algodão funcionalizadas por esgotamento com ácido cítrico, sem AuNPs (esquerda) e com AuNPs (direita).	79
Figura 31: Amostras de algodão funcionalizadas por esgotamento com GTA, sem AuNPs (esquerda) e com AuNPs (direita).....	79
Figura 32: Amostras resultantes dos ensaios DoE. Esgotamento com 0,1 mg/mL AuNPs (ou sem NPs); 4 g/L Surfactante A; 5 g/L Surfactante D. (A) Branco, sem AuNPs, 60 °C durante 60 min. (B) 20°C durante 10 min. (C) 20°C durante 60 min. (D) 50°C durante 35 min. (E) 50 °C durante 35 min. (F) 80 °C durante 10 min. (G) 80 °C durante 60 min. (H) 50 °C durante 35 min.	82

Figura 33: Substratos de algodão com meia branqueação tratados por esgotamento sem AuNPs (esquerda) e com 0,1 mg/mL AuNPs (direita).....	87
Figura 34: Substratos de algodão tingido (olive) tratados por esgotamento sem AuNPs (esquerda) e com 0,1 mg/mL AuNPs (direita).	87
Figura 35: Substratos de mistura algodão/poliéster tratados por esgotamento sem AuNPs (esquerda) e com 0,1 mg/mL AuNPs (direita).....	87
Figura 36: Substratos de poliéster tratados por esgotamento sem AuNPs (esquerda) e com 0,1 mg/mL AuNPs (direita).	87
Figura 37: Dispersões após esgotamento de diferentes substratos: Da esquerda para a direita: Dispersão mãe (antes do esgotamento, com 0,1 mg/mL de AuNPs); Dispersão após esgotamento de algodão com meia branqueação; Dispersão após esgotamento de algodão tingido (olive); Dispersão após esgotamento de mistura algodão/poliéster; Dispersão após esgotamento de poliéster branqueado.	89
Figura 38: SEM do substrato de CO com e sem AuNPs; Espetro EDS e análise elementar mapeada..	93
Figura 39: SEM do substrato de CO tingido (olive) com e sem AuNPs; Espetro EDS e análise elementar mapeada.....	93
Figura 40: SEM do substrato de CO/PES com e sem AuNPs; Espetro EDS e análise elementar mapeada.	93
Figura 41: SEM do substrato de PES com e sem AuNPs; Espetro EDS e análise elementar mapeada.	94
Figura 42: SEM do substrato de CO com AuNPs em diferentes ampliações.	95
Figura 43: Espetro EDS do substrato CO.....	95
Figura 44: SEM do substrato de CO tingido (olive) com AuNPs em diferentes ampliações.	96
Figura 45: Espetro EDS do substrato CO tingido (olive).....	96
Figura 46: SEM do substrato de CO/PES com AuNPs em diferentes ampliações.	97
Figura 47: Espetro EDS do substrato CO/PES.....	97
Figura 48: SEM do substrato de PES com AuNPs em diferentes ampliações.....	98
Figura 49: Espetro EDS do substrato PES.	98
Figura 50: Ensaio antimicrobiano segundo a norma AATCC 147: suscetibilidade de bactérias gram-negativas (<i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>) em contacto com substrato de CO funcionalizados com diferentes concentrações de AuNPs (0 mg/mL; 0,3 mg/mL e 0,06 mg/mL). Para cada estirpe e concentração é mostrada uma fotografia antes da remoção da amostra em teste (direita) e depois da remoção da amostra (esquerda), para melhor avaliação da área afetada.	102

Figura 51: Ensaio antimicrobianos segundo a norma AATCC 147: suscetibilidade de bactérias gram-negativas (<i>B. subtilis</i> e <i>S. epidermidis</i>) em contacto com substrato de CO funcionalizados com diferentes concentrações de AuNPs (0 mg/mL; 0,3 mg/mL e 0,06 mg/mL). Para cada estirpe e concentração é mostrada uma fotografia antes da remoção da amostra em teste (direita) e depois da remoção da amostra (esquerda), para melhor avaliação da área afetada.	103
Figura 52: Ensaio AATCC 100 aos substratos de CO com diferentes concentrações de AuNPs para a estirpe <i>E. coli</i> . Esquerda: contagem dos CFUs através do logaritmo decimal; Meio: Placas de Petri com crescimento de colónias de <i>E. coli</i> após contacto com substratos funcionalizados; Direita: Crescimento de <i>E. coli</i> em substratos funcionalizados lavados.....	104
Figura 53: Ensaio AATCC 100 aos substratos de CO com diferentes concentrações de AuNPs para a estirpe <i>P. aeruginosa</i> . Esquerda: contagem dos CFUs através do logaritmo decimal; Meio: Placas de Petri com crescimento de colónias de <i>P. aeruginosa</i> após contacto com substratos funcionalizados; Direita: Crescimento de <i>P. aeruginosa</i> em substratos funcionalizados lavados.	105
Figura 54: Ensaio AATCC 100 aos substratos de CO com diferentes concentrações de AuNPs para a estirpe <i>B. subtilis</i> . Esquerda: contagem dos CFUs através do logaritmo decimal; Meio: Placas de Petri com crescimento de colónias de <i>B. subtilis</i> após contacto com substratos funcionalizados; Direita: Crescimento de <i>B. subtilis</i> em substratos funcionalizados lavados.	106
Figura 55: Ensaio AATCC 100 aos substratos de CO com diferentes concentrações de AuNPs para a estirpe <i>S. epidermidis</i> . Esquerda: contagem dos CFUs através do logaritmo decimal; Meio: Placas de Petri com crescimento de colónias de <i>S. epidermidis</i> após contacto com substratos funcionalizados; Direita: Crescimento de <i>S. epidermidis</i> em substratos funcionalizados lavados.	107
Figura 56: Cinética de crescimento das diferentes estirpes de bactérias [<i>E. coli</i> (EC); <i>P. aeruginosa</i> (PAO1); <i>B. subtilis</i> (BS); <i>S. epidermidis</i> (SE)]......	108
Figura 57: Ensaio AATCC 100 para a estirpe <i>E. coli</i> nos diferentes substratos [CO; CO/PES; PES; CO tingido (olive)] com e sem AuNPs (0,1 mg/mL). Canto inferior esquerdo: crescimento bacteriano da <i>E. coli</i> em logarítmico para cálculo da redução logarítmica. Direita: placas de Petri com CFUs de <i>E. coli</i> após contacto com substratos funcionalizados com e sem AuNPs.	109
Figura 58: Ensaio AATCC 100 para a estirpe <i>S. epidermidis</i> nos diferentes substratos [CO; CO/PES; PES; CO tingido (olive)] com e sem AuNPs (0,1 mg/mL). Canto inferior esquerdo: crescimento bacteriano da <i>S. epidermidis</i> em logarítmico para cálculo da redução logarítmica. Direita: placas de Petri com CFUs de <i>S. epidermidis</i> após contacto com substratos funcionalizados com e sem AuNPs.....	110

Figura 59: Ensaio AATCC 100 - Redução logarítmica dos diferentes substratos funcionalizados com (0,1 mg/mL) ou sem AuNPs (padrão), na presença de <i>E.coli</i>	111
Figura 60: Ensaio AATCC 100 - Redução logarítmica dos diferentes substratos funcionalizados com (0,3 mg/mL) ou sem AuNPs (padrão), na presença de <i>E.coli</i>	111
Figura 61: Ensaio AATCC 100 - Redução logarítmica dos diferentes substratos funcionalizados com (0,1 mg/mL) ou sem AuNPs (padrão), na presença de <i>S. epidermidis</i>	112
Figura 62: Ensaio AATCC 100 - Redução logarítmica dos diferentes substratos funcionalizados com (0,3 mg/mL) ou sem AuNPs (padrão), na presença de <i>S. epidermidis</i>	113
Figura 63: Ensaio AATCC 100 - Redução logarítmica dos diferentes substratos funcionalizados com (0,1 mg/mL) ou sem AuNPs (padrão), na presença de <i>P. aeruginosa</i>	114
Figura 64: Ensaio AATCC 100 - Redução logarítmica dos diferentes substratos funcionalizados com (0,3 mg/mL) ou sem AuNPs (padrão), na presença de <i>P. aeruginosa</i>	114
Figura 65: Ensaio norma AATCC 100 adaptada e ISO 18184 adaptada - Redução logarítmica de substratos CO funcionalizados com diferentes concentrações de AuNPs, na presença do bacteriófago <i>E. coli</i> MS2.....	116
Figura 66: Ensaio norma AATCC 100 adaptada e ISO 18184 adaptada - Redução logarítmica dos diferentes substratos funcionalizados com (0,1 mg/mL) ou sem AuNPs, na presença do bacteriófago <i>E. coli</i> MS2.....	117
Figura 67: Ensaio norma AATCC 100 adaptada e ISO 18184 adaptada - Redução logarítmica dos diferentes substratos funcionalizados com (0,3 mg/mL) ou sem AuNPs, na presença do bacteriófago <i>E. coli</i> MS2.....	117

Índice de Tabelas

Tabela 1: Informações técnicas dos substratos utilizados	25
Tabela 2: Pré-tratamentos aplicados em cada um dos substratos têxteis	27
Tabela 3: Procedimentos dos pré-tratamentos realizados nos substratos têxteis.....	28
Tabela 4: Definição da pressão dos rolos espremedores para cada um dos substratos	31
Tabela 5: Processos de impregnação realizados ao longo do projeto de dissertação, usando dispersões de nanopartículas de ouro, e os diferentes substratos têxteis.....	32
Tabela 6: Processos de esgotamento realizados ao longo do projeto de dissertação, usando dispersões de nanopartículas de ouro, e os diferentes substratos têxteis.....	35
Tabela 7: Esquema fatorial para ensaios com três variáveis a avaliar	39
Tabela 8: Esquema fatorial para ensaios realizados, com duas variáveis.....	40
Tabela 9: Correlação entre a atividade antimicrobiana das AuNPs e a redução logarítmica	55
Tabela 10: Quantificação de Au (mg/L) presente nos diferentes substratos com 1 e 20 lavagens	90
Tabela 11: Quantificação da perda de AuNPs em dispersões que simulavam o suor alcalino, ao longo do ensaio da solidez ao suor.....	100

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Absorbância das AuNPs dos três batches recebidos.	51
Gráfico 2: Refletância dos substratos (CO) funcionalizados com esgotamento com condições ótimas (70 °C durante 10 minutos), com diferentes pré-tratamentos.	56
Gráfico 3: Absorbância das dispersões após esgotamento, com e sem AuNPs, do substrato CO com diferentes pré-tratamentos.	57
Gráfico 4: Influência das lavagens na diferença de cor das amostras de CO funcionalizadas com diferentes pré-tratamentos.	58
Gráfico 5: Refletância dos substratos (CO/PES) funcionalizados com AuNPs, com e sem pré-tratamento.	59
Gráfico 6: Absorbância das dispersões após o esgotamento com e sem AuNPs, do substrato de CO/PES com e sem pré-tratamento.	60
Gráfico 7: Influência das lavagens na diferença de cor das amostras de CO/PES funcionalizadas com diferentes pré-tratamentos.	60
Gráfico 8: Refletância dos substratos (PES) funcionalizados com AuNPs, com e sem pré-tratamento..	61
Gráfico 9: Absorbância das dispersões antes e após o esgotamento com e sem AuNPs, do substrato PES com e sem pré-tratamento.	62
Gráfico 10: Influência das lavagens na diferença de cor das amostras de PES funcionalizadas com diferentes pré-tratamentos.	63
Gráfico 11: Refletância dos substratos após impregnação com 5×10^5 g/mL AuNPs.	64
Gráfico 12: Refletância dos substratos de CO impregnados com diferentes concentrações de AuNPs.	65
Gráfico 13: Refletância dos substratos CO após funcionalização com diferentes tratamentos e com diferentes concentrações.	67
Gráfico 14: Refletância do substrato CO funcionalizado com diferentes tratamentos e com diferentes concentrações, após 20 lavagens.	68
Gráfico 15: Influência das lavagens na diferença de cor das amostras de CO funcionalizadas com diferentes tratamentos e diferentes concentrações.	68
Gráfico 16: Refletância do substrato CO funcionalizado com 0,3 mg/mL AuNPs com e sem ajuste de pH.	69
Gráfico 17: Diferença de cor das amostras funcionalizadas antes e após 5 lavagens.	70

Gráfico 18: Refletância total dos substratos (CO) funcionalizados por esgotamento ou por impregnação utilizando surfactantes (0,1 mg/mL de AuNPs; Esgotamento a 60°C durante 60 min – ensaio 6).....	72
Gráfico 19: Reprodutibilidade das réplicas realizadas para cada amostra durante as leituras no equipamento UV-Vis.....	72
Gráfico 20: Diferença de cor dos substratos funcionalizados por esgotamento ou impregnação antes e após lavagens.	73
Gráfico 21: Refletância dos substratos CO funcionalizados por esgotamento utilizando surfactantes (Esgotamento a 70°C durante 10 min).....	74
Gráfico 22: Absorbância das dispersões após esgotamento com surfactantes.....	75
Gráfico 23: Refletância da amostra de CO funcionalizada por esgotamento utilizando diferentes razões de banho (Esgotamento a 60 °C durante 60 min).....	76
Gráfico 24: Absorbância das dispersões após esgotamento com diferentes razões de banho.	77
Gráfico 25: Diferença de cor dos substratos funcionalizados por esgotamento com diferentes razões de banho, antes e após lavagens.	77
Gráfico 26: Refletância das amostras de CO funcionalizados por esgotamento utilizando diferentes de <i>crosslinkers</i> . (Esgotamento a 70 °C durante 10 minutos; 0,1 mg/mL de AuNPs; 4 g/L surfactante A; 5 g/L surfactante D; sem ajuste de pH na presença do ácido cítrico).....	78
Gráfico 27: Absorbância das dispersões após esgotamento com diferentes <i>crosslinkers</i>	79
Gráfico 28: Diferença de cor dos substratos funcionalizados na presença de <i>crosslinkers</i> antes e após lavagens.....	80
Gráfico 29: Refletância das amostras de CO funcionalizados por esgotamento utilizando diferentes condições de esgotamento.	81
Gráfico 30: Relação entre os valores da percentagem de refletância a 570 nm (relativamente à amostra sem AuNPs); da percentagem de absorvância das dispersões após esgotamento a 570 nm (relativamente à dispersão mãe, com 0,1 mg/mL de AuNPs); do K/S a 570 nm e da diferença de cor (ΔE).	83
Gráfico 31: Diferença de cor dos substratos funcionalizadas por esgotamento com diferentes condições, antes e após lavagens.	83
Gráfico 32: Relação entre os valores da percentagem de refletância a 570 nm (relativamente à amostra sem AuNPs); da percentagem de absorvância das dispersões após esgotamento a 570 nm (relativamente à dispersão mãe, com 0,1 mg/mL de AuNPs); do K/S a 570 nm e da diferença de cor (ΔE).	84
Gráfico 33: Diferença de cor dos substratos funcionalizadas por esgotamento com diferentes condições, antes e após lavagens.	85

Gráfico 34: Refletância das amostras dos diferentes substratos funcionalizados por esgotamento a 70°C durante 10 minutos, com 0,1 mg/mL de AuNPs, 4 g/L surfactante A e 5 g/L surfactante D.	86
Gráfico 35: Absorbância das dispersões após esgotamento de diferentes substratos.....	88
Gráfico 36: Diferença de cor dos diferentes substratos antes e após lavagens.....	89

Lista de Abreviaturas

AAS	Espetroscopia de Absorção Atômica
AC	Ácido Cítrico
BTCA	Ácido 1,2,3,4–Butanotetracarboxílico
CMCS	Carboximetil Quitosano
CO	Algodão
DoE	Design de Experimentos (<i>Design of Experiments</i>)
EDX/EDS	Espetroscopia de Raios X
EPIs	Equipamentos de Proteção Individual
FTIR	Espetroscopia de Infravermelhos com Transformadas de Fourier
GTA	Glutaraldeído
MBC	Concentração Mínima Bactericida (<i>Minimum Bactericidal Concentration</i>)
MIC	Concentração Inibitória Mínima (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
MVC	Concentração Mínima Virucida (<i>Minimum Virucidal Concentration</i>)
NA	<i>Nutrient Agar</i>
NB	<i>Nutrient Broth</i>
NPs	Nanopartículas
OD	Densidade Ótica (<i>Optical Density</i>)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PES	Poliéster
PEI	Polietilenoimina
SEM	Microscopia Eletrônica de Varrimento (<i>Scanning Electron Microscope</i>)
SHP	Hipofosfito de sódio

TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão (<i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TSA	<i>Trypic Soy Agar</i>
TSB	<i>Trypic Soy Broth</i>
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
XPS	Espetroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios X
XRD	Difração de raios X

1. Introdução

A situação pandémica que se vive atualmente tem originado uma série de transformações em diferentes setores laborais e sociais. Perante este panorama, é cada vez mais importante a indústria têxtil acompanhar as novas tecnologias, de forma a conseguir responder aos diversos desafios apresentados, neste caso, pelo setor da saúde. Por este motivo, o tema da presente dissertação foi o desenvolvimento de produtos têxteis com propriedades antimicrobianas utilizando, para o efeito, nanopartículas de ouro, para posterior aplicação em Equipamentos de Proteção Individual (EPIs).

Os materiais têxteis podem ser propícios à propagação de microrganismos, não só devido à sua elevada superfície de contacto, mas também pela capacidade de retenção de humidade, criando, desta forma, condições favoráveis para o crescimento de, por exemplo, bactérias e fungos. Assim, a potencial contaminação de materiais têxteis com microrganismos é motivo de atenção, tanto para uso em ambiente hospitalares, como em roupa de desporto ou na indústria alimentar (Morais *et al.*, 2016).

Segundo o Guia Geral para a Seleção de Equipamentos de Proteção Individual (Almeida *et al.*, 2016), entende-se que EPIs são todos os equipamentos, incluindo complementos ou acessórios, cuja principal função é a proteção do trabalhador (a nível de saúde e segurança) dos riscos a que está exposto no local trabalho. A nível hospitalar, é necessário ter em consideração que os profissionais de saúde estão expostos a um maior número de doenças infecciosas, comparativamente à restante população. Assim sendo, estes podem não só desenvolver doença grave devido à carga microbiana a que estão expostos, mas também atuar como transmissores (Matte *et al.*, 2020). Por este motivo, e considerando a potencial aplicação dos têxteis funcionalizados neste trabalho, as bactérias aqui analisadas foram selecionadas das estirpes mais conhecidas como causadoras de infeções hospitalares (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*). Em particular, as bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus* apresentam elevada resistência a vários desinfetantes e antibióticos (Hasanvand *et al.*, 2021), sendo por isso de particular interesse o desenvolvimento de têxteis (e outras superfícies) com resistência a estas bactérias, isto é, que previnam a sua propagação.

Para o desenvolvimento deste trabalho, foi importante entender de que forma se poderiam funcionalizar os substratos têxteis com nanopartículas de ouro (AuNPs) funcionalizadas com

grupos NH_2 e COOH , de modo a aumentar a solidez dos mesmos à lavagem. Estudaram-se e aplicaram-se diversos processos de funcionalização, assim como pré-tratamentos, de modo a potencializar o efeito antibacteriano. A modificação dos substratos têxteis por meio de pré-tratamentos e/ou a utilização de *crosslinkers* (agentes de ligação) permitiu criar uma ligação covalente entre o substrato e os grupos funcionais das AuNPs, aumentando não só a solidez dos mesmos, mas também o próprio rendimento do processo.

1.1. Objetivos

Esta dissertação tem como principal objetivo o estudo da funcionalização de substratos têxteis com nanopartículas de ouro, para lhes conferir propriedades antimicrobianas. O desenvolvimento deste projeto dividiu-se nas seguintes etapas:

- › Estudo de diversos pré-tratamentos e métodos de funcionalização de substratos têxteis com polímeros, nanopartículas ou outros materiais funcionalizados com grupos NH_2 e COOH ;
- › Aplicação de diversos pré-tratamentos e métodos de funcionalização de substratos têxteis com AuNPs;
- › Otimização do processo de funcionalização, através da aplicação de auxiliares têxteis e *crosslinkers*;
- › Otimização do processo através do método DoE, relacionando as variáveis tempo e temperatura;
- › Análise do rendimento do processo de funcionalização e da solidez à lavagem, estudando diversas variáveis, como tempo, temperatura, pH, adição de produtos auxiliares, *crosslinkers*, entre outros;
- › Análise da atividade antimicrobiana dos substratos têxteis, através de ensaios de microbiologia.

1.2. Estrutura da dissertação

A presente dissertação é composta por cinco capítulos.

O primeiro corresponde à introdução do tema proposto para a dissertação e faz um pequeno enquadramento.

No segundo capítulo, por sua vez, é apresentada toda a fundamentação teórica e o estado da arte dos principais objetivos deste trabalho, que permitiu o desenvolvimento do mesmo. Destaque para os pré-tratamentos e funcionalização dos substratos têxteis.

Na terceira secção são inseridos os métodos aplicados durante o trabalho, assim como o material utilizado. Neste capítulo está também apresentado o planeamento dos ensaios laboratoriais realizados ao longo do trabalho, assim como todos os testes realizados aos substratos têxteis e às AuNPs.

O quarto capítulo corresponde à apresentação e discussão de resultados, onde são comparados os diversos resultados obtidos através dos diferentes processos aplicados.

Por último, o quinto capítulo, finaliza a presente dissertação, com as conclusões sobre os resultados obtidos, assim como propostas de melhoria para trabalhos futuros.

2. Enquadramento Teórico

2.1. Microrganismos (vírus, bactérias e fungos)

Os microrganismos, ou micróbios, são organismos de tamanho microscópico. Entre os mesmos estão incluídos os vírus, bactérias ou fungos, sobre os quais existem algumas diferenças a ressaltar. Dentro das diferentes espécies, é possível verificar que alguns são benéficos ou não causam qualquer patologia no ser humano, enquanto outros são prejudiciais e há necessidade de controlar os mesmos.

Ainda não há consenso entre investigadores relativamente à definição de vírus, sendo que uns afirmam que este é um organismo, e outros avaliam-no como partículas infecciosas, cuja multiplicação depende da maquinaria enzimática das células dos hospedeiros, quando se infiltram no material genético das células. De forma simplificada, os vírus são compostos por uma cápsula proteica (capsídeo) ou membrana e ácido nucleico, que pode conter DNA (p.e. no caso dos adenovírus) ou RNA (p.e. no caso dos retrovírus) responsável pela replicação viral. É na cápsula proteica/membrana que se encontram as proteínas que vão ligar o vírus à célula do hospedeiro e iniciar o processo de infeção (Pelczar and Pelczar, 2020).

As bactérias são organismos procariontes, visto não possuírem núcleo organizado, com membrana, e a sua reprodução pode ser sexuada ou assexuada. Estes organismos são constituídos por uma parede celular, uma membrana plasmática que envolve o material genético em nucleóide, e algumas podem apresentar flagelos na sua superfície, para auxiliar a movimentação (Pelczar and Pelczar, 2020). As bactérias podem ser distinguidas por gram-positivas ou gram-negativas. A principal diferença entre os dois grupos é no facto das primeiras terem uma camada espessa de peptidoglicano e não possuírem membrana lipídica externa e, nas segundas, a camada de peptidoglicano é fina e apresentam membrana lipídica externa. As bactérias não são na sua totalidade agentes patogénicos, pois algumas, as probióticas, podem ser benéficas para os animais e para o Homem.

Os fungos pertencem ao reino Fungi, podem ser unicelulares ou pluricelulares, e possuem diversas dimensões. São organismos eucariontes, ou seja, possuem um núcleo organizado revestido por membrana, e absorvem nutrientes do ambiente (Pelczar and Pelczar, 2020), como forma de alimento. Nos fungos pluricelulares pode-se destacar os fungos filamentosos, que apesar

de possuir tamanho microscópico, quanto está presente em grande número torna-se visível a olho nu. Por outro lado, existem os fungos unicelulares, denominados de leveduras, que estão presentes no fabrico do pão e em muitas bebidas fermentadas, por exemplo. Algumas espécies de leveduras podem ser patogénicas, como é o caso do fungo *Candida albicans*, que é responsável pela doença candidíase.

2.2. Acabamentos Funcionais

Os acabamentos funcionais permitem conferir aos substratos características funcionais que estes por si só não possuem, com o intuito de satisfazer algumas necessidades que o ser humano vai apresentando.

Em particular, a funcionalização dos têxteis pode ser realizada nas diferentes etapas do processo de produção têxtil, desde a seleção das fibras, aos acabamentos. A funcionalização do substrato na fase final do processo têxtil, ou seja, durante os acabamentos, é convencionalmente realizada por impregnação, esgotamento, *grafting*, *spray*, revestimento, entre outros métodos.

A nanotecnologia é a ciência dedicada ao estudo de materiais com dimensões entre 1 e 100 nanómetros. Esta tecnologia, em particular, tem sido amplamente investigada na área dos acabamentos funcionais, devido às vantagens que apresenta, tais como maior área superficial, alta reatividade, menor gasto/consumo da substância ativa/funcional, maior facilidade das nanopartículas penetrarem no substrato (Soares, 2020), permitindo conferir aos substratos têxteis propriedades diferenciadoras.

2.3. Acabamentos Antimicrobianos

Os acabamentos antimicrobianos são constantemente alvo de diversos estudos, pois permitem conferir aos substratos uma certa proteção contra microrganismos e podem ser utilizados em diversas áreas. Este tipo de acabamentos tem diversas funcionalidades, podendo controlar o crescimento de microrganismos nos substratos e, conseqüentemente: controlar os odores provocados pelos mesmos; ajuda na diminuição da propagação de infeções em ambiente hospitalar, ou no tratamento localizado de feridas e de outras infeções; proteger o substrato têxtil para que este não se degrade facilmente (Gopalakrishnan *and* Aswini, 2007). Para uma boa funcionalização dos substratos, é necessário que os acabamentos antimicrobianos, para além de apresentarem uma considerável atividade antimicrobiana, sejam resistentes às normais condições

de uso e limpeza para aplicação pretendida (ou seja: lavagem, secagem, prensagem, fricção, fluidos corporais) sejam de fácil aplicação à escala industrial, não sejam prejudiciais ao meio ambiente e, o mais importante, não sejam tóxicos, nem provoquem danos ao utilizador, respeitando os regulamentos de segurança e qualidade (Gopalakrishnan *and* Aswini, 2007).

Os acabamentos antimicrobianos podem ser caracterizados como biocidas ou biostáticos, sendo que os primeiros matam ou inviabilizam os microrganismos, e os segundos apenas inibem o seu crescimento. Os mecanismos de atuação destes acabamentos podem ser ativos ou passivos. Num mecanismo ativo há a presença de um ou vários agentes antimicrobianos que podem atuar, por exemplo, por: libertação controlada; regeneração do componente ativo; efeito barreira, eliminando os microrganismos ou inibindo o seu crescimento. Num mecanismo passivo, não existe um agente antimicrobiano, ou seja, não há substância ativa, mas o substrato pode ser revestido com polímeros antiaderentes ou pode ocorrer alteração da geometria da superfície do substrato, criando, por exemplo, um efeito lótus (*anti-fouling*), que impede a adesão dos microrganismos e, deste modo, estes não possuem condições adequadas para se desenvolver (Soares, 2020).

A nível dos agentes antimicrobianos usados na área têxtil, estes podem ser divididos em dois grandes grupos: compostos orgânicos [e.g. compostos de amónio quaternário, quitosano, triclosan, polihexametileno biguanida (PHMB)] e compostos inorgânicos (por exemplo: metais e óxidos metálicos, incluindo na forma nano), sendo que, de forma geral, os últimos apresentam atividade antimicrobiana superior (Saidin *et al.*, 2021).

2.3.1. Nanopartículas metálicas e de óxidos de metal

As nanopartículas metálicas podem ter inúmeras aplicações, onde se incluem as óticas, elétricas, magnéticas, antimicrobianas, entre outras (Park *et al.*, 2012). Em particular, as nanopartículas de alguns metais têm grande influência no combate às bactérias gram-positivas e gram-negativas (Rai, Prabhune *and* Perry, 2010). Os metais mais utilizados até ao momento para o efeito antimicrobiano são a prata, o cobre, o ouro, o zinco e o titânio, sendo que os dois últimos são mais utilizados sob a forma de óxidos (Porto *et al.*, 2017; Arakawa *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2014). As nanopartículas de prata (AgNPs), por exemplo, apresentam excelente atividade antibacteriana, mesmo em baixas concentrações (Yin *et al.*, 2020). O funcionamento das mesmas pode ser descrito pela penetração dos iões de prata na parede celular da bactéria, comprometendo assim o material genético da mesma e, conseqüentemente, os seus processos metabólicos,

causando, deste modo, a morte celular (Saidin *et al.*, 2021). Atualmente as AgNPs são utilizadas na indústria têxtil para a produção de EPIs (Raza, Taqi *and* Tariq, 2021), mas também em dispositivos biomédicos, e têxteis-lar, apresentando bons resultados, tanto para bactérias gram-positivas, como para bactérias gram-negativas (Saidin *et al.*, 2021).

Apesar das inúmeras vantagens apresentadas pelas nanopartículas metálicas, as mesmas podem apresentar alguns problemas, tais como a toxicidade, razão pela qual existem critérios de avaliação mais exigentes para substâncias usadas na forma de nanopartículas (por exemplo, pelo Regulamento de Produtos Biocidas europeu, 528/2008 12). No caso das AgNPs, existem estudos que demonstraram a sua toxicidade, não só para o ser humano, mas também para o meio ambiente (Vukomanovic, Skapin *and* Suvorov, 2013). A produção industrial das AgNPs por si só já é poluente, mas a este fator acresce a toxicidade das AgNPs, depois das mesmas serem descartadas como resíduos industriais (Tortella *et al.*, 2020). Existem também evidências científicas de que as AgNPs presentes no solo e na água alteram a composição dos mesmos, e podem ser tóxicas para as espécies que habitam nestes meios, comprometendo assim a biodiversidade (Tortella *et al.*, 2020). Alguns autores defendem também que as AgNPs podem atuar não só nos microrganismos, mas também nas células humanas, apesar da sua toxicidade ser mais baixa nestas (Korshed *et al.*, 2016).

Por norma, a funcionalização dos substratos têxteis com nanopartículas tende a ter baixa resistência às lavagens, assim como a outras ações mecânicas, como a fricção, devido à fraca ligação das NPs aos substratos. Deste modo, as NPs podem ir-se libertando e: i) penetrar a pele (devido à dimensão nano), atingindo mais facilmente as células humanas, e atravessar a *blood-brain barrier* ou ii) serem facilmente descartadas para o meio ambiente, comprometendo a biodiversidade, como já foi referido anteriormente.

2.3.2. Nanopartículas de Ouro

As nanopartículas de ouro estão presentes na humanidade desde a Antiguidade Clássica, sendo usadas na manufatura de vidro para conferir cor (Zhang *et al.*, 2015). Contudo, só apenas no século XX, com o surgimento do ultramicroscópio é que os cientistas começaram a investigar as propriedades químicas das nanopartículas de ouro para conferir cor a materiais compostos por este metal. Após a observação destas partículas a nível microscópico, foi possível começar a formar teorias relativamente à síntese das mesmas, assim como das suas propriedades óticas. A

cor que as nanopartículas de ouro emitem está diretamente relacionada com o seu tamanho, com a frequência à qual os elétrões se movimentam e ao confinamento quântico das partículas. Isto significa que, quanto menor a dimensão das partículas, maior a vibração dos elétrões aquando da incidência de radiação eletromagnética, ou seja, ocorre um efeito ressonante entre os elétrões condutores e a radiação incidente. Este efeito ressonante também pode ser chamado de efeito de ressonância de plasmão que origina a banda plasmónica (*Surface Plasmon Band* – SPB). A ressonância de plasmão de superfície sucede devido ao facto de alguns elétrões nas partículas de ouro não estarem ancorados a átomos individuais, e acabam por oscilar mais livremente quando incide luz (Silva, 2017).

Não existe, ainda, consenso relativamente aos efeitos antimicrobianos das nanopartículas de ouro. Certos autores defendem que estas, por si só, apresentam comportamento antimicrobiano, referindo estudos que comprovam a existência de zonas de inibição para determinadas bactérias gram-positivas (*S. aureus*) e gram-negativas (*E. coli*) (Saidin *et al.*, 2021), assim como a eficiência das mesmas contra agentes patogénicos resistentes, e uma boa atividade antiviral (Yaqoob *et al.*, 2020). Outros autores, por sua vez, defendem que estas devem estar funcionalizadas, ou ser aplicadas em conjunto com um antibiótico (Zhang *et al.*, 2015). Outros fatores, tais como dimensão, forma, concentração e outros métodos de purificação, também mostram influenciar a eficácia das nanopartículas de ouro.

De modo geral, é consensual que o efeito antimicrobiano das nanopartículas de ouro é inferior ao das nanopartículas de prata. Balakumaram *et al.* (2016) compararam o efeito antimicrobiano de nanopartículas de ouro e de prata desenvolvidas por micossíntese (síntese via fungos), perante agentes patogénicos humanos (Balakumaran *et al.*, 2016). Os resultados mostraram que a atividade antimicrobiana é bastante superior nas nanopartículas de prata, não tendo, as de ouro, apresentado qualquer comportamento antimicrobiano. Por outro lado, as nanopartículas de ouro são menos tóxicas para os sistemas celulares e apresentam maior estabilidade química, assim como métodos de síntese mais simples (Yaqoob *et al.*, 2020; Saidin *et al.*, 2021).

Existem, contudo, alguns métodos para modificar as nanopartículas e, deste modo, conferir-lhes atividade antimicrobiana, como é o caso da oxidação de nanopartículas de ouro, ligações a antibióticos, ou funcionalização das mesmas com, por exemplo, proteínas, peptídeos, ou ácidos nucleicos (Mocan *et al.*, 2017). Os complexos de Au(I) e de (Au)III podem apresentar algum comportamento antimicrobiano, o qual pode ser potencializado quando conjugado com

antibióticos, auxiliando os últimos no combate a bactérias que se tornam resistentes. Isto é, caso os antibióticos não consigam eliminar as bactérias, as nanopartículas eliminam, ocorrendo assim um efeito sinérgico (Rai, Prabhune *and* Perry, 2010). Outra vantagem da ligação das nanopartículas com os antibióticos, é que as mesmas podem ser utilizadas como suas transportadoras, devido ao seu tamanho reduzido, que torna fácil a penetração nas células humanas. As NPs podem também ser funcionalizadas com sinalizadores, capazes de distinguir tipos específicos de células (Thambiraj, Hema *and* Ravi Shankaran, 2018), e que, ao entrar na membrana da célula, libertam o agente antimicrobiano através, por exemplo, de estímulos internos biológicos (Journal *et al.*, 2016; Kong *et al.*, 2017).

As nanopartículas utilizadas neste estudo foram desenvolvidas e patenteadas pelo Instituto Jožef Stefan (JSI), na Eslovénia. As mesmas foram sintetizadas através de um novo método sonocímico e possuem comportamento antibacteriano, devido à sua funcionalização com diversos grupos funcionais, como por exemplo grupos guanidina (do aminoácido arginina, que confere atividade antibacteriana). Estas NPs encontram-se ainda funcionalizadas com grupos amina e com grupos carboxilo que permitem que as nanopartículas se liguem covalentemente aos têxteis (Vukomanovic, Skapin *and* Suvorov, 2013). Os autores da patente afirmam que, efetivamente as nanopartículas de ouro por si só não possuem comportamento antimicrobiano, e por isso são funcionalizadas com grupos funcionais (aminas protonadas) que atuam diretamente nas bactérias. As nanopartículas de ouro encontram-se ainda sob um suporte, a hidroxiapatite, que é uma biocerâmica, como é possível ver na Figura 1. A fixação das nanopartículas à hidroxiapatite ocorreu por meio de interações electroestáticas.

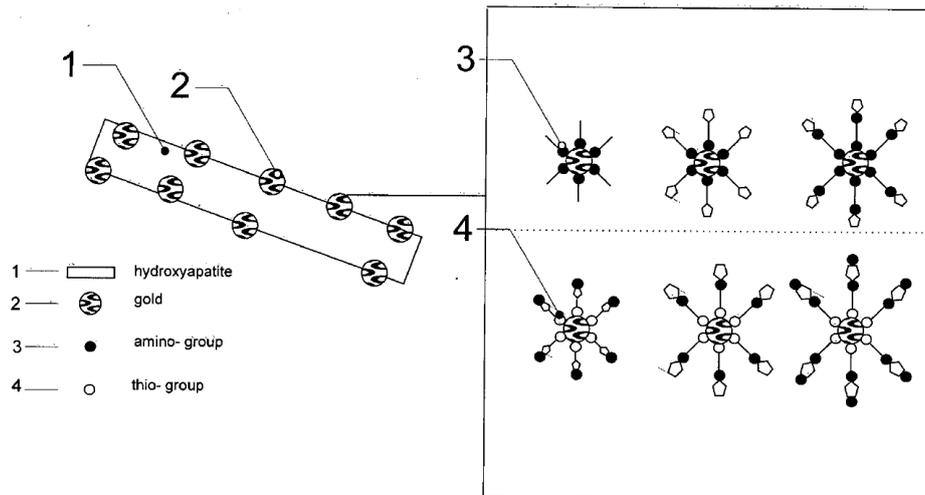


Figura 1: Esquema das nanopartículas utilizadas, na estrutura de hidroxiapatite (Vukomanovic, Skapin and Suvorov, 2013) (utilização da imagem autorizada).

2.4. Aplicação de Nanopartículas em Têxteis

Atualmente existem diversos métodos para funcionalizar os substratos têxteis com nanopartículas, sendo a seleção do método mais adequado feita em função de diversos parâmetros, tais como: quantidade e tipologia de grupos funcionais existentes nas nanopartículas, tipo de substrato têxtil (fibra, estrutura, entre outros fatores), resistência das NPs, etc. Geralmente, os substratos têxteis precisam de algum tratamento antes de se efetuar a funcionalização com as nanopartículas, de forma a potencializar e tornar mais eficaz a ligação das mesmas aos têxteis.

Os métodos de ligação das nanopartículas aos substratos são de suma importância, pois vão influenciar diretamente a percentagem de ancoragem das partículas e a sua resistência a futuras ações mecânicas e químicas, tais como lavagens, fricção, entre outros. Tendo em conta a aplicação final deste estudo, como por exemplo em EPIs, é imperativo que as ligações das nanopartículas aos têxteis sejam resistentes a diversas lavagens, pois a perda da propriedade antibacteriana durante as mesmas compromete a função do EPI e, conseqüentemente, a proteção da pessoa que o utiliza e dos que a rodeiam. Além disso, é muito importante evitar a libertação de nanopartículas em lavagens, mesmo tendo em conta que, segundo a patente (Vukomanovic, Skapin and Suvorov, 2013), as nanopartículas utilizadas neste projeto são quimicamente inertes e não tóxicas para o meio ambiente, nem para o Homem. Assim sendo, é importante ressaltar que não foi testada a toxicidade das nanopartículas durante a realização do presente trabalho e, por este motivo, não se sabe se a adição de agentes auxiliares modificou de alguma forma a sua

composição química, de forma que estas se tornassem prejudiciais ao Homem ou que originassem problemas ambientais futuramente.

2.4.1. Pré-Tratamentos

O pré-tratamento dos materiais têxteis permite preparar os substratos para receber o acabamento funcional, potencializando a incorporação/ligação dos agentes funcionais, neste caso, nanopartículas. Em primeiro lugar, é importante referir que por vezes os substratos vêm com determinadas impurezas naturais e/ou resultantes de processos têxteis anteriores, que comprometem a penetração dos acabamentos funcionais, como é o caso das ceras e encolantes, e, por este motivo, os substratos são submetidos a diferentes tratamentos que eliminam estes componentes e aumentam a hidrofiliabilidade dos têxteis. Por outro lado, por vezes são aplicados outros tratamentos cuja finalidade é ativar, ou funcionalizar os substratos com determinados grupos funcionais. Tendo em conta que um dos grandes problemas da aplicação das nanopartículas é a sua baixa resistência às lavagens, uma forma de diminuir este problema é a funcionalização dos têxteis com determinados grupos químicos que irão posteriormente reagir com alguns dos grupos à superfície das nanopartículas, criando ligações covalentes fortes e resistentes.

A importância das ligações químicas entre grupos funcionais na área da funcionalização têxtil já foi amplamente estudada, assim como a sua influência na fixação dos agentes funcionais usados nos acabamentos. No seu estudo, Gao *et al.* (2014) verificou a formação de pontes de hidrogénio entre grupos carboxilo de um polímero com os grupos hidroxilo da celulose de um substrato de algodão. Como a ligação é muito fraca (comparando com ligações covalentes), ao fim de 3 lavagens, já se tinha perdido a ligação entre o polímero e o substrato. Deste modo, é sempre preferencial que a ancoragem ocorra por meio de ligação covalente (eventualmente através de um agente ligante), sendo esta uma ligação mais forte que as ligações iónicas ou de Van der Waals (Sharaf *et al.*, 2011).

Substratos Celulósicos

A ativação de substratos celulósicos, como é o caso do algodão, pode ser realizada, por exemplo, via oxidação, cationização ou tratamento de plasma (Emam, 2019), nos quais os grupos hidroxilo da celulose podem sofrer reações como esterificação, nitratação ou oxidação.

A **oxidação** é um processo bastante utilizado na celulose, pois pode originar grupos carboxilo, aldeído e cetona a partir dos grupos hidroxilo da celulose, dependendo do oxidante e das condições de oxidação. Uma das grandes vantagens da oxidação é a baixa degradação que esta provoca na fibra (se usada em condições adequadas), assim como uma baixa modificação das propriedades mecânicas e morfológicas. Este processo introduz diversos grupos funcionais às fibras, que serão utilizados posteriormente em ligações covalentes com substâncias funcionais. A oxidação da celulose, seguida de funcionalização com diversos componentes, tem sido amplamente explorada, sendo de seguida apresentados alguns destes estudos. Zhang *et al.* (2009) estudaram a aplicação de um polímero hiper-ramificado e com terminações amina (HPB-NH₂), após a oxidação do algodão com periodato de sódio. Este composto quebrou algumas ligações C-C dos anéis de glicose na celulose, como mostra a Figura 2, originando um substrato de algodão oxidado, com grupos aldeído capazes de reagir mais tarde com os grupos amina do polímero, ficando este ligado covalentemente ao substrato, através de ligações imina.

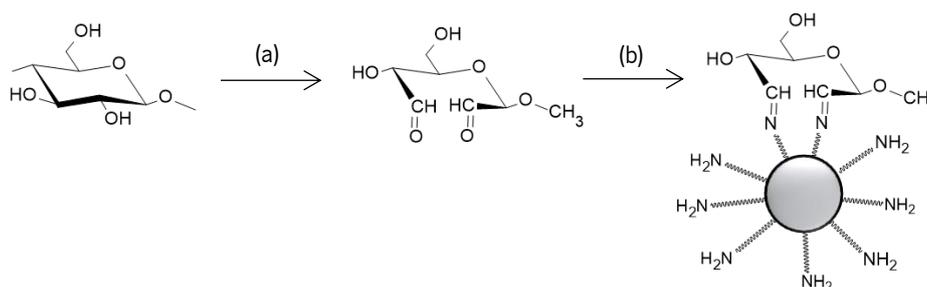


Figura 2: Oxidação do algodão (a) para posterior introdução do polímero HBP-NH₂ (b) (Zhang *et al.*, 2009)(adaptado).

Os resultados desta investigação mostraram que a ligação entre o polímero HBP-NH₂ e a celulose é tanto mais forte, quando maior for o tempo de oxidação do algodão, sendo 30 minutos o tempo ótimo de oxidação (2.0 g/L NaIO₄, 40 °C) para promover as ligações sem degradar a celulose. A atividade antimicrobiana deste substrato funcionalizado teve apenas uma ligeira redução (cerca de 5 %) após 20 lavagens domésticas, indicando uma funcionalização eficaz (Zhang *et al.*, 2009).

Xu *et al.* (2014), por sua vez, recorreram a uma mistura de ácido fosfórico e ácido nítrico com nitrito de sódio (H₃PO₄/HNO₃-NaNO₂) para realizar a oxidação. Neste caso ocorreu a oxidação dos grupos hidroxilo primários da glucose a grupos carboxilo, que posteriormente reagiram com os grupos amina do quitosano, via ligação amida, tendo esta ligação sido comprovada por análise da

Espetroscopia de Infravermelhos com Transformada de Fourier (FTIR). Os autores também avaliaram o efeito antibacteriano, que se mostrou estável mesmo após 50 lavagens, principalmente nas amostras que sofreram oxidações de 30 e 45 minutos. As amostras sem oxidação, ou com tempo de oxidação superior a 360 minutos, apresentaram resultados inferiores e irregulares, e com um efeito antibacteriano bastante inferior (cerca de 50 % de redução).

O **tratamento com plasma** consiste na aplicação de um gás que se encontra parcialmente ionizado, e previamente submetido a elevadas temperaturas ou a fortes campos magnéticos ou eletromagnéticos. A tecnologia de plasma é bastante utilizada para modificar superfícies de materiais têxteis pois pode promover não só a adesão entre polímeros (Zemljić, Peršin and Stenius, 2009), mas também a limpeza das impurezas presentes nos substratos têxteis, melhorias nos processos de tingimento e estamparia, conferir propriedades hidrofílicas ou hidrofóbicas, entre outros (Zille, 2019). O seu mecanismo consiste em “usar partículas reativas do plasma para quebrar ligações covalentes, e criar radicais livres e grupos funcionais” (Khalifa *et al.*, 2016). Este tipo de tratamento pode utilizar diferentes gases, tais como oxigénio, argón, nitrogénio, dióxido de carbono, entre outros, sendo que a seleção do gás a utilizar depende do tipo de funcionalização que se pretende dar ao substrato têxtil (Anjum *et al.*, 2019).

Zemljić *et al.* (2009) estudaram o tratamento de viscose com plasma, aplicando oxigénio e promovendo assim a adsorção de quitosano no substrato. O tratamento de plasma ativou a superfície do substrato, criando grupos funcionais polares, tais como ligações simples e duplas de oxigénio e carbono (C–O; C=O), e grupos carboxilo e aldeído, que atuam como centros nucleofílicos, aos quais os grupos amina do quitosano se ligam. Nas amostras não tratadas com plasma também se verificou adsorção de quitosano, contudo, através da análise Espetroscopia de Fotoeletrões Excitados por raios X (XPS), verificou-se que as ligações formadas foram predominantemente interações físicas, como forças de van der Waals e pontes de hidrogénio. A atividade antimicrobiana foi maior nos substratos com o pré-tratamento de plasma que nos substratos sem este pré-tratamento, devido ao maior rendimento de funcionalização (que origina um maior número de grupos amina disponíveis no substrato). Ainda assim, a tecnologia de plasma não é muito utilizada nos substratos celulósicos pois requer a utilização de energias elevadas, assim como gases funcionalizadores.

Substratos Sintéticos - Poliéster

Relativamente ao poliéster, existem diversos métodos de modificação da superfície, como é o caso da hidrólise alcalina, aminólise, *grafting*, tratamento com plasma, hidrólise enzimática, laser, entre outros (Harifi and Montazer, 2017).

Wei *et al.* (2001), estudaram a introdução de grupos funcionais em substratos de poliéster, mais em concreto, grupos amina, carboxilo e hidroxilo (NHR; COOH; OH), para posteriormente aplicar um acabamento que conferisse um toque sedoso ao substrato. As técnicas utilizadas para modificar o substrato foram a **hidrólise alcalina** e a **aminólise**. A hidrólise alcalina (saponificação) permite introduzir grupos -OH e -COOH nos substratos, enquanto a aminólise permite inserir grupos -NHR. A principal diferença entre os dois processos é que o primeiro modifica o substrato de forma muito superficial, criando poucos grupos, enquanto o segundo permite a criação de mais grupos funcionais, e pode ser mais útil para posteriores aplicações de acabamentos, ou tingimentos. A reação de aminólise é uma reação nucleofílica, e está descrita na Figura 3. De forma resumida, a ligação éster é clivada por ataque nucleofílico da amina, formando-se uma amida e um álcool.

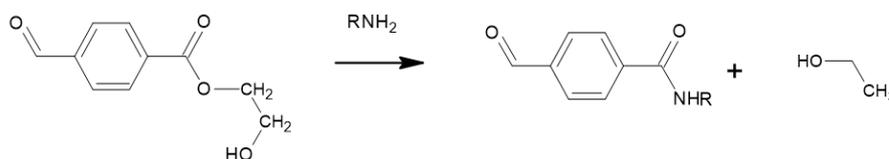


Figura 3: Reação de aminólise (Wei and Gu, 2001) (adaptado).

A saponificação também foi estudada por Lv *et al.* (2014) e por Meng *et al.* (2018). Os primeiros exploraram a introdução de carboximetil quitosano (CMCS) em poliéster: a saponificação do poliéster permitiu a funcionalização da sua superfície com grupos carboxilo para posterior reação com o CMCS. Já Meng *et al.*, para além da saponificação, impregnaram também o substrato com ácido acrílico (1 % wt), que implementou ainda mais grupos carboxilo na superfície do poliéster, incrementando assim as possíveis ligações.

Técnicas de **ultrassons e sono-química** foram estudadas por Harifi *et al.* (2017). Os autores afirmam que a ligação e os efeitos dos nano-acabamentos podem ser potencializados ao submeter os têxteis a um banho ultrassónico: duas amostras foram submetidas a um banho

ultrassónico, sendo que na segunda amostra adicionou-se NaOH ao fim de 4 horas de irradiação ultrassónica; em ambos os casos formaram-se radicais $\cdot\text{OH}$ na superfície das amostras, aumentando a sua hidrofiliidade, mas na segunda amostra ocorreu também hidrólise alcalina e conseqüentemente formação de grupos funcionais hidroxilo e carboxilo que, posteriormente, viriam a ligar com nanopartículas.

A modificação da superfície de substratos de poliéster com **tratamento de plasma** foi estudada por diversos autores. Anjum *et al.* (2019) realçam as inúmeras vantagens do tratamento com plasma, entre elas, a não utilização de reagentes químicos, diminuindo assim a toxicidade do processo. Chang *et al.* (2008) analisaram a incorporação de quitosano em poliéster, ativando a superfície do mesmo com um tratamento de plasma, utilizando gás de árgon misturado com uma baixa percentagem de oxigénio. Análises de XPS mostraram que houve um aumento na percentagem de ligações O-C na superfície do substrato, devido à introdução de oxigénio, aumentando também a hidrofiliidade dos mesmos. Haji *et al.* (2015) estudaram o pré-tratamento de poliéster com plasma, a baixas temperaturas, utilizando oxigénio. Os autores afirmam que, para além de introduzir grupos carboxilo e hidroxilo no poliéster, uma vantagem do plasma a baixas temperaturas é que modifica apenas a parte mais superficial do substrato, e não deteriora as propriedades das fibras. Isto é particularmente vantajoso quando se pretende um acabamento funcional, como é o caso com NPs, pois estas ficam mais expostas, possibilitando uma maior atividade destas. Outro gás que permite a criação de grupos carboxilo no substrato, por meio do tratamento com plasma, é o dióxido de carbono (Anjum *et al.*, 2019).

Khalifa *et al.* (2016) examinaram a introdução de sericina, que tem grupos hidroxilo, carboxilo e amina, em substratos de poliéster, através de tratamento com plasma atmosférico. Os autores utilizaram ainda um agente ligante para promover a união entre a sericina e o poliéster. Numa fase inicial as amostras sofreram fervura alcalina para remover todas as impurezas no substrato. As modificações na superfície induzidas pelo tratamento com plasma, estão representadas na Figura 4.

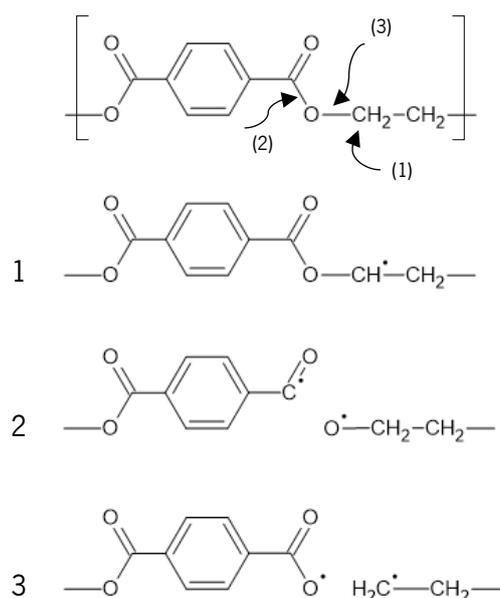


Figura 4: Degradação das cadeias moleculares do poliéster tratado com plasma (Khalifa *et al.*, 2016) (adaptado).

O tratamento com plasma na superfície do PES permitiu quebrar ligações O-C(=O), (O-)C-H e O-CH₂. Os radicais formados “reagem com espécies de plasma reativas ou com o oxigênio no ar” criando, assim, grupos hidroxilo, carboxilo ou carbonilo. Os resultados obtidos na análise do potencial Zeta confirmaram a presença de grupos COO⁻ nos substratos tratados com plasma, e através da densidade de grupos carboxilo com Azul de Toluidina, verificou-se que a densidade destes é menor nos substratos pré-tratados com plasma, devido à ligação covalente dos grupos funcionais presentes nos mesmos com a sericina.

Substratos com Mistura (algodão-poliéster)

Relativamente ao pré-tratamento de substratos com misturas de poliéster e algodão, Al-Balakocy *et al.* (2019) estudaram a incorporação de grupos hidroxilo e carboxilo nos mesmos, recorrendo a tratamentos enzimáticos, que introduziram grupos polares na superfície do substrato, mais em concreto, na superfície do algodão. Neste estudo foram utilizadas celulasas para realizar o tratamento enzimático, e foram tratadas duas amostras, sendo que uma delas sofreu hidrólise alcalina antes de serem aplicadas celulasas, para posterior comparação. Os resultados mostraram uma perda de peso superior nas amostras tratadas com hidrólise alcalina seguido da hidrólise enzimática, assim como um aumento considerável de grupos carboxilo, apesar de as amostras tratadas apenas com hidrólise enzimática apresentarem resultados semelhantes.

2.4.2. Funcionalização dos Têxteis

A aplicação de acabamentos antimicrobianos em têxteis pode ocorrer por diversos métodos, de modo a potencializar as suas propriedades, respeitando os requisitos necessários já mencionados anteriormente. Atualmente as técnicas mais utilizadas são a incorporação diretamente nas fibras; aplicação à superfície das fibras; e ligação química às mesmas (Magalhães, 2015). No primeiro método, aplicado às fibras sintéticas, o agente antimicrobiano é aplicado antes da fição ou da extrusão, encontrando-se no interior da fibra têxtil. O segundo e terceiro métodos, por sua vez, são mais superficiais e podem ser aplicados, por exemplo por impregnação ou por esgotamento, havendo ainda outros métodos como *spraycoating* (Magalhães, 2015; Emam, 2019). A impregnação consiste na imersão do substrato têxtil numa solução/dispersão que contenha o agente antimicrobiano e eventuais aditivos, e posteriormente na sua passagem por dois rolos espremedores, que, através de pressão, vão forçar o agente antimicrobiano a penetrar nas fibras. O esgotamento é um processo durante o qual o substrato está continuamente em contacto com a solução/dispersão que contém o agente antimicrobiano e eventuais aditivos, sendo que os reagentes vão sendo adsorvidos gradualmente pelas fibras, ou reagindo quimicamente com estas. Este método exige controlo rigoroso das condições como agitação, temperatura, pH e concentração dos reagentes e agentes auxiliares.

Substratos Celulósicos

Xu *et al.* (2018) estudaram a ligação de nanopartículas de prata a um substrato de algodão, usando como agente ligante a carboximetilcelulose. Neste caso, os grupos carboxilo da carboximetilcelulose formaram ligações covalentes com os grupos hidroxilo do algodão, através de uma reação de esterificação. Posteriormente, as nanopartículas de prata ligaram-se à carboximetilcelulose (Figura 5), criando uma ligação forte e eficaz, uma vez que o substrato funcionalizado apresentou efeito antimicrobiano mesmo após 50 lavagens, com uma taxa de nanopartículas de prata na fibra de 87,5 %.

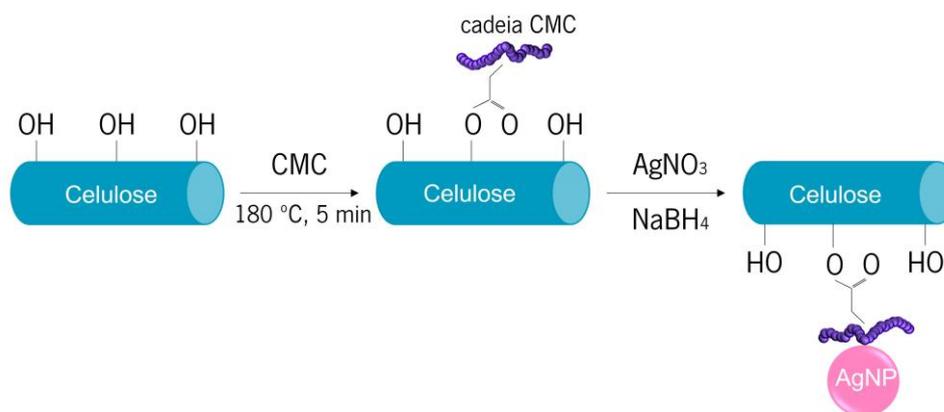


Figura 5: Esquema da ligação das AgNPs ao substrato de algodão, por meio da carboximetilcelulose (Xu *et al.*, 2018) (adaptado).

Chung *et al.* (1998) e Fan *et al.* (2015) verificaram que o ácido cítrico também pode ser utilizado como agente ligante entre a celulose e o quitosano, por meio de uma reação de esterificação: a reação entre os grupos carboxilo do ácido e os grupos hidroxilo da celulose ocorreu a temperaturas elevadas, sendo que no estudo, determinou-se que a temperatura adequada para termofixar o quitosano encontrava-se entre 170 °C a 190 °C, podendo ser utilizados catalisadores básicos não muito fortes, tais como o hipofosfito de sódio (SHP); as amostras funcionalizadas por este método apresentaram atividade antimicrobiana e resistência às lavagens (Chung, Lee and Kim, 1998; Öktem, 2003).

Sharaf *et al.* (2011) analisaram a utilização de diferentes agentes ligantes, e.g. ácido butano-1,2,3,4-tetracarboxílico (BTCA), para ligar quitosano à celulose. O BTCA, possuindo diversos grupos carboxilo, reagiu com os grupos hidroxilo da celulose através de uma esterificação a posteriormente com os grupos amina do quitosano, na presença de um catalisador (acetato de sódio trihidratado), formando grupos amida (Figura 6).

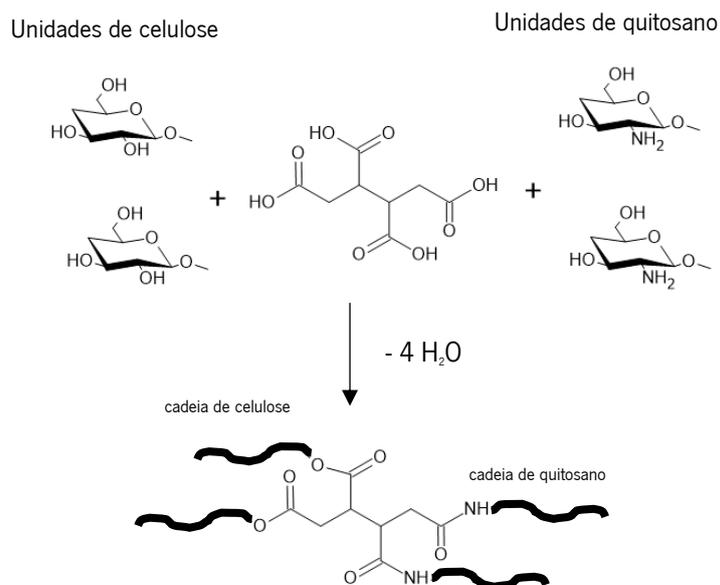


Figura 6: Ligação da celulose com quitosano através do agente ligante BTCA (Sharaf *et al.*, 2011) (adaptado).

Substratos Sintéticos (Poliéster)

A introdução, *in situ*, de carboximetil quitosano (CMCS) em poliéster foi estudada para perceber as interações que ocorriam entre os grupos amina do quitosano, e os grupos carboxilo do poliéster saponificado (Lv *et al.*, 2014). Os autores utilizaram dois métodos distintos para incorporar o CMCS no substrato: no primeiro método foram utilizados dois agentes de acoplamento, fazendo com que os grupos carboxilo do poliéster fossem atacados mais facilmente pelos grupos amina do CMCS; o segundo processo recorreu à utilização de uma polietilenoimina (PEI) e de glutaraldeído (GTA), que serviram como espaçadores, ligando o poliéster ao CMCS. A utilização do espaçadores (Lv *et al.*, 2014; Shim *et al.*, 2016) permite que os grupos funcionais estejam mais acessíveis. Ambos os métodos permitiram ligar os grupos carboxilo do poliéster saponificado, aos grupos amina do CMCS.

Para além do tratamento com plasma, Chang *et al.* (2008) analisaram também a introdução de quitosano no poliéster. Para o efeito, as amostras previamente oxidadas foram imersas numa solução aquosa com quitosano, e posteriormente ferveram a 95 °C durante 8 minutos. De seguida as amostras foram imersas em água desmineralizada e submetidas a um banho ultrassónico, durante 20 minutos. Deste modo, o quitosano foi fixado no substrato através da formação de

ligações covalentes de tipo amida, resultantes dos grupos carboxilo do PES oxidado e das aminas primárias do quitosano (Chang *et al.*, 2008).

Relativamente à aplicação de sericina no substrato de poliéster, com tratamento de plasma, os autores utilizaram o gluteraldeído (GTA), como agente ligante. Isto acontece porque, apesar do poliéster ter sido previamente submetido a um tratamento com plasma, a sericina não tem afinidade direta com o substrato e, deste modo, a utilização de GTA pode incrementar a durabilidade das ligações. A eficácia do GTA fora previamente comprovada noutro estudo (Gulrajani *et al.*, 2008), por meio de um corante ácido. O estudo mostrou que um aumento da concentração de GTA, até 10 mL/L, incrementava também o K/S do tingimento, pois o corante utilizado ligava-se aos grupos amina da sericina, cuja concentração também aumentava, com o aumento do GTA.

Substratos com Mistura (algodão-poliéster)

No que diz respeito a misturas de algodão e poliéster, Ibrahim *et al.* (2017) estudaram a funcionalização superficial de um substrato CO-PES com nanopartículas metálicas ligadas a quitosano, usando como agente ligante o ácido cítrico (AC) e como catalisador SHP por impregnação. A ligação do AC ao substrato formou uma ligação éster, derivada dos grupos hidroxilo da celulose e dos grupos carboxilo do AC, contudo, como o AC tem mais que um grupo carboxilo, os que não se ligaram ficaram disponíveis para novas ligações com aditivos que possuam grupos amina ou hidroxilo, por exemplo (Figura 7). Neste caso em concreto, os grupos carboxilo acabaram por se ligar aos grupos amina do quitosano. O estudo de amostras com diferentes misturas CO/PES indicou que a ligação quitosano-substrato ocorreu através das fibras de algodão e não do PES (quanto maior a % de CO, maior a solidez às lavagens, e maior a adesão de nitrogénio ao substrato).

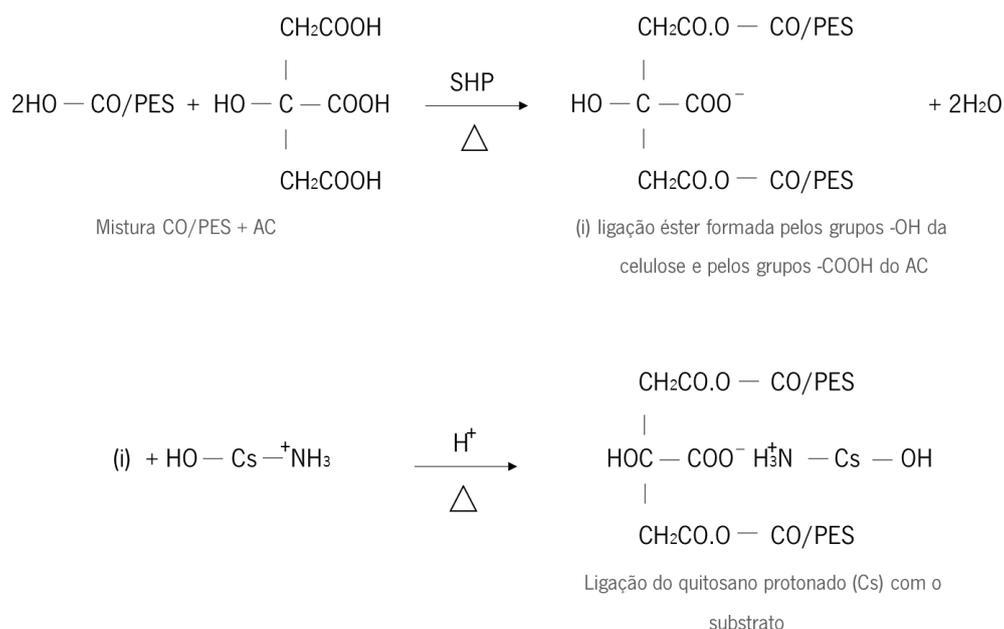


Figura 7: Criação de grupos -COOH num substrato de CO/PES para posterior ligação ao quitosano (Ibrahim *et al.*, 2017) (adaptado).

2.4.3. Caracterização Físico-química e Morfológica dos Têxteis Funcionalizados

A avaliação da percentagem de ancoragem permite verificar se, efetivamente as nanopartículas foram ancoradas ao substrato, e a quantidade ancorada. Por outras palavras, a avaliação permite analisar o rendimento da funcionalização dos substratos.

Deste modo, a percentagem de ancoragem, assim como a eficácia dos processos de funcionalização pode ser avaliada por técnicas quantitativas, como o XPS e a absorção atômica, métodos qualitativos, como o SEM e os semiquantitativos, como é o caso do FTIR ATR e da espectroscopia Ultra violeta e luz visível (UV-Vis) (Emam, 2019). Os métodos quantitativos permitem analisar a quantidade de nanopartículas ancoradas no substrato, enquanto os métodos qualitativos permitem analisar se as nanopartículas ligaram, de algum modo, ao substrato.

O FTIR ATR “é uma técnica utilizada para se obter o espectro infravermelho de absorção ou emissão” (Rodrigues, 2014) de um composto, neste caso, dos substratos têxteis. Grande parte das moléculas são capazes de absorver luz na região da radiação infravermelha, sendo que, a frequência de absorção é uma característica das suas estruturas. A absorção ocorre a frequências de ressonância, ou seja, quando a frequência da radiação absorvida corresponde à frequência vibracional da molécula. (*Fundamentos básicos FTIR*, 2021). Esta técnica permite assim identificar

a base química das fibras que compõe substratos têxteis, e a presença ou ausência de certos grupos funcionais aquando da realização de determinadas reações de ativação ou funcionalização dos substratos.

A espectroscopia XPS é uma técnica utilizada para caracterizar superfícies. Nesta técnica, os eletrões da amostra são ejetados por uma fonte de radiação eletromagnética, mais em concreto, os raios X. “A identificação dos elementos presentes na superfície do substrato é feita analisando as energias e ligações dos fotoeletrões” (Nascente, 2010). As energias de ligação dos eletrões são obtidas pela medição da sua energia cinética, tendo em consideração que a energia dos fotões incidentes é conhecida. No espetro, a intensidade, ou seja, a área integrada no pico fotoelétrico, está relacionada com a quantidade de átomos presentes na superfície detetada (Nascente, 2010). Esta técnica permite também identificar o tipo de ligação química e, em alguns casos, os estados de oxidação.

A Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM) utiliza um microscópio eletrónico com elevada profundidade de campo, que permite a criação de imagens tridimensionais das superfícies (Ferreira, 2016), após devida preparação das amostras (depositando, por exemplo, uma camada de metal, como ouro ou platina, que permite aumentar a resolução e o contraste da imagem). Este ensaio possibilita, por exemplo, analisar a presença de nanopartículas nos substratos têxteis.

Na Microscopia Eletrónica de Transmissão (TEM) os eletrões são focados num fino feixe energético e interagem com a amostra a analisar (também de baixa espessura). O contraste que se evidencia na imagem consequente a esta análise é resultado das interações entre o feixe de eletrões e a amostra (Zhou, Sternlicht and Padture, 2019). Esta microscopia origina imagens de maior resolução, permitindo ao utilizador observar, inclusive, estruturas de dimensões atómicas

A Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (EDX ou EDS) é outro método analítico utilizado para caracterizar quimicamente uma amostra. Nesta técnica, um equipamento frequentemente acoplado a um microscópio eletrónico de varrimento, “faz a avaliação química qualitativa e semiquantitativa das amostras” a partir da emissão de raios X (Rodrigues *et al.*, 2017). Deste modo é possível inferir quais são os elementos químicos que compõe a amostra.

A Difração de Raio X (XRD) permite obter informações estruturais sobre moléculas. Neste caso, uma radiação eletromagnética, os raios X, passam pela estrutura cristalina (grande parte

dos materiais podem formar cristais) da substância a analisar. Assim, podem ser determinadas as posições médias dos átomos na estrutura, as ligações covalentes entre os mesmos e a estrutura tridimensional das moléculas (Davey, 2019).

A Espectroscopia de Absorção Atômica (AAS) consiste na medição de quantidade de luz (radiação ótica) que é absorvida em determinados comprimentos de onda. Baseando-se no princípio que cada elemento (e ião) absorve luz num específico e único comprimento de onda, a amostra (no estado gasoso para permitir que os átomos estejam livres mas no seu estado fundamental – não ionizado) é irradiada com esse comprimento de onda e a quantidade de radiação absorvida (resultante da excitação do átomo) é medida, e a concentração de elemento na amostra é determinado. Usando diferentes comprimentos de onda, pode-se analisar e quantificar a presença de diferentes elementos numa amostra (Mustra, 2009).

A espectroscopia UV-Vis é um método quantitativo e/ou qualitativo que permite determinar a concentração de um composto (neste caso as NPs) em solução, ou detetar a presença e fazer uma análise qualitativa de compostos (neste caso as NPs) na superfície de substratos têxteis (usando um espectrofotómetro com uma esfera integradora, “que combina todos os feixes em diferentes direções”, e os direciona à ótica do detetor (Maria Fernanda Cerini, 2018). A concentração de nanopartículas pode ser determinada através da radiação absorvida pelas mesmas, utilizando a lei de Beer-Lambert.

Os métodos acima apresentados podem ser aplicados antes e depois de sucessivas lavagens, e de outras ações mecânicas nos substratos, que possam contribuir para a remoção/libertação de nanopartículas nos mesmos, de modo a perceber se as ligações são resistentes.

2.4.4. Métodos Para Avaliar a Atividade Antimicrobiana

Atualmente existem algumas normas direcionadas para o estudo da atividade antimicrobiana nos têxteis, tais como as normas AATCC 100, ISO 18184, AATCC 147 ou ISO 20743 que podem avaliar a atividade antibacteriana e a atividade antivírica, por métodos quantitativos (AATCC 147) e/ou qualitativos (AATCC 100; ISO 18184; ISO 20743).

Alguns dos ensaios realizados em testes antimicrobianos consistem na determinação da MIC ("*Minimum Inhibitory Concentration*"), um método semi-quantitativo que pode indicar não só se o substrato ou o agente antimicrobiano apresentam ou não atividade antimicrobiana, mas também

a concentração mínima para que esta inibição aconteça. A norma AATCC 147 por vezes é utilizada como alternativa às restantes, por ser mais fácil e rápida de realizar, e pode ser também utilizada como primeira ferramenta para analisar a atividade antimicrobiana dos substratos. O MIC, contudo, não determina as concentrações mínimas para “matar” ou inviabilizar os microrganismos, mas sim a concentração mínima para os inibir. A inibição dos microrganismos não indica se o agente antimicrobiano é bactericida/viricida ou bacteriostático/viroestático, e por esse motivo estuda-se a Concentração Mínima Bactericida (MBC) e a Concentração Mínima Viricida (MVC), segundo as normas AATCC 100; ISO 18184; ISO 20743.

Nos métodos qualitativos ocorre contagem de UFC (Unidades Formadoras de Colónias), no caso das bactérias e UFP (Unidades Formadoras de Placas), no caso do vírus. A presença de UFC e UFP indica a presença de microrganismo, sendo que, nas placas de Petri onde é realizado o ensaio, as bactérias manifestam-se sob a forma de colónias, sobre o meio nutritivo. No caso do vírus, as placas de Petri são previamente preparadas com um hospedeiro, como por exemplo, a *E. coli* e, posteriormente, na presença do vírus, ocorre o efeito citopático, ou seja, o vírus infeta e mata o hospedeiro, formando assim uma placa.

A contagem de UFC e UFP permite, então determinar a concentração de colónias de bactérias ou de vírus aumentou, diminuiu ou permaneceu estável na presença de um agente antimicrobiano. Se a concentração aumenta, indica que efetivamente, o agente antimicrobiano não é tem propriedades antimicrobianas. A diminuição da concentração indica que o agente antimicrobiano é viricida ou bactericida. Se a concentração permanecer estável, o mesmo é bacteriostático ou viroestático, ou seja, não inviabilizou os microrganismos, mas também não permitiu o crescimento dos mesmos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Substratos usados

Para este projeto foram utilizadas quatro malhas diferentes, fornecidas pela empresa INNOWEAR-TEX Kft. (Hungria), sendo elas em algodão cru (CO), algodão tingido (CO tingido - olive), mistura algodão-poliéster tingido (CO/PES), e poliéster branco (PES). Abaixo (Tabela 1) estão listadas as informações dos substratos, como fornecidas pela empresa.

Tabela 1: Informações técnicas dos substratos utilizados

	CO	CO tingido (olive)	CO/PES	PES
Composição	100 % Algodão	100 % Algodão	50 %-50 % Algodão-Poliéster	100 % Poliéster
Estrutura	Single Jersey	Single Jersey	Single Jersey	Bird Eye, agulha dupla
Gramagem (g/m²)	180	190	165	200
Cor	Cru	Olive	Verde Água	Branco
SOLIDEZ DA COR				
Luz	-	5	5	5
Lavagem (40^oc)	-	5	5	5
Suor ácido	-	4-5	4-5	4-5
Suor alcalino	-	4-5	4-5	4-5
Fricção a seco	-	5	5	5
Fricção a húmido	-	5	4-5	5
ACABAMENTOS				
Pilling	-	4	3-4	4-5
Estabilidade dimensional	Comprimento	-2	-1	-1
	Largura	-3	+1	-2

A **solidez da cor** é avaliada segundo as normas EN ISO 105-B02:2001 (Solidez da cor à luz); EN 20105 C01:1995 (Solidez à lavagem a 40 °C); EN ISO 105-E04:2000 (Solidez ao suor ácido e alcalino); EN ISO 105-X12:2003 (Solidez à fricção a seco e a húmido). Em todas elas a cor é comparada a uma escala de cinzas, de 1 a 5, para avaliar as alterações da cor do substrato, onde 1 indica que houve uma alteração significativa de cor e 5 indica que não se verifica alteração de cor.

A **estabilidade dimensional** é avaliada segundo a norma EN ISO 25077:2000. Através da mesma, é calculada a percentagem de encolhimento, representada pelo sinal negativo (-) ou de alongamento, representada pelo sinal positivo (+).

O **pilling** foi avaliado segundo a norma EN ISO 12945-1:2001. Para a mesma também é utilizada uma escala de 1 a 5, através da comparação com fotografias, onde 1 corresponde a uma maior formação de borboto e 5 corresponde à ausência do mesmo.

As estruturas das malhas estão representadas a seguir:

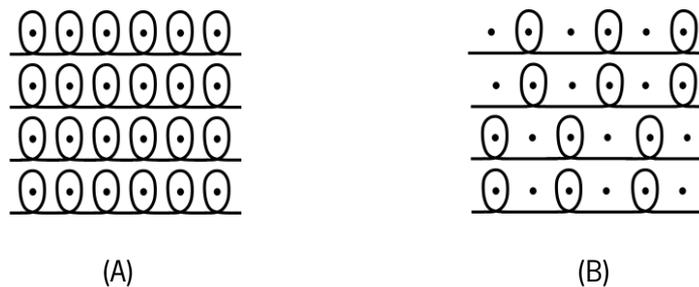


Figura 8: Estruturas das malhas utilizadas. (A) Single Jersey; (B) Bird Eye (agulha dupla).

3.2. Pré-tratamentos dos substratos

Os pré-tratamentos dos substratos têxteis permitem preparar o material e a criação de grupos químicos na sua superfície que potencializem a ligação das NPs de ouro com os mesmos. Ao longo do projeto, foram estudados alguns métodos de pré-tratamento, e analisou-se a influência destes quer na ligação inicial das nanopartículas, quer na resistência à lavagem. Começou-se por analisar se os substratos apresentavam hidrofiliidade (teste expedito, observando-se apenas se o substrato absorvia uma gota de água), submetendo os substratos com carácter hidrófobo a pré-tratamentos simples. Posteriormente, e após alguns ensaios de funcionalização com as NPs, procederam-se a outros pré-tratamentos, numa tentativa de aumentar a uniformidade e solidez dos substratos funcionalizados. Todos os pré-tratamentos aplicados nos substratos estão expostos na Tabela 2, e os respetivos procedimentos são apresentados na Tabela 3.

Tabela 2: Pré-tratamentos aplicados em cada um dos substratos têxteis

Substrato	Hidrofiliidade	Pré-tratamento
100 % Algodão Cru	Baixa	Lavagem
		Meia Branqueação
		Hidrólise Alcalina
		Plasma (O ₂)
		Plasma (N ₂)
100 % Algodão Tingido (Olive)	Baixa	Lavagem
Mistura 50 % Algodão 50 % Poliéster (Verde)	Elevada	Plasma Atmosférico
100 % Poliéster	Elevada	Plasma Atmosférico

Tabela 3: Procedimentos dos pré-tratamentos realizados nos substratos têxteis

Pré-tratamento	Procedimento
Lavagem	<p>Equipamento: máquina de lavagem doméstica</p> <p>Temperatura: 40 °C;</p> <p>Duração: 60 minutos;</p> <p>› 4 g/L detergente ECE não fosfatado</p> <p>Secagem em máquina de secar</p>
Meia Branqueação	<p>Equipamento: Mathis Labor Jumbo Jet JFO</p> <p>Temperatura: 98 °C;</p> <p>Duração: 30 minutos;</p> <p>› 0,5 g/L Diadavin UN;</p> <p>› 0,5 g/L Tannex GEO;</p> <p>› 2 mL/L Soda cáustica 50 %;</p> <p>› 3 mL/L Água Oxigenada 200 vol. 50 %</p> <p>Posterior neutralização do peróxido de hidrogénio com um banho 1 g/L Baylas EFR, a 50 °C por 10 min, seguido de lavagem com 1 g/L ácido acético a 50 °C por 10 min (para baixar o pH até 6).</p>
Hidrólise Alcalina	<p>Equipamento: Mathis Labomat BFA</p> <p>Temperatura: 55 °C;</p> <p>Duração: 30 minutos;</p> <p>› 120 g/L Soda Cáustica;</p> <p>› Razão de banho 1:20</p> <p>Após o esgotamento, lavou-se com uma solução com ácido acético diluído (5 %), em fervura, por 10 min.</p>
Plasma (O₂)	<p>Equipamento: Plasma de pressão atmosférica de descarga de barreira dielétrica (DBD) - Sigma Technologies International – Atmospheric Plasma Treatment System</p> <p>› Gás reativo: Oxigénio com fluxo 450 sccm</p> <p>› Gás de arraste: Árgon com fluxo de 15000 sccm</p> <p>› Frequência: 3,8 m/min</p> <p>› Potência: 15000 W</p>
Plasma (N₂)	<p>Equipamento: Plasma de pressão atmosférica de descarga de barreira dielétrica (DBD) - Sigma Technologies International – Atmospheric Plasma Treatment System</p> <p>› Gás reativo: Azoto com fluxo 450 sccm</p> <p>› Gás de arraste: Árgon com fluxo de 15000 sccm</p> <p>› Frequência: 3,8 m/min</p> <p>› Potência: 15000 W</p>
Plasma em ar	<p>Equipamento: Protótipo de plasma de pressão atmosférica (DBD) semi-industrial (Softal Electronics GmbH/Universidade do Minho)</p> <p>› Gás reativo: Sem gás reativo</p> <p>› Frequência: 4 m/min</p> <p>› Potência: 1000 W</p>

3.3. Nanopartículas de ouro

As nanopartículas utilizadas foram desenvolvidas e sintetizadas pelo Instituto Jožef Stefan, e seguiram o protocolo da patente europeia EP 2863751 B1. Em cada falcon foram sintetizadas e funcionalizadas AuNPs (tamanho cerca de 20 nm) com arginina e grupos NH_2 e COOH . As dispersões foram centrifugadas, durante 15 minutos a 5000 rpm e separou-se o precipitado do sobrenadante, e conservou-se nos tubos falcon.

No total receberam-se 3 *batches* de AuNPs, sendo o primeiro constituído por 11 tubos falcon, com 60 mg de AuNPs cada, e o segundo e terceiro constituídos por 24 e por 17 tubos falcon, respetivamente, todos eles com 20 mg de AuNPs. Antes de cada utilização, tendo em conta que as AuNPs foram centrifugadas, diluiu-se as mesmas em água destilada (de acordo com indicações do próprio instituto), para uma concentração inicial de 0,4 mg/mL. Devido à elevada deposição e aglomeração das AuNPs, estas foram submetidas a ultrassons, para aumentar a dispersão (PRESET SW3H da SonoSwiss, 80 W, temperatura ambiente).

3.4. Funcionalização dos substratos

A funcionalização dos substratos ocorreu por impregnação e por esgotamento. Os dois métodos foram aplicados em condições semelhantes para, numa fase posterior, comparar qual dos dois seria o mais adequado para uma aplicação industrial.

Para a funcionalização dos substratos foram utilizados, além das nanopartículas de ouro, alguns produtos auxiliares:

- › Carbonato de Sódio: Utilizado para aumentar o pH da dispersão de impregnação/esgotamento, de modo a promover a fixação das nanopartículas no substrato;
- › Surfactantes (surfactante A – não iónico com propriedades molhantes, emulsionantes e anti-espumantes; surfactante B – aniónico, de base éster alifático, com propriedades molhantes e anti-espumantes; surfactante C – não iónico, de base aril poliglicol éter, com propriedades emulsionantes e dispersantes; surfactante D – não iónico, com propriedades emulsionantes e dispersantes):

Utilizados para dispersar e homogeneizar as nanopartículas nas dispersões de impregnação/esgotamento, para evitar manchamento das amostras;

- › *Crosslinkers* (Glutaraldeído e ácido cítrico): utilizados para promover ligações covalentes entre AuNPs e os substratos têxteis.

3.4.1. Impregnação

Para a impregnação dos substratos com nanopartículas de ouro, utilizaram-se os equipamentos *Mathis Padder (Foulard) HVF*.

O processo utilizado está esquematizado na Figura 9. Inicialmente foi preparada uma suspensão com as nanopartículas de ouro, através da dispersão das mesmas, em água destilada, para a concentração desejada. Posteriormente foram adicionados, à mesma dispersão, os aditivos necessários, nas concentrações descritas na Tabela 5. O substrato (amostra com 1 g) foi imerso na dispersão durante cerca de 2 minutos. Ao fim desse tempo, o mesmo foi espremido nos rolos espremedores da *Mathis Padder (Foulard) HVF*, com uma taxa de expressão de $\approx 100\%$. A secagem do substrato ocorreu a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 6 minutos, seguida de termofixação a $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 minutos. A amostra foi lavada com água quente para retirar os materiais não fixados e secou à temperatura ambiente.

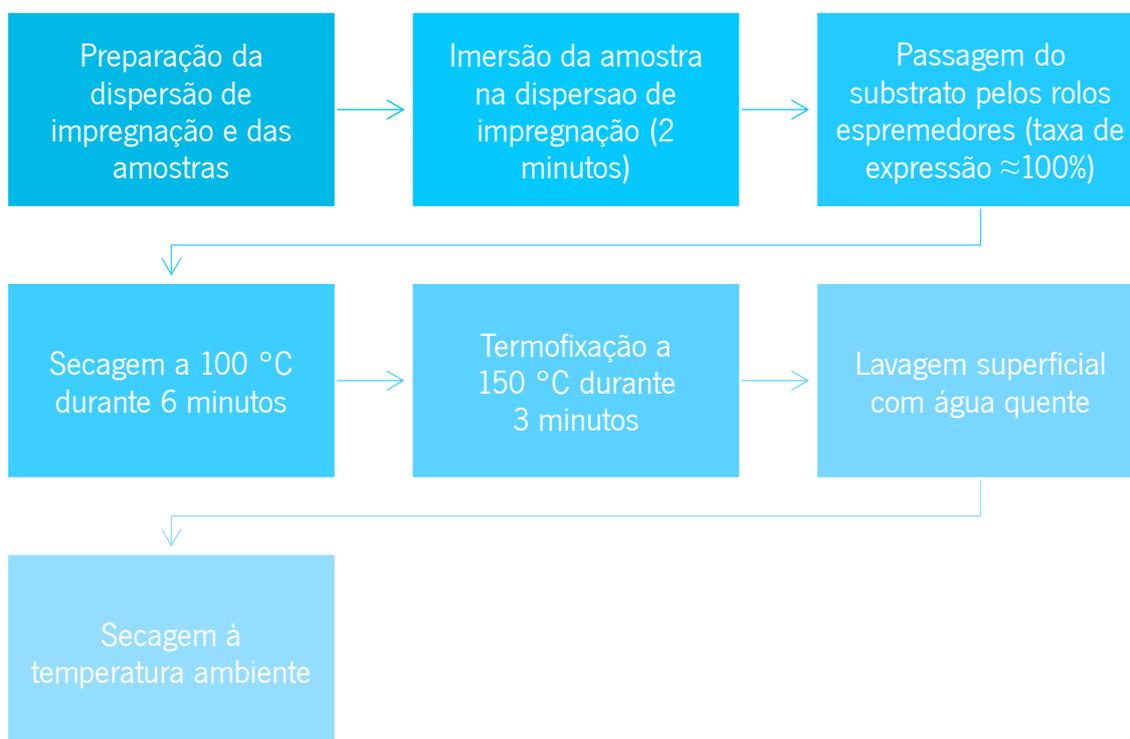


Figura 9: Esquema do processo de impregnação utilizado.

Na primeira impregnação aplicada, em todos os substratos, foi ainda possível definir as condições de impregnação para cada um dos substratos, para saber qual era a pressão dos rolos espremedores a aplicar nos ensaios seguinte, como é possível verificar na Tabela 4.

Tabela 4: Definição da pressão dos rolos espremedores para cada um dos substratos

Substrato	Peso Inicial	Peso Final	Taxa de expressão	Pressão dos rolos espremedores
CO cru com lavagem	5,85 g	11,47 g	96 %	0,4 bar
CO cru com meia-branqueação	5,28 g	11,05 g	109 %	1 bar
CO/PES	4,59 g	9,22 g	100 %	0,8 bar
PES	4,16 g	8,46 g	102 %	1 bar

Tabela 5: Processos de impregnação realizados ao longo do projeto de dissertação, usando dispersões de nanopartículas de ouro, e os diferentes substratos têxteis

Substrato têxtil	Ensaio	Falcon (<i>batch</i>)	Concentração NPs	pH	Produtos Auxiliares	
CO cru com lavagem	1	Falcon 8 (1° <i>batch</i>)	5x10 ⁵ g/mL	6-7	Nenhum	
CO cru com meia branqueação	1	Falcon 8 (1° <i>batch</i>)				
	2	Falcon 8 (1° <i>batch</i>)	1,2 mg/mL			
			0,9 mg/mL			
			0,6 mg/mL			
			0,3 mg/mL			
	5	Falcon S4 (2° <i>batch</i>)	0,3 mg/mL	9	Carbonato de Sódio (q.b.)	
			0,1 mg/mL			
	6	Falcon S13 (2° <i>batch</i>)	0,1 mg/mL	9	Carbonato de Sódio (q.b)	Surfactante A (4 g/L)
				Surfactante B (1,5 g/L)		
				Surfactante C (3 g/L)		
CO tingido (olive) com lavagem	1	Falcon 8 (1° <i>batch</i>)	5x10 ⁵ g/mL	6-7	Nenhum	
PES/CO	1	Falcon 8 (1° <i>batch</i>)	5x10 ⁵ g/mL	6-7		
PES	1	Falcon 8 (1° <i>batch</i>)	5x10 ⁵ g/mL	6-7	Nenhum	

3.4.2. Esgotamento

Os processos de esgotamento foram realizados numa *Mathis Labomat BFA*. Ao longo do projeto de dissertação foram realizados diversos ensaios, onde foram testadas diferentes variáveis, tais como a temperatura, o tempo, razão de banho e concentração das AuNPs. Todos os ensaios realizados estão inseridos na Tabela 6, onde estão expostas as diferentes variáveis dos processos. No final do processo de esgotamento todas as amostras foram lavadas superficialmente em água corrente, secas e termofixadas na secadeira, a 100 °C durante 6 minutos e a 150 °C durante 3 minutos, respetivamente. O processo de esgotamento está esquematizado na Figura 10.

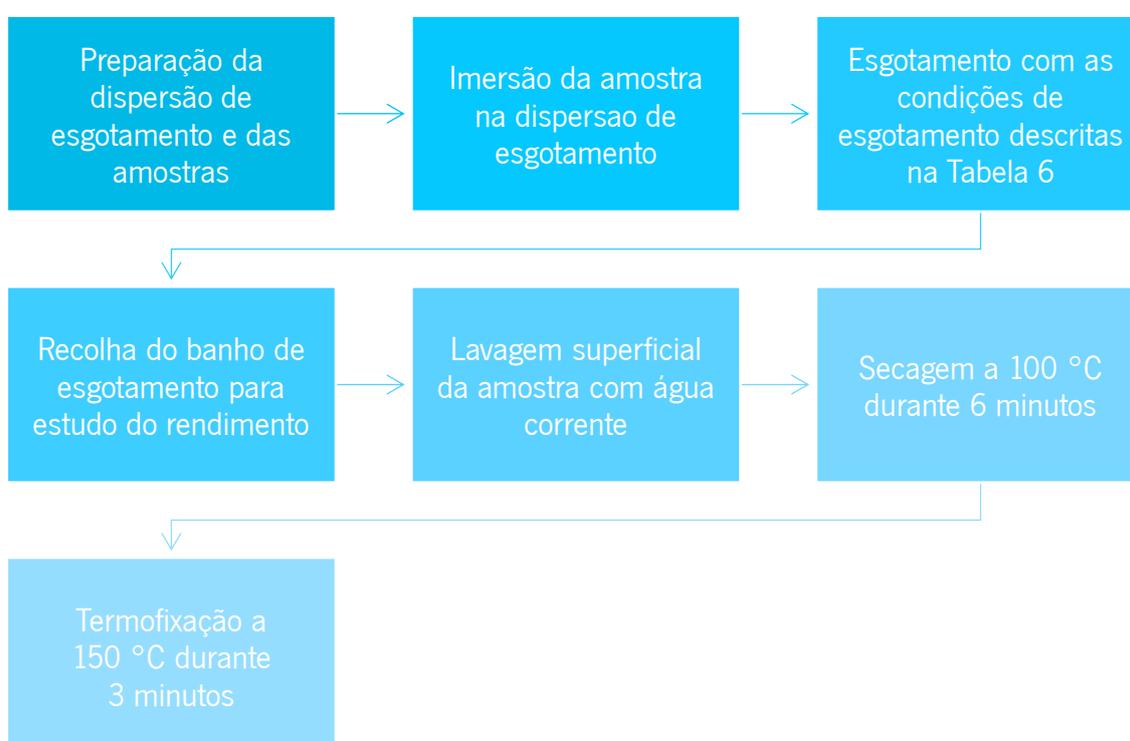


Figura 10: Esquema do processo de esgotamento utilizado.

Inicialmente foram utilizadas amostras retangulares, com o valor da massa dependente da razão de banho. Posteriormente passou-se a utilizar amostras costuradas de maneira formando uma estrutura tubular, para diminuir o manchamento. Cada amostra foi costurada do avesso e posteriormente virada para o direito da malha, por forma a que a costura se mantivesse no interior, como está representado na Figura 11.

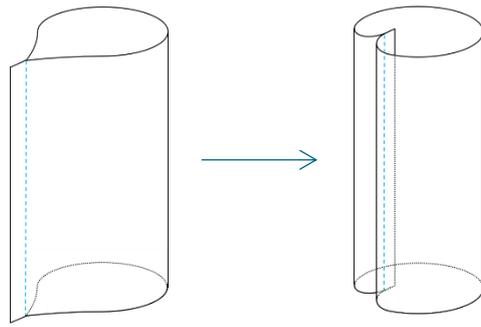


Figura 11: Representação esquemática das amostras com estrutura tubular.

Tabela 6: Processos de esgotamento realizados ao longo do projeto de dissertação, usando dispersões de nanopartículas de ouro, e os diferentes substratos têxteis

Substrato Têxtil	Ensaio	Falcon/ Batch	Concentração NPs	pH	Temperatura	Tempo	Razão de Banho	Produtos Auxiliares		
CO cru com meia branqueação	3	Falcon 8/ 1° batch	0,3 mg/mL	6-7	60 °C	60 minutos	1:20	Nenhum		
				9				Carbonato de Sódio (q.b)		
	4	Falcon 8/ 1° batch	0,1 mg/mL					Carbonato de Sódio (q.b)		
	5	Falcon S4/ 2° batch	0,3 mg/mL	9	60 °C	60 minutos	1:20	Carbonato de Sódio (q.b)		
			0,1 mg/mL							
	6	Falcon S13/ 2° batch	0,1 mg/mL	9	60 °C	60 minutos	1:20	Carbonato de Sódio (q.b)	Surfactante A (4 g/L)	
									Surfactante B (0,5 g/L)	
									Surfactante C (3 g/L)	
	7	Falcon S12/ 2° batch	0,1 mg/mL	9	60 °C	60 minutos	1:20	Carbonato de Sódio (q.b) Surfactante B (0,5 g/L)		
							1:12			
							1:7			
	8	Falcon S12/ 2° batch	0,1 mg/mL	9	30 °C	30 minutos	1:20			
1:7										
9	Falcon S18/ 2° batch	0,1 mg/mL	9	60 °C	60 minutos	1:20	Carbonato de Sódio (q.b) Surfactante A (4 g/L)			
						1:12				
						1:7				

	10	Falcon S27/ 2° batch	0,1 mg/mL	9	60 °C	60 minutos	1:20	Carbonato de Sódio (q.b) Surfactante A (4 g/L) Surfactante D (5 g/L)				
					30 °C	30 minutos						
	11	Falcon S27 e Falcon S17/ 2° batch	0,1 mg/mL	9	20 °C	10 minutos				1:20	Carbonato de Sódio (q.b) Surfactante A (4 g/L) Surfactante D (5 g/L)	
					20 °C	60 minutos						
					50 °C	35 minutos						
					80 °C	10 minutos						
					80 °C	60 minutos						
	12	Falcon S20/2° batch	0,1 mg/mL	9	70 °C	10 minutos				1:20	Carbonato de Sódio (q.b) Surfactante A (4 g/L) Surfactante D (5 g/L)	
	13	Falcon S8 e Falcon S25/ 2° batch	0,06 mg/mL	9	70 °C	10 minutos				1:20		
			0,08 mg/mL									
			0,1 mg/mL									
			0,3 mg/mL									
	14	Falcon S21/ 2° batch	0,1 mg/mL	9	70 °C	10 minutos	1:20	Carbonato de Sódio (q.b)	Surfactante A (4 g/L) Surfactante D (5 g/L) Surfactante B (0,5 g/L) Surfactante D (5 g/L)			
	15	Junção do restante de todos os Falcons do 2° batch	0,06 mg/mL	9	70 °C	10 minutos	1:20	Carbonato de Sódio (q.b) Surfactante A (4 g/L) Surfactante D (5 g/L)				
			0,08 mg/mL									
0,1 mg/mL												

			0,3 mg/mL						
	16	Junção do restante de todos os Falcons do 2° <i>batch</i>	0,1 mg/mL	9	70 °C	10 minutos	1:20	Carbonato de Sódio (q.b) Surfactante A (4 g/L) Surfactante D (5 g/L)	
	17	Junção do restante de todos os Falcons do 2° <i>batch</i>	0,1 mg/mL	9	70 °C	10 minutos	1:20	GTA (4,68 g/L) Carbonato de Sódio (q.b)	Surfactante A (4 g/L) Surfactante D (5 g/L)
2,5				Ácido Cítrico (9 g/L) SHP (0,32 g/L)					
	18	Junção de todos os Falcons do 3° <i>batch</i>	0,1 mg/mL	9	70 °C	10 minutos	1:20	Carbonato de Sódio (q.b) Surfactante A (4 g/L) Surfactante D (5 g/L)	
0,3 mg/mL									
CO cru com meia branqueação e hidrólise alcalina	17	Junção do restante de todos os Falcons do 2° <i>batch</i>	0,1 mg/mL	9	70 °C	10 minutos	1:20	Carbonato de Sódio (q.b) Surfactante A (4 g/L) Surfactante D (5 g/L)	
CO cru com meia branqueação e plasma (O2)	17	Junção do restante de todos os Falcons do 2° <i>batch</i>	0,1 mg/mL	9	70 °C	10 minutos	1:20	Carbonato de Sódio (q.b) Surfactante A (4 g/L) Surfactante D (5 g/L)	
CO cru com meia branqueação e plasma (N2)	17	Junção do restante de todos os Falcons do 2° <i>batch</i>	0,1 mg/mL	9	70 °C	10 minutos	1:20	Carbonato de Sódio (q.b) Surfactante A (4 g/L) Surfactante D (5 g/L)	

CO tingido (olive) com lavagem	16	Junção do restante de todos os Falcons do 2° <i>batch</i>	0,1 mg/mL	9	70 °C	10 minutos	1:20	Carbonato de Sódio (q.b) Surfactante A (4 g/L) Surfactante D (5 g/L)
	18	Junção de todos os Falcons do 3° <i>batch</i>	0,1 mg/mL	9	70 °C	10 minutos	1:20	Carbonato de Sódio (q.b) Surfactante A (4 g/L) Surfactante D (5 g/L)
			0,3 mg/mL					
CO/PES (Verde)	16	Junção do restante de todos os Falcons do 2° <i>batch</i>	0,1 mg/mL	9	70 °C	10 minutos	1:20	Carbonato de Sódio (q.b) Surfactante A (4 g/L) Surfactante D (5 g/L)
CO/PES (verde) com plasma atmosférico	18	Junção de todos os Falcons do 3° <i>batch</i>	0,1 mg/mL	9	70 °C	10 minutos	1:20	Carbonato de Sódio (q.b) Surfactante A (4 g/L) Surfactante D (5 g/L)
			0,3 mg/mL					
PES	16	Junção do restante de todos os Falcons do 2° <i>batch</i>	0,1 mg/mL	9	70 °C	10 minutos	1:20	Carbonato de Sódio (q.b) Surfactante A (4 g/L) Surfactante D (5 g/L)
PES com plasma atmosférico	18	Junção de todos os Falcons do 3° <i>batch</i>	0,1 mg/mL	9	70 °C	10 minutos	1:20	Carbonato de Sódio (q.b) Surfactante A (4 g/L) Surfactante D (5 g/L)
			0,3 mg/mL					

3.4.3. Design of Experiments (DoE)

O DoE é um método estatístico utilizado para otimizar um determinado processo avaliando, para o efeito, a influência de diferentes fatores em simultâneo, e possíveis efeitos sinérgicos entre estes, de forma a obter-se valores ótimos para o processo, com a realização de um número reduzido de ensaios. Este método permite reduzir o tempo e custos do processo, promovendo uma melhoria do rendimento do mesmo (Gunst, Myers and Montgomery, 1996).

A primeira fase do DoE consiste na seleção dos fatores de controlo a avaliar. A quantidade de ensaios a realizar pode ser determinada através de uma análise fatorial 2^k , sendo k igual ao número de fatores a analisar. Por exemplo, se forem avaliados os fatores tempo (x_1) e temperatura (x_2), a quantidade de ensaios será 2^2 . Por outro lado, se forem avaliados três fatores, como por exemplo, tempo, temperatura e pressão, a quantidade de ensaios será 2^3 (Tabela 7). Para cada fator é definido um valor máximo e um mínimo, que serão testados de forma que os ensaios cubram todo o espetro de valores possíveis para cada fator. É também recomendado o uso de pontos intermédios para cada fator, para que a previsão das condições ideais seja mais precisa e possa prever se a resposta (fatores medidos na experiência) é linear ou não relativamente a cada fator.

Tabela 7: Esquema fatorial para ensaios com três variáveis a avaliar

Fator x_1	Fator x_2	Fator x_3
+1	+1	+1
+1	+1	-1
+1	-1	+1
+1	-1	-1
-1	+1	+1
-1	+1	-1
-1	-1	+1
-1	-1	-1

Neste trabalho, foi utilizada a metodologia de DoE para avaliar o efeito da variação sinérgica dos vários fatores em estudo. Para tal, foi realizado um planeamento fatorial completo 2^2 , variando o Tempo (entre 10 e 60 min) e a Temperatura (entre 20 °C e 80 °C). Assim, foi gerado um total de 7 ensaios (contemplando 3 réplicas no ponto central), como mostra a Tabela 8.

Tabela 8: Esquema fatorial para ensaios realizados, com duas variáveis

Tempo (minutos)	Temperatura (°C)
10	20
10	80
60	20
60	80
35	50
35	50
35	50

No final da funcionalização dos substratos (ensaio 11, Tabela 6), foi avaliada a solidez dos substratos à lavagem, através dos valores da refletância antes e após as lavagens das diferentes amostras, assim como os valores da absorbância dos banhos após esgotamento e da dispersão mãe. O software State-Ease® 'Design Expert' (versão 12) foi usado para a análise das regressões e análise gráfica dos dados obtidos. A significância estatística do modelo e seus coeficientes foi determinada pelo teste *t-Student*, a regressão linear pelo teste de *Fischer* e a variância do modelo pelo coeficiente de regressão múltiplo, R^2 .

Os dados obtidos após realização dos ensaios permitiram o ajuste dos mesmos a um modelo linear, tendo sido usada a ANOVA para a determinação da significância dos coeficientes e do modelo linear obtido. A análise estatística detalhada está a ser compilada para a escrita de uma comunicação e/ou publicação.

3.5. Avaliação da Funcionalização dos substratos

3.5.1. Lavagens

Para analisar se as nanopartículas ficaram devidamente ligadas aos substratos realizaram-se lavagens com uma solução de lavagem com 4 g/L de detergente ECE não fosfatado. As lavagens ocorreram na *Mathis Labomat BFA*, com uma razão de banho 1:20, durante uma hora, a 40 °C. No final da lavagem, as amostras foram lavadas com água corrente quente, e secas na secadeira, a 100 °C.

3.5.2. Análise UV-Vis

Todas as amostras funcionalizadas foram analisadas no espectrofotômetro UV-VIS, antes e após lavagens, visto que as nanopartículas conferiam cor ao substrato. Analisaram-se também as dispersões de esgotamento antes e após o processo, para analisar a quantidade de NPs que passaram das dispersões para os substratos.

Para os ensaios, utilizou-se o espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu UV-2600i, com feixe duplo. O equipamento possui um acessório de leitura de cuvetes, para ler líquidos, e ainda uma esfera integradora (ISR-2600 plus) que permite a leitura da refletância difusa ou total em têxteis.

As propriedades óticas das amostras têxteis foram analisadas através dos espectros de refletância total entre 220 e 1400 nm, com uma resolução espectral de 0,5 nm. As propriedades óticas das dispersões foram analisadas através dos espectros de absorção entre 185 e 900 nm, com uma resolução espectral de 1,0 nm.

3.5.3. Absorção Atômica

Para os ensaios de absorção atômica foi necessário, numa primeira fase, dissolver as AuNPs, assim como os substratos têxteis utilizando-se, para o efeito, água régia, com uma razão de banho 1:20. O procedimento de digestão foi o seguinte:

- › Adicionou-se Ácido Nítrico (HNO_3) a Ácido Clorídrico (HCl) numa proporção 1:3;
- › Esperou-se cerca de 10 minutos, até a solução adquirir uma tonalidade avermelhada, e libertar bolhas;
- › Humedeceu-se as amostras de substrato, de modo a diminuir a violência da reação;

- › Num gobelé, adicionou-se 20 mL de solução de água régia a 1g de amostra têxtil, e aqueceu-se numa placa;
- › À medida que a solução fervia, adicionou-se água destilada, e agitou-se com uma vareta para promover a digestão dos têxteis;
- › No final da digestão, filtrou-se o conteúdo do gobelé, e conservou-se num balão volumétrico de 25 mL, ajustando-se o volume.

Após a digestão dos substratos, as soluções foram submetidas ao ensaio de absorção atómica, de modo a detetar a quantidade de ouro presente nas mesmas. Para tal foi utilizado o equipamento novaAA® 350 AJ Analytical Instrumentation.

3.5.4. Microscopias SEM, TEM e Espetroscopia EDX

Alguns ensaios SEM, TEM e EDX foram realizados pelo Instituto Jožef Stefan, seguindo os seguintes procedimentos:

- › As NPs, em pó, foram analisadas por TEM, usando um microscópio JEOL JEM-2100 da Jeol Ltd., a 200 kV, com um suporte de amostra de berílio com inclinação dupla para determinar a morfologia das AuNPs. Os pós foram dispersos ultrassonicamente em água e depositados em filmes de carbono rendados, suportados por uma grelha de cobre de 300 mesh;
- › As amostras têxteis funcionalizadas, e após 20 lavagens foram analisadas por SEM, realizado num microscópio FESEM, JSM-7600F. As amostras foram cortadas em pedaços de 5 mm² e depositadas com carbono para conferir condutividade;
- › A análise química foi realizada usando espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (INCA Oxford 350 EDS).

Na Universidade do Minho também foram realizados ensaios SEM e EDX, seguindo os seguintes protocolos:

- › As amostras têxteis funcionalizadas com 1 lavagem foram analisadas por SEM, realizado num microscópio JEOL, JSM-6010LV. As amostras foram cortadas em pedaços de 5 mm² e metade das mesmas foram revestidas com ouro, para conferir condutividade;
- › A análise química foi realizada usando espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (X-act, Oxford Instruments INCA).

3.5.5. FTIR

Estes ensaios foram realizados pelo Instituto Jožef Stefan e seguiram o seguinte procedimento:

- › Os espectros de FTIR foram adquiridos num espectrómetro Spectrum One (Perkin-Elmer) na janela espectral entre 4000 e 400 cm^{-1} , com uma resolução espectral de 4 cm^{-1} e no modo de transmitância usando a técnica ATR.

3.5.6. Solidez ao Suor

Para o ensaio da solidez ao suor, adaptou-se a norma NP EN ISO 105 E04 – Ensaio de solidez dos tintos. Parte 04 – Solidez dos tintos ao suor. Como o principal objetivo era analisar se havia perda de AuNPs, ao invés de se analisar a cor das amostras, analisou-se o banho resultante do ensaio, através de absorção atômica, para verificar se havia vestígios de ouro no mesmo. Houve ainda adaptações de tamanho da amostra, devido à escassez de recursos e apenas se realizou o ensaio ao suor alcalino.

Para o ensaio da solidez ao suor, o procedimento foi o seguinte:

- › Cortaram-se amostras de 0,5 g de cada um dos substratos a analisar;
- › Preparou-se 500 mL de solução alcalina, segundo a norma NP EN ISO 105 E04 – 0,5 g/L de mono-cloridrato de L-histidina mono-hidratada ($\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_2\text{N}_3 \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$); 5 g/L de cloreto de sódio (NaCl); 2,5 g/L de mono-hidrogenofosfato dissódico di-hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$);
- › Ajustou-se o pH da solução para 8, adicionando hidróxido de sódio 0,1 mol/L;
- › A cada uma das amostras têxteis, juntou-se 50 mL de solução alcalina e aqueceu-se, em banho-maria, a 37 °C, com agitação 20 rpm;
- › Recolheu-se uma amostra de 10 mL de banho de cada amostra ao fim de 0, 30, 60 e 240 minutos.

As dispersões obtidas foram posteriormente tratadas com água régia, para dissolução do ouro presente tornando, deste modo, possível a leitura por absorção atômica.

3.5.7. Avaliação da Atividade Antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana dos substratos têxteis foi realizada no Laboratório de Microbiologia da Universidade do Minho, com nível de segurança biológico de classe 2, sob a

orientação do Doutor Jorge Padrão, e também no Instituto Jožef Stefan (ensaio realizados pelos técnicos do instituto).

Para os ensaios foram utilizadas adaptações das normas AATCC 100 e ISO 18184 para os métodos quantitativos, através da determinação do MVC (Minimum Virucidal Concentration) e do MBC (Minimum Bactericidal Concentration); e AATCC 147 para os métodos qualitativos, através da determinação do MIC (Minimum Inhibitory Concentration). Os métodos quantitativos permitem contabilizar o número de Unidades Formados de Colónias (UFC) no caso das bactérias, ou o número de Unidades Formadoras de Placas (UFP) no caso do vírus. Nos ensaios qualitativos analisa-se visualmente e/ou através do espectrofotómetro UV-VIS a atividade antibacteriana do substrato ou do agente antibacteriano, mediante a densidade ótica.

Ensaio realizados no Instituto Jožef Stefan

Os testes antibacterianos foram realizados em duas estirpes gram-negativas [*Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) (ATCC 156921)] e duas estirpes gram-positivas [*Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Bacillus subtilis* (estirpe 186)]. As estirpes gram-negativas foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB), e as estirpes gram-positivas foram cultivadas em meio nutritivo (NM) Mueller-Hinton (MH) e plaqueadas no mesmo meio NM, aditivado com ágar (NA). Os testes foram realizados em amostras têxteis funcionalizadas com as NPs e não funcionalizadas, após 1 ou 20 lavagens.

Protocolo do método qualitativo (norma AATCC 147): após cultura das bactérias durante a noite em NM, estas foram diluídas 10x usando solução tampão fosfato estéril (PBS), para a preparação de inóculo bacteriano para os testes subsequentes. Foram feitas três estrias de cada inóculo diluído sobre uma placa de Petri com NA, com a ajuda de uma ansa de inoculação. As amostras têxteis (1,0 x 1,5 cm) foram colocadas sobre as estrias, garantindo o contacto íntimo com a superfície do ágar. As placas de Petri foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Em paralelo, foram preparadas placas com têxteis não funcionalizados, e controlos sem têxteis. Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

Protocolo do método quantitativo (norma AATCC 100): as amostras foram preparadas em quadrados de 2,5 cm². Após a cultura das bactérias durante a noite, estas foram diluídas para 2 x 10⁵ UFC/mL em meio NM, para a preparação de inóculo bacteriano para os testes subsequentes. Em seguida, 0,5 mL foi colocado em cada amostra. As amostras foram incubadas durante 24

horas a 37 °C e 90 % de humidade. Após o período de incubação, foram adicionados 10 mL de PBS estéril e as amostras foram colocadas no agitador vórtice. O líquido resultante da lavagem foi diluído em série e semeado em meio NA fresco, e incubado por mais 24 horas a 37 °C (sem tecido) para determinar o número de bactérias sobreviventes. Uma parte do líquido de lavagem foi misturado com meio NM fresco (1:1), colocado numa placa de 96 poços e investigada quanto à cinética de crescimento bacteriano das bactérias sobreviventes (leitor de multiplacas: H1 Hybrid Multi-mode Microplate Reader da Synergy). O têxtil obtido após a lavagem foi colocado em placas com meio NA fresco e incubado durante 24 horas a 37 °C para detetar qualquer bactéria remanescente no têxtil após a lavagem. Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

Ensaio realizado na Universidade do Minho

Os testes antibacterianos foram realizados em duas estirpes gram-negativas [*E. coli* (American Type Culture Collection - ATCC - 25922) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853)] e uma estirpe gram-positiva [*Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984)]. No caso do vírus [ensaio realizado apenas no Centro de Ciência e Tecnologia Têxtil (2C2T) Universidade do Minho], utilizou-se um bacteriófago *E. coli* MS2 (ATCC 15597-81), ou seja, um vírus que infeta e destrói apenas as bactérias, sendo que, neste caso, o hospedeiro é a *E. coli* (ATCC 15597). As estirpes *E. coli* e *S. epidermidis* foram cultivadas em meio líquido *Trypticase Soy Broth* (TSB) e sólido *Trypticase Soy Agar* (TSA), a estirpe *P. aeruginosa* foi cultivada em meio líquido *Nutrient Broth* (NB) e sólido *Nutrient Agar* (NA), e o vírus MS2 foi sempre manuseado em meio ATCC 271. Os testes foram realizados em amostras têxteis funcionalizadas com NPs e não funcionalizadas, após 1 ou 20 lavagens, e também às AuNPs, isoladamente. Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente (em vez da incubação a 37 °C descrita na norma AATCC 100) e utilizou-se uma câmara de fluxo laminar vertical, Telstar Bio II Advanced Hood, em ambiente assético. Para analisar a atividade antiviral dos substratos e das AuNPs, foi desenvolvido um método pelo grupo de investigação do 2C2T, fundindo e adaptando as normas AATCC 100 e ISO 18184.

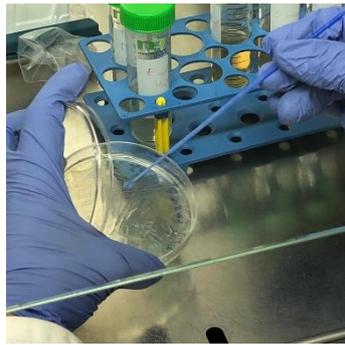
Todos os valores resultantes dos ensaios antimicrobianos foram inseridos no programa *GraphPad Prism 6*, de modo a se obterem gráficos com a redução logarítmica dos substratos.

Protocolo dos métodos quantitativos em têxteis (AATCC 100 adaptada e ISO 18184 adaptada): Prepararam-se placas de Petri de poliestireno com os diferentes meios de cultura sólidos, assim como os pré-inóculos para cada estirpe bacteriana: recolheu-se uma colónia de bactérias e de meio de cultura stock (Figura 12 (A)), colocou-se em 25 mL de meio de cultura

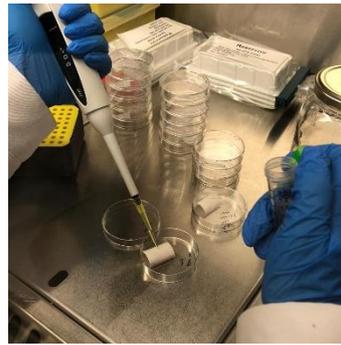
líquido (TSB para as estirpes *S. epidermidis* e *E. coli*; NB para a *P. aeruginosa*) e deixou-se na incubadora a 37 °C e 120 rpm durante a noite (aproximadamente 15 h). O pré-inóculo foi submetido a duas centrifugações a 3134 *g* durante 10 minutos à temperatura ambiente, descartou-se o meio de cultura e adicionou-se solução tampão *Phosphate Buffer Saline* (PBS) com pH de 7,4. Posteriormente foi calculada a concentração de cada estirpe, através da densidade ótica analisada no espectrofotómetro e das curvas de calibração (determinadas anteriormente pelo centro 2C2T), e acertou-se a mesma para uma concentração inicial de 1×10^7 UFC/mL. Este procedimento não foi realizado para o vírus, pois o inóculo já fora previamente preparado e já se encontrava com uma concentração de 1×10^7 UFP/mL. As amostras têxteis foram cortadas em pedaços de 2,5 x 2,5 cm, e foram inoculadas com 50 µL de cada microrganismo (Figura 12 (B)), e mantidas durante 1 h no caso das bactérias e 2 h no caso do vírus, à temperatura ambiente.

Entretanto, as placas com meio ATCC 271 que iriam receber o vírus, foram plaqueadas com hospedeiro (*E. coli*) e com *Top Agar*. Depois de um período de incubação de cerca de 20 h, o normal crescimento do hospedeiro concede ao meio da placa de Petri uma aparência turva, no entanto aquando da presença de vírus viáveis, estes conduzem à lise do hospedeiro o que gera placas/pontos translúcidas (Figura 13 (C) e (D)).

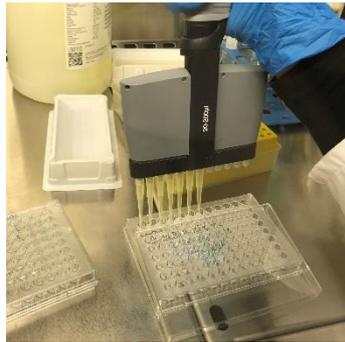
Após o período de incubação, foram adicionados 5 mL de PBS estéril às amostras com bactérias e 5 mL de meio 271 às amostras com vírus, e as mesmas foram agitadas na velocidade máxima do agitador vórtice durante pelo menos 1 min. O líquido de lavagem foi diluído em série em placas de 96 poços preparadas previamente com PBS e meio 271 (para o vírus) (Figura 12 (C)). Dessas mesmas diluições, plaqueou-se 10 µL em placas com meio, de forma a obter uma lágrima para cada diluição (Figura 12 (D)). Depois de secas, as placas foram colocadas na estufa a 37 °C durante 20 h, aproximadamente.



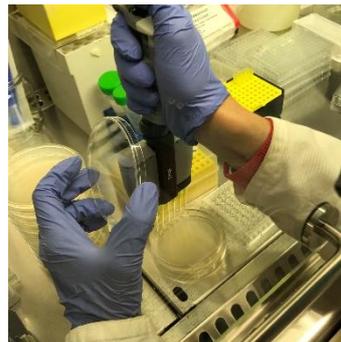
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 12: Procedimento experimental dos ensaios antimicrobianos realizado na Universidade do Minho. (A) recolha da estirpe bacteriana para preparação do pré-inóculo; (B) Inoculação da suspensão com o microrganismo na amostra têxtil; (C) Diluições seriadas; (D) Plaqueamento.

Ao fim das 20 h de inoculação, procedeu-se à contagem das UFC e UFP de cada uma das estirpes. Para efetuar a contagem, contabilizou-se apenas as diluições que continham entre 30 e 300 UFC ou UFP, para não sobrevalorizar ou desvalorizar. Na Figura 13 aparecem exemplos de placas com e sem crescimento de UFC (A e B) e com e sem crescimento de UFP (C e D).

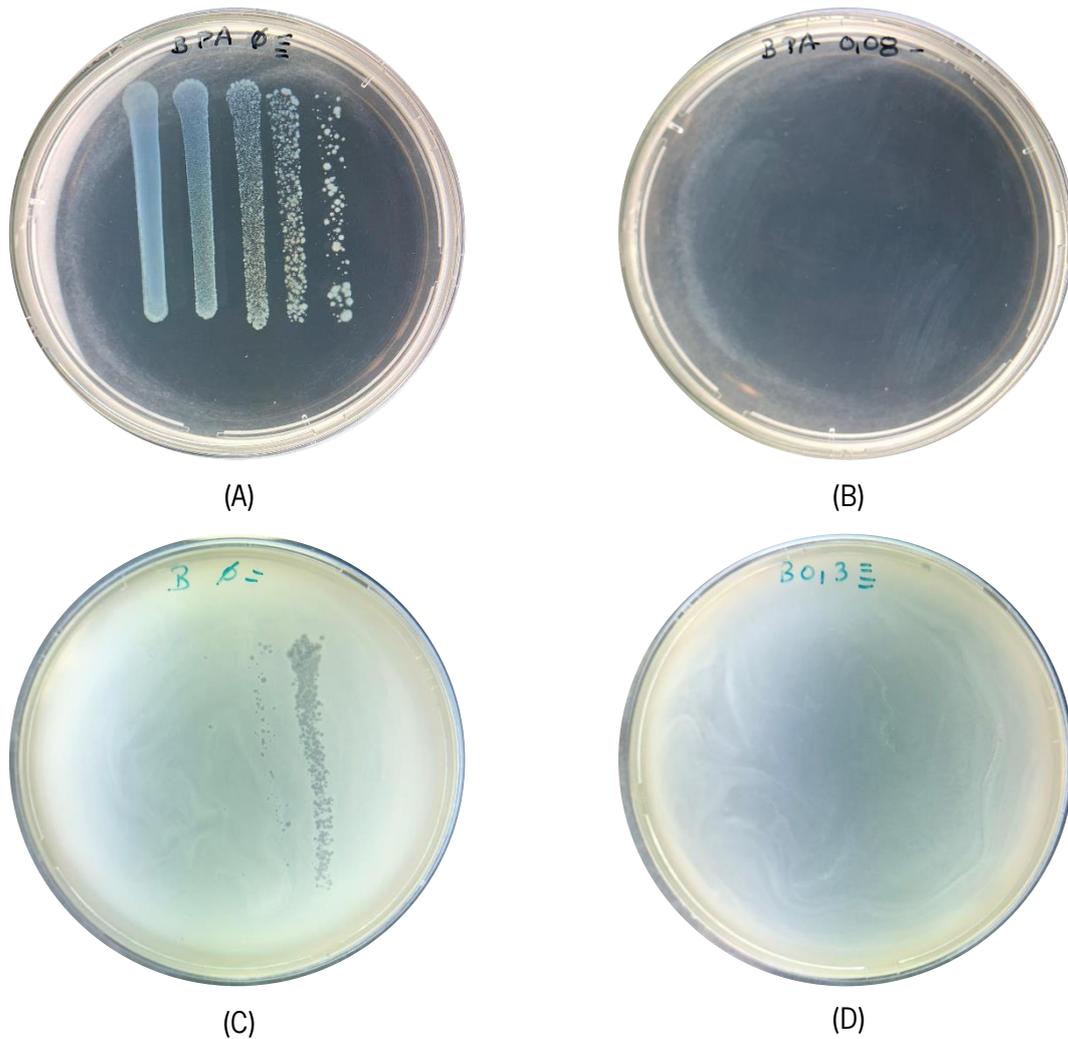


Figura 13: Exemplos de placas resultantes dos ensaios antimicrobianos realizados na Universidade do Minho. (A) Placa com crescimento de UFCs de *P. aeruginosa*; (B) Placa sem crescimento de UFCs de *P. aeruginosa*; (C) Placa com propagação de UFPs de vírus MS2, e hospedeiro *E. coli*; (D) Placa sem propagação de UFPs de vírus MS2, com hospedeiro *E. coli*.

Protocolo do método qualitativo nas AuNPs: Este método permitiu detetar o MIC das AuNPs. Preparou-se uma placa de 96 poços para cada um dos microrganismos, com 100 μ L das dispersões de AuNPs, em diferentes concentrações (0 mg/mL; 0,08 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL), nos poços centrais (Figura 14), e com 200 μ L de água nos poços exteriores, para não haver desidratação. Adicionou-se 100 μ L de inóculo com uma concentração de 1×10^7 UFC/mL aos poços com dispersões de AuNPs. As placas foram analisadas no espectrofotómetro para determinar a densidade ótica inicial e, de seguida, foram colocadas na incubadora a 37 °C a 120 rpm durante 24 h. De seguida, analisou-se novamente a densidade ótica das suspensões visualmente e no espectrofotómetro.

Protocolo do método quantitativo nas AuNPs: Este método permitiu analisar a MVC e MBC (Concentração Mínima Virucida e Concentração Mínima Bactericida) das AuNPs. Prepararam-se placas de NA para a estirpe *P. aeruginosa*; TSA para as estirpes *S. epidermidis* e *E. coli*; e meio 271 para o vírus MS2. Após a realização e análise dos métodos semi-quantitativos anteriores, retirou-se 200 µL de suspensão de cada uma das concentrações de AuNPs com inóculo, colocou-se numa nova placa de 96 poços e diluiu-se em série. As diluições resultantes foram plaqueadas nas placas de Petri com o meio apropriado, em duplicado, em forma de lágrima. Depois de secas, as placas foram colocadas na estufa a 37 °C durante 20 h, aproximadamente.

Ao fim das 20 h de inoculação, procedeu-se à contagem das UFC e UFP de cada uma das estirpes. Para efetuar a contagem, contabilizou-se apenas as diluições que continham entre 30 e 300 UFC ou UFP, para não sobrevalorizar ou desvalorizar. Na Figura 13 aparecem exemplos de placas com e sem crescimento de UFC (A e B) e com e sem crescimento de UFP (C e D).

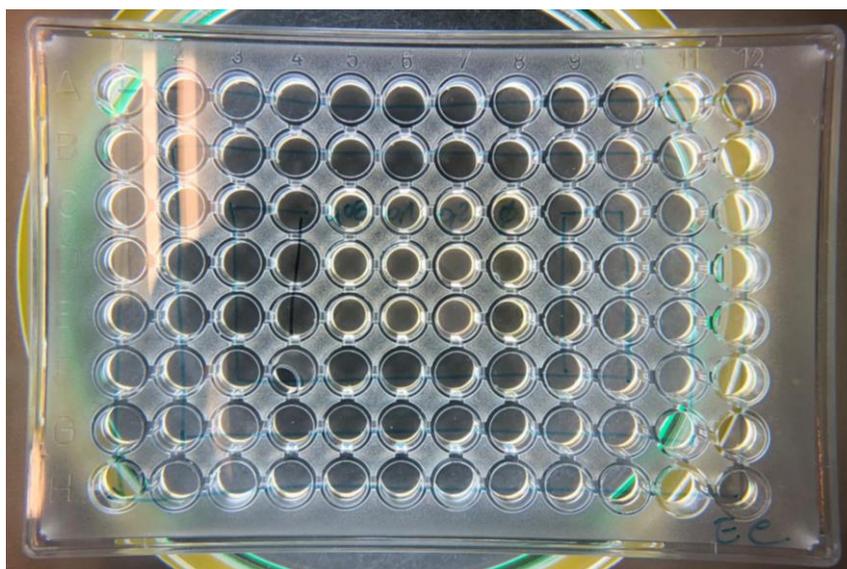


Figura 14: Placa de 96 poços, com AuNPs e *E. coli*.

4. Análise e Discussão de Resultados

4.1. Caracterização Físico-Química das AuNPs

As propriedades físico-químicas das AuNPs foram avaliadas pelo Instituto Jožef Stefan usando diferentes técnicas, nomeadamente XRD, espectroscopia UV-Vis, FTIR e *Transmission Electron Microscopy* (TEM). De acordo com os dados fornecidos pelo instituto, verificou-se que:

- › A análise de XRD, usada para identificar a composição da fase e a pureza do composto, detetou a presença de duas fases cristalinas: uma fase com estrutura de ouro cubico e uma fase com estrutura de apatite hexagonal;
- › Os espectros FTIR com ATR revelaram a presença de bandas vibracionais correspondentes aos grupos amino (-NH₂) e carboxilo (-COOH) disponíveis para posterior ligação das AuNPs com os substratos têxteis;
- › As imagens TEM (Figura 15) revelaram propriedades estruturais e morfológicas de nanopartículas de Au/apatite: dentro do composto, AuNPs com o tamanho de 10-20 nm foram depositadas na superfície da hidroxiapatite em forma de placa que serve como um modelo.

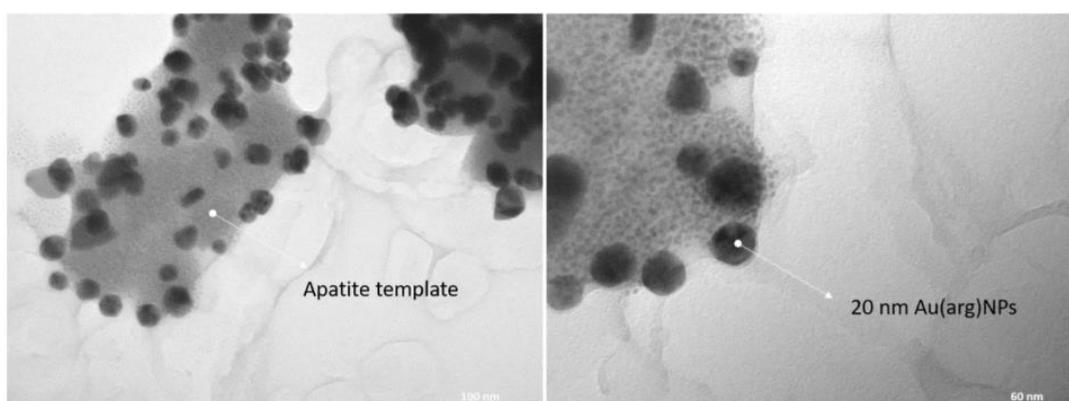


Figura 15: Imagem de TEM com a estrutura de hidroxiapatite e as nanopartículas de ouro depositadas na mesma (Instituto Jožef Stefan).

Concretamente, no âmbito desta dissertação, foi realizada a análise da absorbância das AuNPs no espectrofotómetro UV-Vis.

4.1.1. Absorbância UV-Vis

A absorbância das AuNPs dos três *batches* recebidos foi medida no espectrofotômetro UV-Vis, para analisar possíveis diferenças.

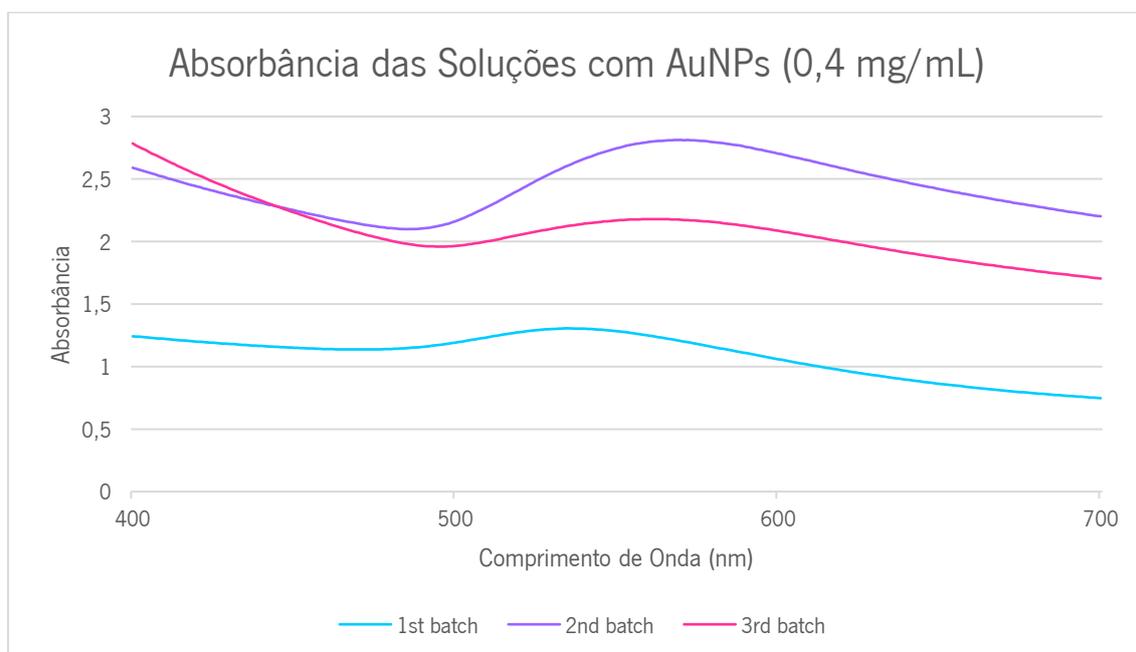


Gráfico 1: Absorbância das AuNPs dos três *batches* recebidos.

Como é possível analisar no Gráfico 1, para a mesma concentração, as AuNPs de diferentes *batches* apresentam diferentes comportamentos. Os picos para cada uma das dispersões são a 536 nm (1º *batch*), 569 nm (2º *batch*) e 562,5 nm (3º *batch*). Os valores da absorbância foram de 1,3048 (1º *batch*), 2,8121 (2º *batch*) e 2,1799 (3º *batch*).

É estimado que esta diferença se deva, essencialmente, à síntese das AuNPs, tendo em conta que este processo se encontra ainda em fase de I&D, e que o mesmo é realizado manualmente. As nanopartículas poderão também apresentar tamanhos e aglomerações diferentes, o que origina as discrepâncias apresentadas no gráfico. Relativamente à amplitude do pico, esta deve-se ao facto das nanopartículas estarem numa base de hidróxido de zinco.

Ainda assim, existem algumas diferenças perceptíveis não só visualmente, mas também no ensaio da absorbância, no 1º *batch* relativamente aos restantes. Isso deve-se a alguns desvios na síntese destas NPs, como fora reportado posteriormente pelo Instituto que as forneceu, e por isso as mesmas foram descartadas (tendo, contudo, servido para os ensaios iniciais de *screening* de concentrações e métodos a usar para a funcionalização dos substratos).

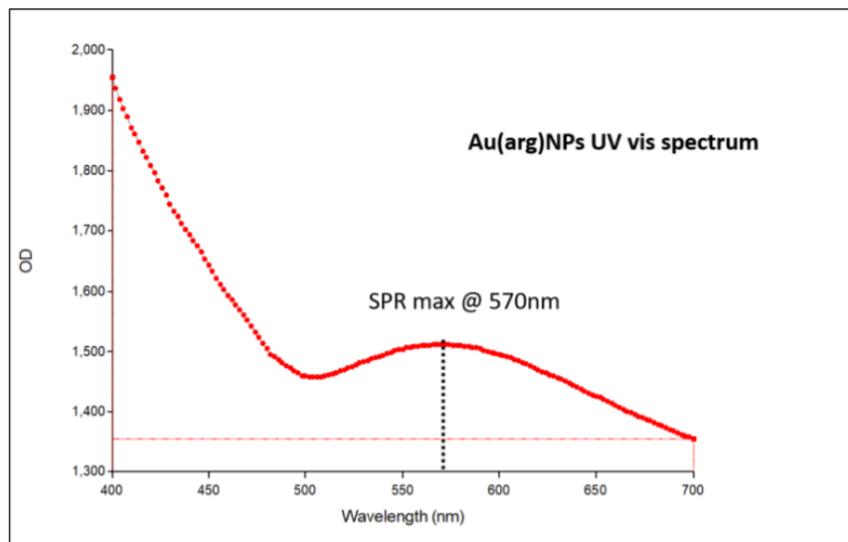


Figura 16: Absorbância das AuNPs (Instituto Jožef Stefan).

O Instituto Jožef Stefan também realizou ensaios de espectroscopia UV-Vis das AuNPs, sendo que na Figura 16 é apresentada a absorbância das mesmas. Como é possível verificar, o pico da absorbância ocorre nos 570 nm, como é característico de NPs de ouro.

Este ensaio veio confirmar que, efetivamente, as AuNPs do 1º *batch* encontravam-se deterioradas, pois a diferença entre os ensaios é significativa. Por outro lado, os valores do comprimento de onda máximo são semelhantes aos apresentados pelos restantes *batches*.

4.1.2. Ensaio antimicrobianos

Foi também feita uma avaliação inicial da atividade antibacteriana das AuNPs, tanto pelo Instituto Jožef Stefan, como pelo laboratório de microbiologia do centro 2C2T na Universidade do Minho.

No instituto foi usado o teste de microdiluição (Figura 17). O teste foi realizado nas concentrações de 10 µg/ml e 300 µg/ml de AuNPs em meio de crescimento Luria-Bertani (LB) usando a estirpe *P. aeruginosa* (PAO1) na densidade ótica inicial (DO) 0,05. Os controlos foram bactérias PAO1 sem AuNPs e meio LB sem bactérias. A investigação confirmou que as seguintes concentrações inibitórias mínimas: MIC₅₀ a 60 µg/ml e MIC₁₀₀ a 100 µg/ml.

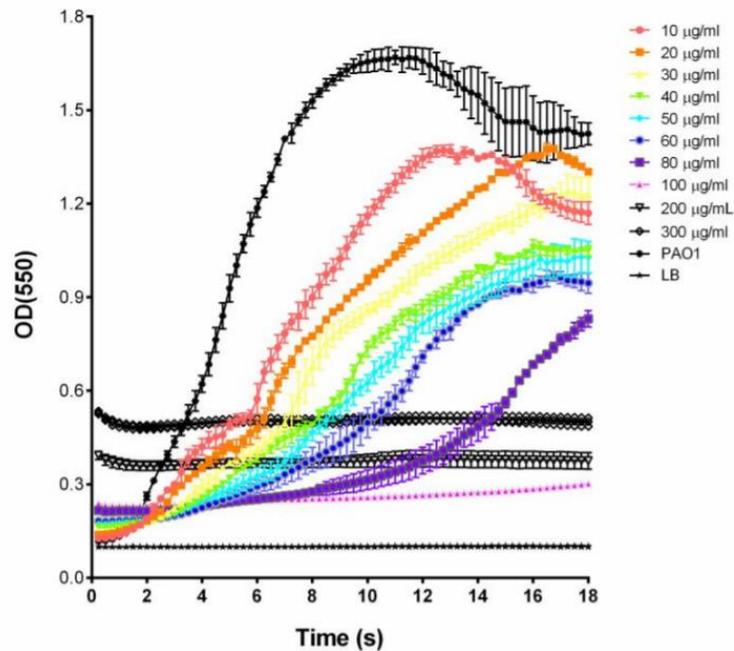


Figura 17: Cinética de crescimento de PAO1 na presença de AuNPs com diferentes concentrações (Instituto Jožef Stefan).

No 2C2T utilizou-se o procedimento mencionado no capítulo *3.5.7 Avaliação da Atividade Antimicrobiana*.

A Figura 18 representa o crescimento das bactérias em contacto com as AuNPs durante 24h, através da medição da densidade ótica das dispersões, sendo que um aumento da mesma representa um aumento do crescimento destes microrganismos. Como é possível verificar, a densidade ótica é consideravelmente mais baixa nas dispersões com presença de AuNPs, mesmo com baixa concentração das mesmas em comparação com o controlo, confirmando a atividade antimicrobiana das mesmas. Alguns dos microrganismos apresentam densidade ótica ligeiramente superior nas dispersões com maior concentração de AuNPs devido à sua coloração.

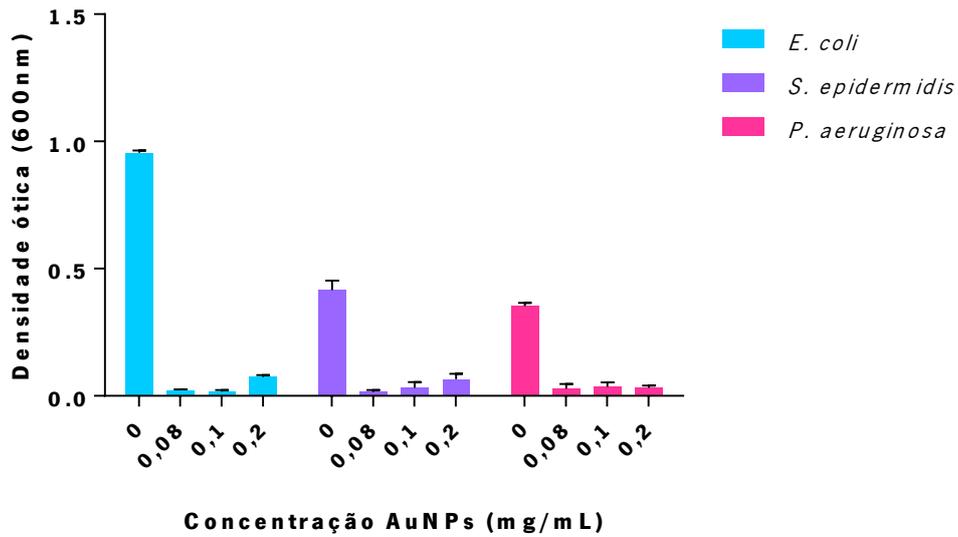


Figura 18: Densidade ótica das dispersões com AuNPs e microrganismos após 24h.

A Figura 19 mostra os valores da análise da Concentração Mínima Virucida (MVC) e a Concentração Mínima Bactericida (MBC) das AuNPs. A atividade antimicrobiana é definida através da redução logarítmica, ou seja, quanto maior for a redução, maior a atividade apresentada pelas AuNPs.

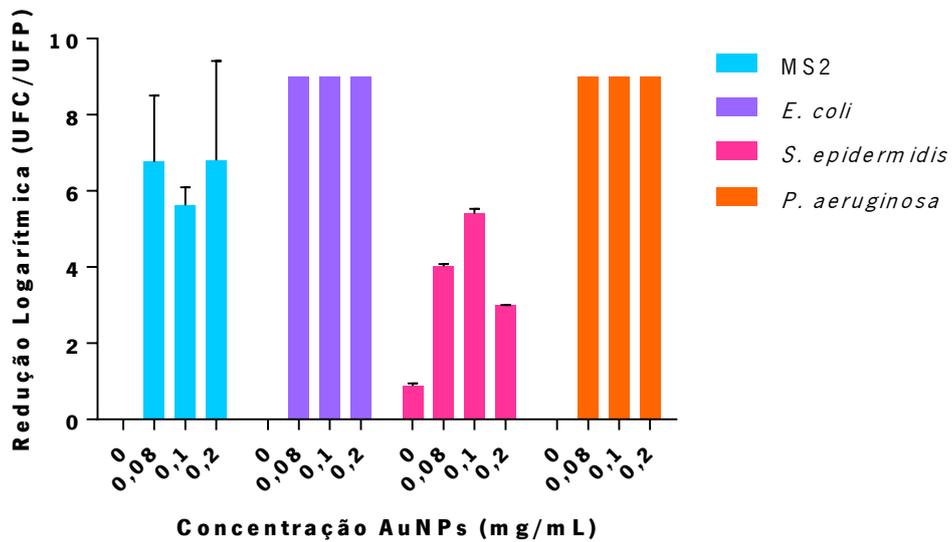


Figura 19: MBC e MVC das AuNPs.

A correlação da atividade antimicrobiana com a redução logarítmica pode ser considerada através da Tabela 9:

Tabela 9: Correlação entre a atividade antimicrobiana das AuNPs e a redução logarítmica

Redução Logarítmica	Porcentagem de Redução (%)	Atividade Bactericida ou Virucida
<1	<90	Inexistente
1	90	Fraca
2	99	Média
3	99,9	Alta
4	99,99	Muito alta
5	99,999	Muito alta (Efetiva)
...

Como se verifica no gráfico, as AuNPs apresentam atividade antimicrobiana, especialmente nos microrganismos *E. coli* e *P. aeruginosa*, onde se constata uma maior redução logarítmica em todas as concentrações e, por este motivo, a atividade antimicrobiana é considerada efetiva. Relativamente ao vírus MS2, observam-se alguns desvios na leitura da atividade antimicrobiana, contudo, a média da redução logarítmica em todas as concentrações analisadas é superior a 5, logo considera-se que a atividade é também efetiva. É na bactéria *S. epidermidis* que se observam os valores mais baixos, mostrando que, aparentemente, perante esta bactéria, provavelmente a atividade antimicrobiana não seja tão eficaz como nas restantes. De salientar também que a redução logarítmica é inferior na dispersão com maior concentração de AuNPs (0,2 mg/mL), o que não era espectável. Isto pode ser resultado de algum erro humano associado ao manuseamento do material. Perante estes resultados, seria necessário repetir ensaios, em trabalho futuro, para a concentração 0,2 mg/mL de AuNPs e realizar novos ensaios com novas concentrações, abaixo de 0,08 mg/mL, pois a MVC e a MBC acabaram por não ser definidas, visto não haver uma concentração que não inviabilize os microrganismos.

4.2. Pré-Tratamentos dos Substratos

Ao longo do projeto, foram realizados pré-tratamentos aos substratos, para analisar a sua influência na posterior funcionalização dos mesmos. O algodão tingido (olive) foi sujeito apenas a lavagem simples com água e detergente e, por este motivo, neste substrato não foi analisada a influência dos pré-tratamentos.

Para esta análise, os substratos com pré-tratamento foram submetidos a um esgotamento com AuNPs e sem AuNPs, na presença de surfactantes, com as mesmas condições de temperatura.

4.2.1. CO

Como já foi referido anteriormente, o substrato de algodão foi submetido a pré-tratamentos. Numa fase inicial realizou-se uma meia branqueação e, posteriormente, sobre o substrato tratado, foram realizados novos pré-tratamentos (ensaio 17): hidrólise alcalina, plasma (O_2) e plasma (N_2), indo de encontro com alguns artigos estudados anteriormente. O Gráfico 2 mostra a refletância total dos substratos após a funcionalização dos mesmos, com AuNPs e sem AuNPs, e o Gráfico 3 mostra a absorbância das dispersões após o esgotamento.

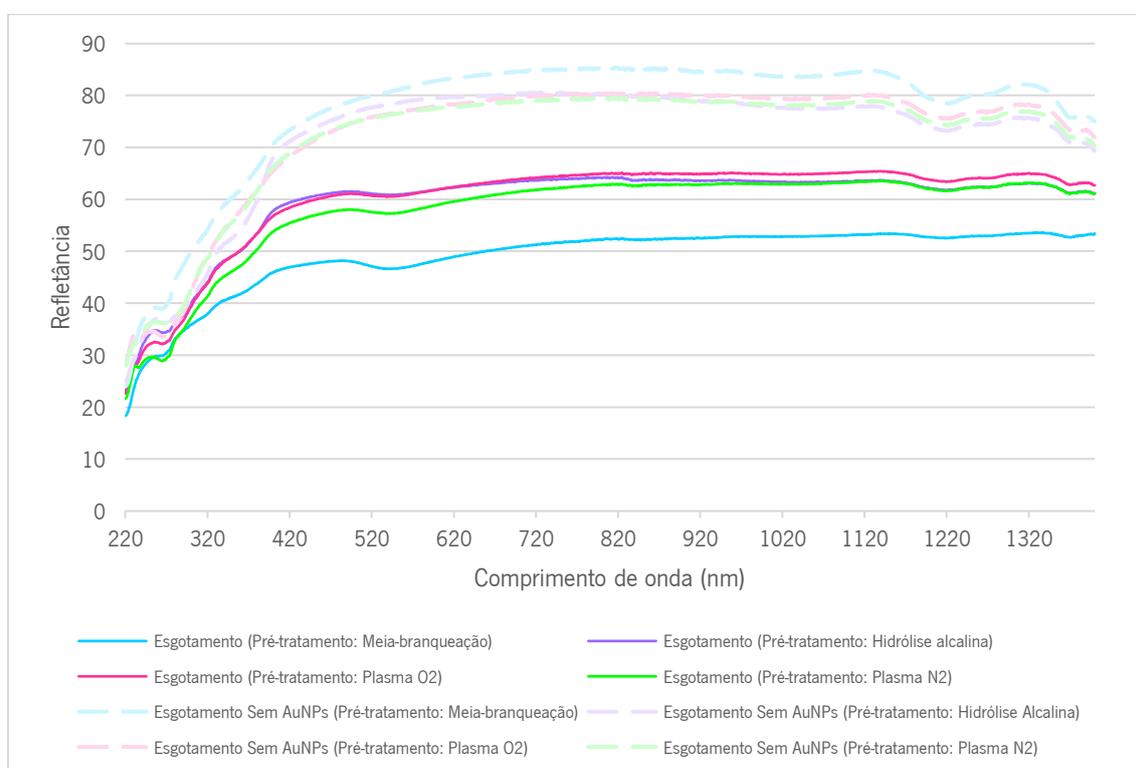


Gráfico 2: Refletância dos substratos (CO) funcionalizados com esgotamento com condições ótimas (70 °C durante 10 minutos), com diferentes pré-tratamentos.

Como se pode verificar no Gráfico 2, a refletância entre os 500-600 nm é menor na amostra de algodão pré-tratado apenas com meia branqueação, o que indica que a funcionalização do algodão com este pré-tratamento foi superior à funcionalização dos substratos com os restantes pré-tratamentos.

No Gráfico 3, por sua vez, verifica-se que a absorvância das dispersões diminuiu consideravelmente após o esgotamento, indicando que as AuNPs passaram da dispersão para o substrato têxtil, em especial, na amostra tratada com plasma N₂. Contudo, atendendo aos resultados das amostras têxteis após esgotamento (considerando que imediatamente após o esgotamento e antes da secagem é efetuada uma lavagem em água corrente) a ligação na maior parte dos substratos (exceto na amostra pré-tratada apenas com meia branqueação) não terá sido forte o suficiente, e parte das AuNPs foram removidas durante esta lavagem. Contrariamente à meia branqueação, o pré-tratamento com plasma altera apenas a superfície do substrato. Deste modo, é possível que as AuNPs tenham sido adsorvidas por ambas as amostras, inclusive pelas fibrilas das mesmas, contudo, a alteração superficial causada pelo plasma de azoto não potencializou a ligação das AuNPs ao substrato.

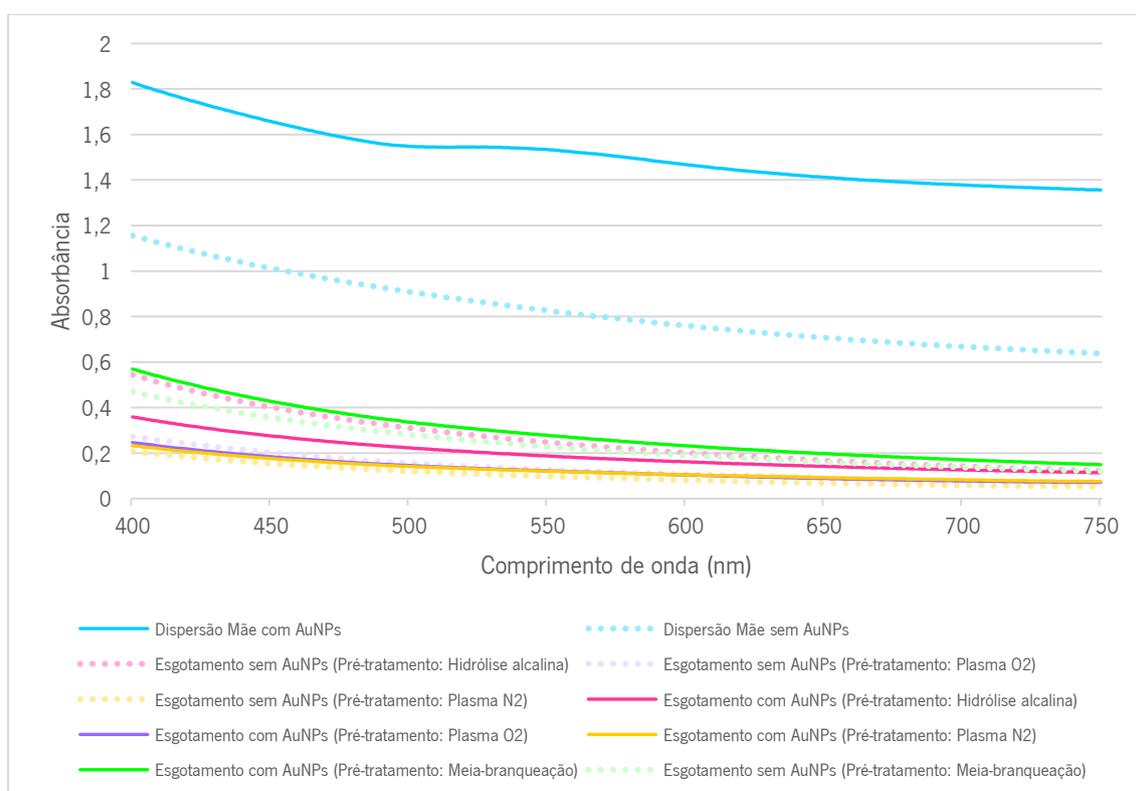


Gráfico 3: Absorvância das dispersões após esgotamento, com e sem AuNPs, do substrato CO com diferentes pré-tratamentos.

O Gráfico 4 mostra o comportamento dos substratos funcionalizados com diferentes pré-tratamentos perante sucessivas lavagens. No mesmo é possível constatar que o substrato pré-tratado apenas com meia-branqueação, para além de apresentar um ΔE superior relativamente aos substratos de algodão com pré-tratamentos adicionais, a diferença de cor ao longo das lavagens é pouco alterada. A baixa alteração da cor, resulta em uma menor perda de AuNPs. Considerando que a amostra apenas com meia branqueação é a que tem maior quantidade de NPs e é o segundo substrato com menor perda de NPs, conclui-se que o mesmo apresenta boa solidez à lavagem.

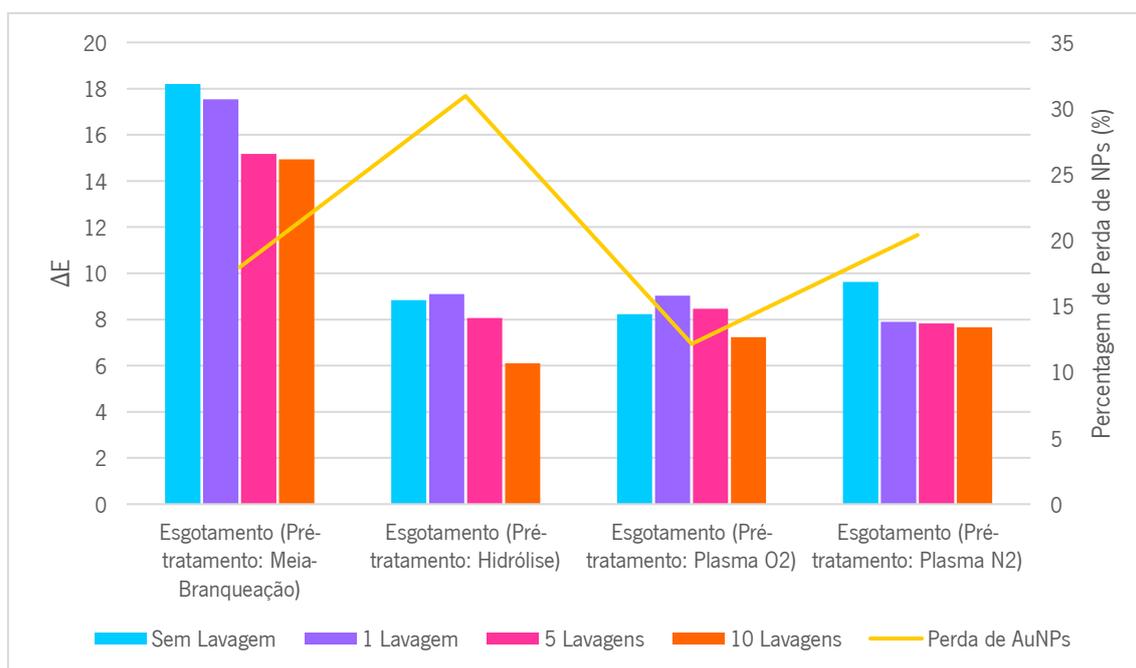


Gráfico 4: Influência das lavagens na diferença de cor das amostras de CO funcionalizadas com diferentes pré-tratamentos.

4.2.2. CO/PES

O substrato da mistura de algodão e poliéster foi submetido a uma lavagem inicial e, posteriormente a um pré-tratamento com plasma atmosférico (ensaio 18). Como se pode analisar no Gráfico 5, a refletância (zona entre 500 e 600 nm) entre a amostra funcionalizada apenas após lavagem e a amostra funcionalizada pré-tratada com plasma atmosférico é bastante semelhante.

Naturalmente, os resultados do tratamento com plasma neste tipo de substrato serão diferentes relativamente ao substrato anterior. Como é de conhecimento geral, o plasma altera apenas a superfície do substrato, não atinge as fibras no seu interior e, por isso, pode existir menos adsorção de AuNPs no mesmo. Por outro lado, este substrato já possuía uma coloração

esverdeada, o que influencia também a leitura da refletância e pode conduzir a resultados menos rigorosos.

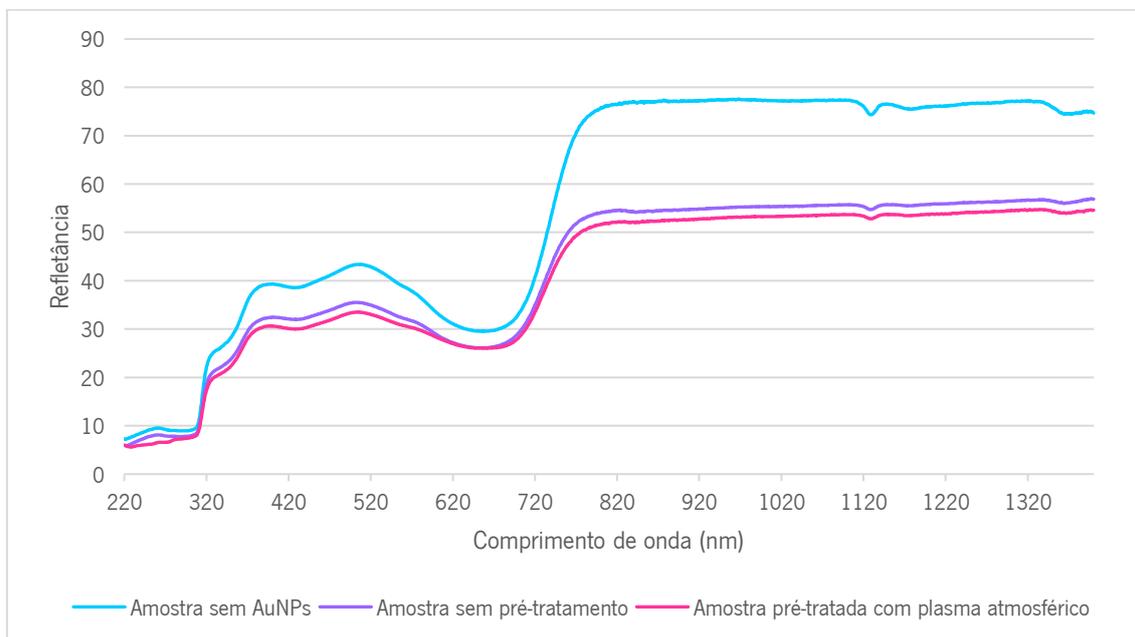


Gráfico 5: Refletância dos substratos (CO/PES) funcionalizados com AuNPs, com e sem pré-tratamento.

Contudo, olhando para o Gráfico 6, nota-se que, aparentemente houve uma maior absorção de AuNPs pela amostra pré-tratada com plasma atmosférico. Verifica-se ainda que, no gráfico da amostra sem qualquer pré-tratamento existe uma ligeira curvatura na zona dos 500-600 nm, o que sugere a presença de AuNPs. Comparativamente ao gráfico anterior, esta discrepância de resultados pode ser consequência da cor apresentada pelo substrato, que pode interferir na leitura das refletâncias e absorções, ou também do manchamento das amostras, apesar de se ter tido o cuidado de realizar três leituras em todas as amostras, e os resultados apresentados serem uma média.

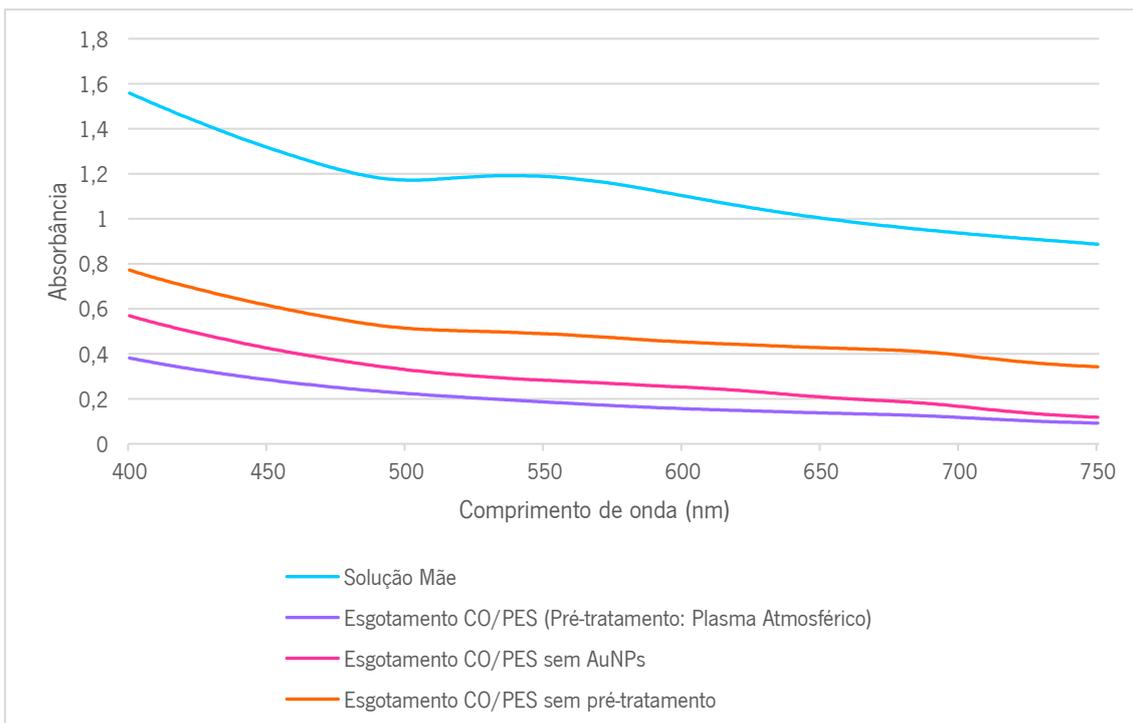


Gráfico 6: Absorvância das dispersões após o esgotamento com e sem AuNPs, do substrato de CO/PES com e sem pré-tratamento.

No que diz respeito às lavagens dos substratos, é possível verificar no Gráfico 7 que a amostra pré-tratada com plasma atmosférico, apesar de não apresentar ΔE mais elevado numa fase inicial, permanece constante ao longo das lavagens e não perde tantas AuNPs como a amostra sem qualquer pré-tratamento, cujo ΔE após 20 lavagens corresponde a cerca de $\frac{1}{4}$ do ΔE inicial.

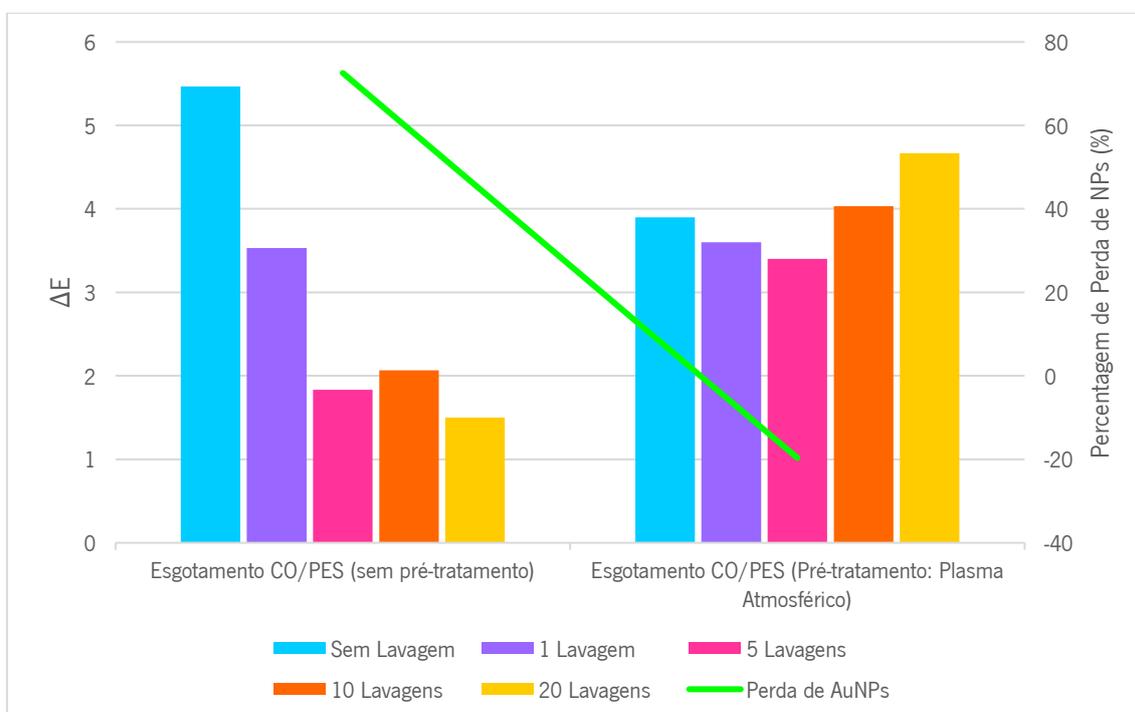


Gráfico 7: Influência das lavagens na diferença de cor das amostras de CO/PES funcionalizadas com diferentes pré-tratamentos.

4.2.3. PES

O substrato de poliéster apresentava boa hidrofiliidade por isso, ao contrário dos restantes substratos, não sofreu lavagem inicial. A aplicação de plasma atmosférico (ensaio 18), já numa fase final do estudo, permitiu entender de que forma é que este pré-tratamento influenciava a adsorção de nanopartículas no substrato e se a funcionalização do mesmo era resistente a múltiplas lavagens.

No Gráfico 8, é possível verificar que a amostra funcionalizada pré-tratada com plasma atmosférico apresenta menor refletância na zona dos 500-600 nm, relativamente à amostra funcionalizada sem qualquer pré-tratamento, o que indica que houve uma maior adsorção de nanopartículas pelo substrato, devido à ativação de grupos funcionais no mesmo, que ligaram com os grupos amina ou carboxilo das AuNPs.

O Gráfico 9 complementa o Gráfico 8, mostrando que a dispersão após o esgotamento da amostra pré-tratada com plasma atmosférico praticamente não tem nanopartículas na sua composição. É possível verificar também que, inclusive houve uma maior absorção de produtos auxiliares, neste caso os surfactantes, que conferiam turbidez à dispersão e, no esgotamento da amostra pré-tratada com plasma, a dispersão resultante ficou praticamente límpida.

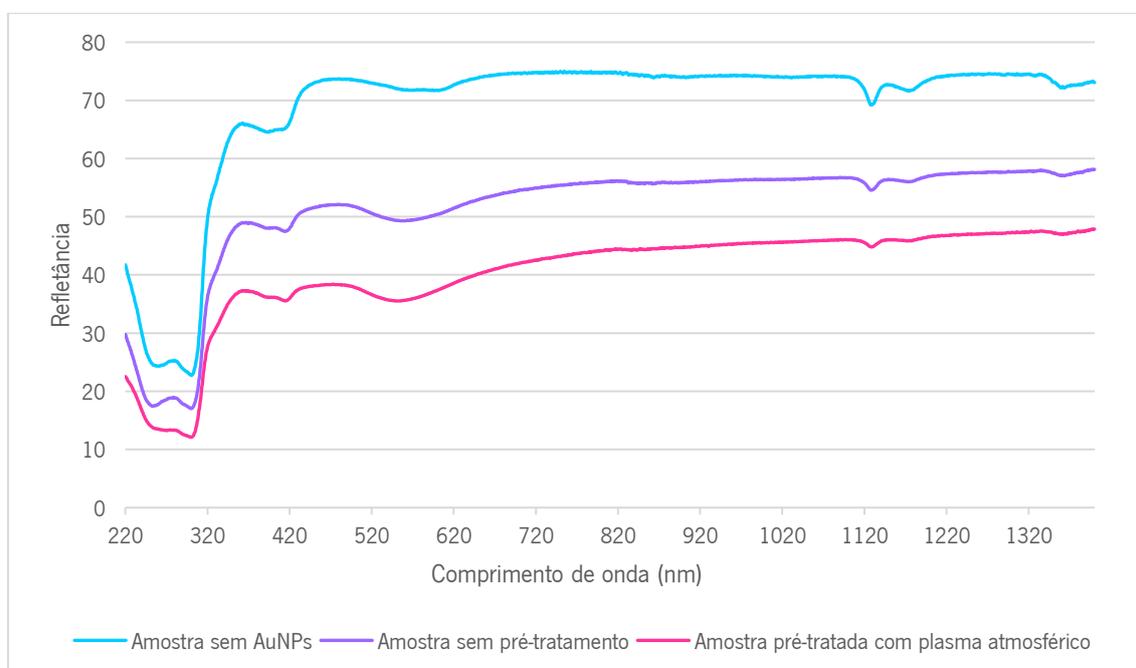


Gráfico 8: Refletância dos substratos (PES) funcionalizados com AuNPs, com e sem pré-tratamento.

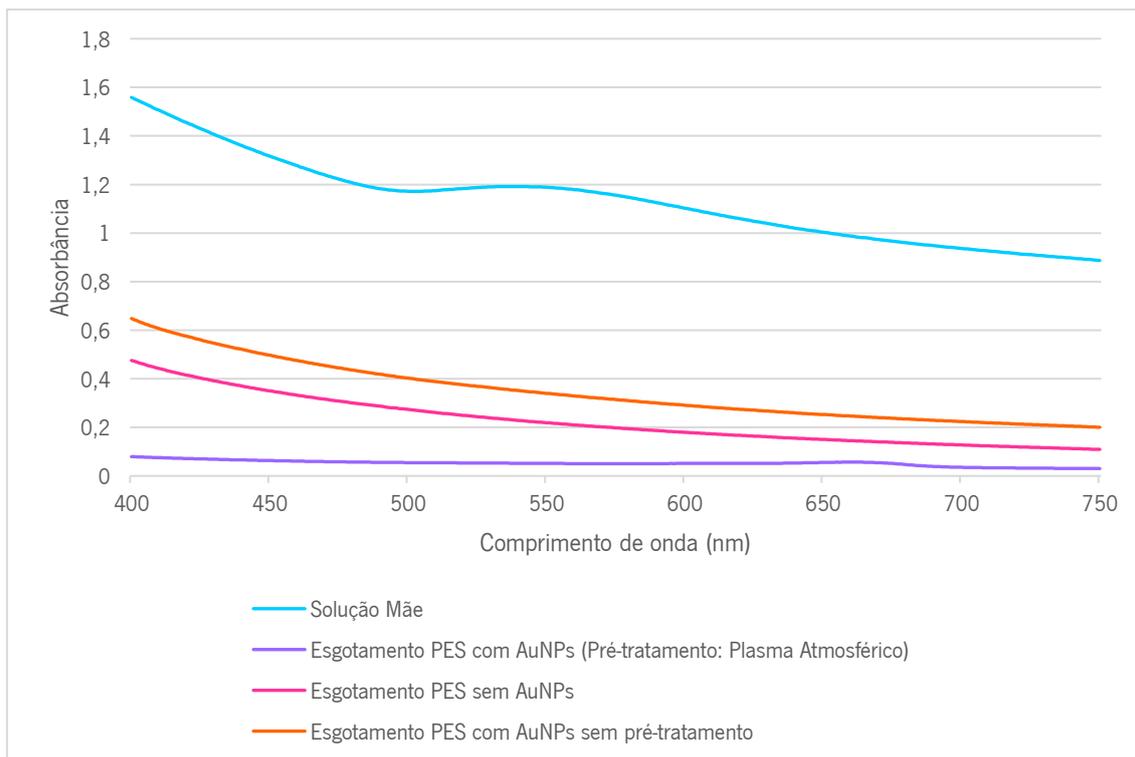


Gráfico 9: Absorbância das dispersões antes e após o esgotamento com e sem AuNPs, do substrato PES com e sem pré-tratamento.

O Gráfico 10 mostra a solidez dos substratos funcionalizados a sucessivas lavagens. A amostra de PES pré-tratada com plasma atmosférico apresenta ΔE superior em todas as lavagens. Apesar da solidez não ser muito elevada e a perda de AuNPs ser semelhante em ambos os substratos, ao final de 20 lavagens o substrato com maior quantidade de AuNPs é o substrato pré-tratado com plasma e, por este motivo, a aplicação deste pré-tratamento é mais vantajosa do que não ter qualquer pré-tratamento.

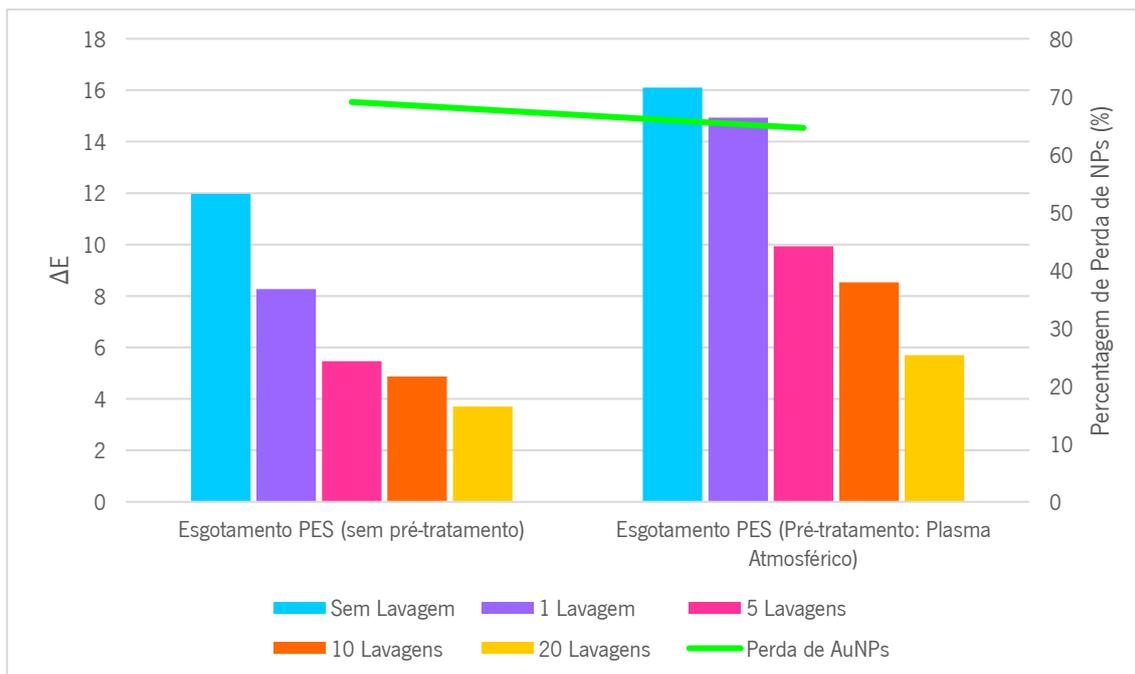


Gráfico 10: Influência das lavagens na diferença de cor das amostras de PES funcionalizadas com diferentes pré-tratamentos.

4.3. Funcionalização dos Substratos

A funcionalização dos substratos ocorreu, como já foi referido anteriormente, através de impregnação e esgotamento. Deste modo, ambos os métodos foram sujeitos a comparações. Outras variáveis estudadas durante a funcionalização dos substratos, foram a concentração das NPs, produtos auxiliares, pH, razão de banho, tempo e temperatura dos processos. Estas variantes permitiram perceber qual era o método mais adequado (que levaria a uma melhor fixação das AuNPs nos substratos), tendo em consideração a sua aplicação à escala industrial.

Uma vez que a alteração de cor nos substratos têxteis provinha das NPs ligadas a estes, o valor de mudança de cor (ΔE), conforme determinado pelo software de UV-vis LabSolutions UV-Vis Color Analysis, e a força de cor (K/S) conforme determinado pela refletância mínima em torno de 569 nm, foram usados como um indicativo da ligação das NPs aos têxteis.

4.3.1. Concentração de NPs

Num primeiro ensaio analisou-se a impregnação de 5×10^{-5} g/mL de NPs em todos os substratos (exceto na malha de algodão tingido cor olive, pois ainda não tinha sido fornecida), que foram posteriormente examinados no espectrofotómetro UV-Vis, e comparados com os substratos não funcionalizados.

Como é possível verificar, tanto pelas Figuras 20-23, como pelo Gráfico 11, a alteração da cor é nula nos substratos que contêm poliéster e muito pouca nos restantes. Isto mostra que não ocorreu ancoragem das NPs. Assim sendo, há uma indicação da necessidade de aplicar um tratamento prévio nos substratos com poliéster e, para além disso, é necessário aumentar a concentração de NPs nas soluções de funcionalização.

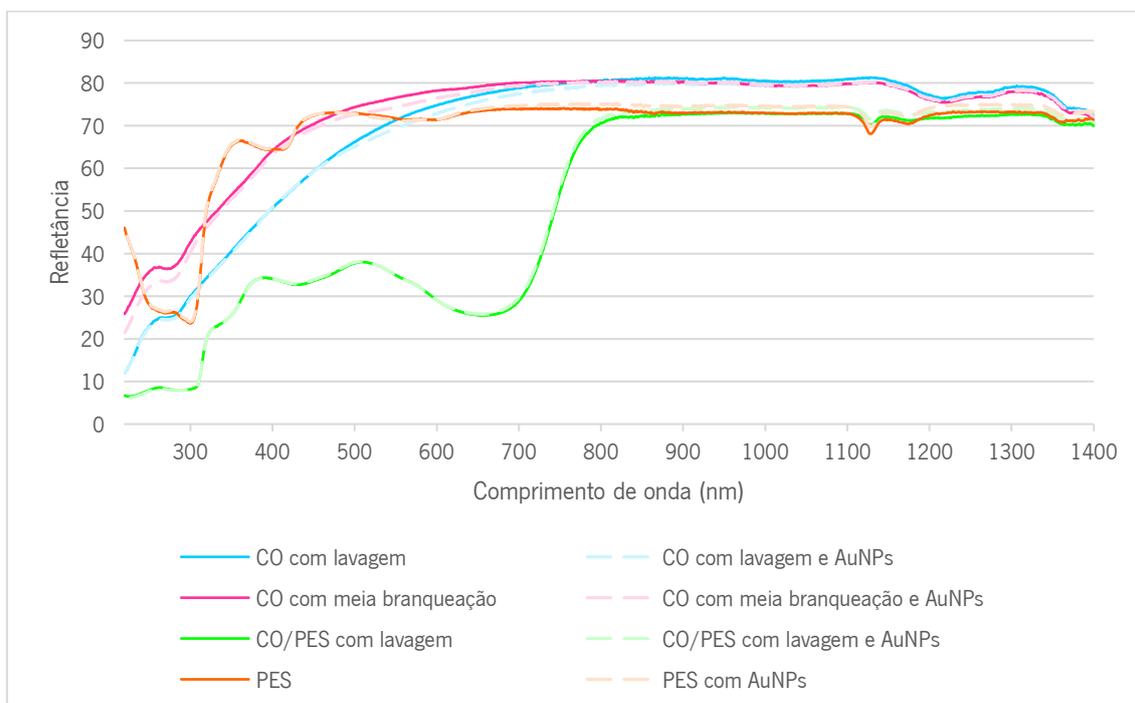


Gráfico 11: Refletância dos substratos após impregnação com 5×10^{-8} g/mL AuNPs.



Figura 20: Substrato de CO/PES com lavagem, à esquerda sem qualquer funcionalização, e à direita funcionalizado com AuNPs.

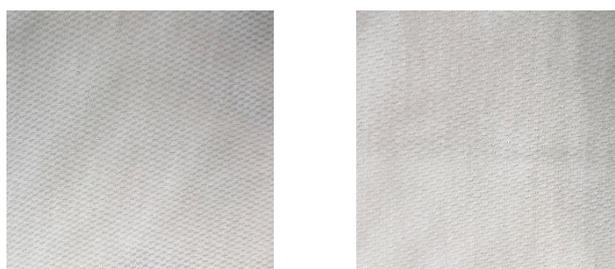


Figura 21: Substrato de PES, à esquerda sem qualquer funcionalização, e à direita funcionalizado com AuNPs.

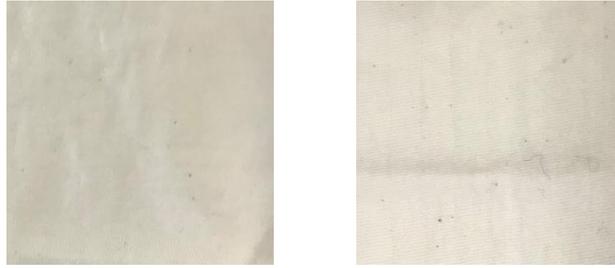


Figura 22: Substrato de CO com lavagem, à esquerda sem qualquer funcionalização, e à direita funcionalizado com AuNPs.



Figura 23: Substrato de CO com meia-branqueação, à esquerda sem qualquer funcionalização, e à direita funcionalizado com AuNPs.

O passo seguinte (ensaio 2) foi realizar uma impregnação de NPs com diferentes concentrações: 1,2 mg/mL; 0,9 mg/mL; 0,6 mg/mL; 0,3 mg/mL. Neste caso, a impregnação foi realizada apenas no substrato de algodão com meia branqueação, por ser o mais hidrofílico. A refletância destas amostras é apresentada no Gráfico 12.

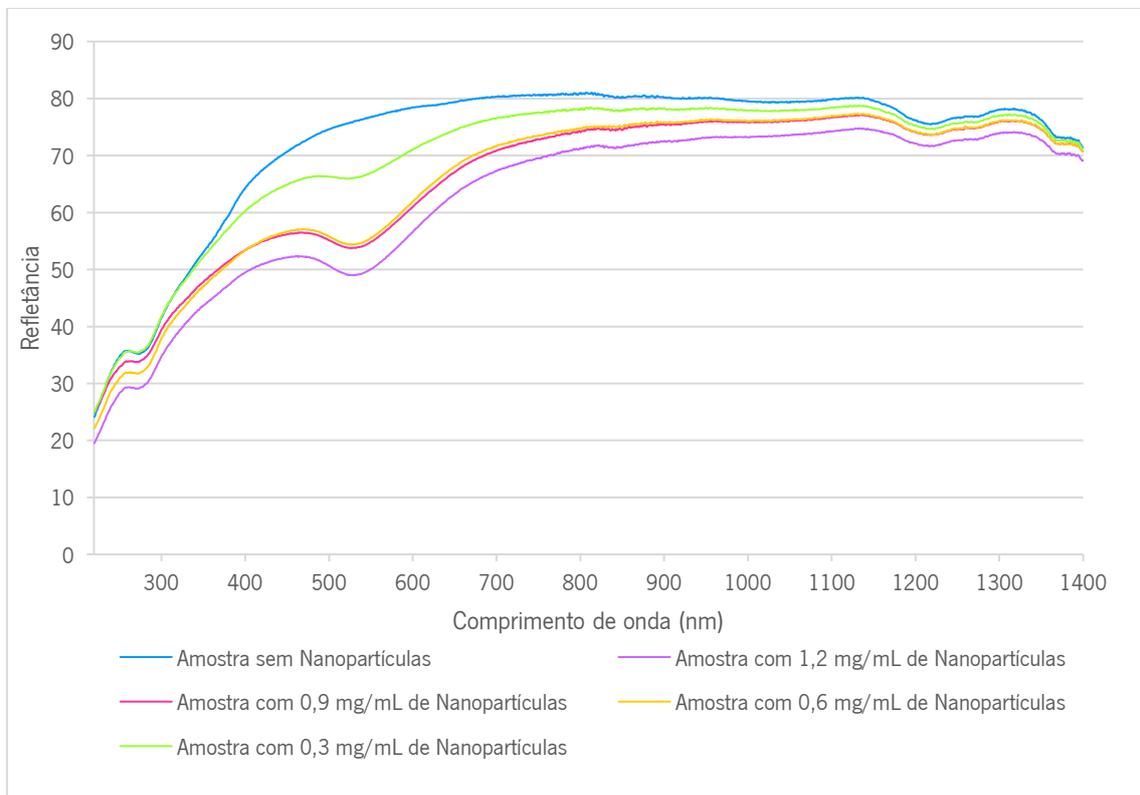


Gráfico 12: Refletância dos substratos de CO impregnados com diferentes concentrações de AuNPs.

As amostras tratadas apresentaram uma diferença de cor bastante considerável, adquirindo um tom avermelhado, sendo este mais intenso quanto maior a concentração de NPs usada, à exceção das amostras funcionalizadas com 0,9 mg/mL e 0,6 mg/mL de NPs, que apresentaram uma intensidade de cor muito semelhante. Para além deste aspeto, verificou-se algum manchamento nas amostras, resultante na aglomeração de nanopartículas. No espectro de refletância UV-Vis (Gráfico 12) é possível analisar a variação desta nas amostras tratadas e de uma amostra não tratada. Contrariamente ao que é observado no Gráfico 11, a refletância das amostras funcionalizadas não se sobrepõe à da amostra não tratada, em especial na zona entre os 500 e 600 nm, que é a zona onde ocorre o pico de absorbância destas AuNPs, e a variação na refletância encontra-se de acordo com a observação visual das amostras (Figura 24): quanto maior for a concentração da dispersão de NPs usada, maior a quantidade de NPs ligadas/adsorvidas pelo substrato têxtil (e menor a refletância deste).

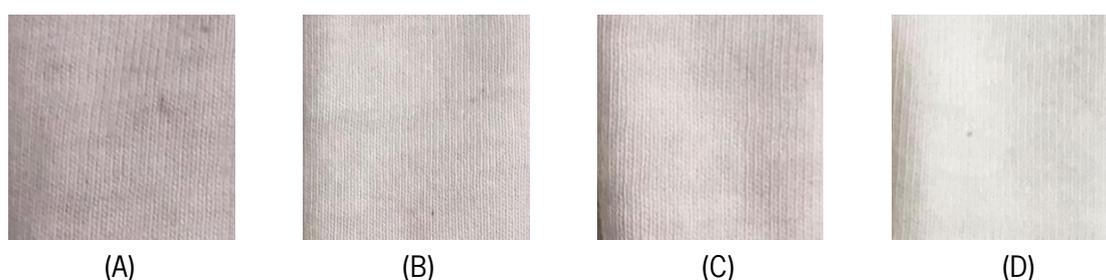


Figura 24: Substratos de CO impregnados com diferentes concentrações de AuNPs. (A) 1,2 mg/mL; (B) 0,9 mg/mL; (C) 0,6 mg/mL; (D) 0,3 mg/mL.

4.3.2. Tipo de tratamento

Após se verificar que a 0,3 mg/mL havia uma quantidade razoável de NPs ligadas ao têxtil, devido à diferença de cor mais acentuada, esta concentração e outra abaixo (0,1 mg/mL) foram também testadas por esgotamento, considerando que o objetivo é funcionalizar os substratos com a menor quantidade possível de nanopartículas (ensaios 3 e 4).

As amostras tratadas por esgotamento apresentaram uma tonalidade bastante mais intensa que as amostras tratadas por impregnação. Contudo, estas apresentaram bastante manchamento, resultante da aglomeração das NPs. O Gráfico 13, mostra a refletância total destas amostras, a qual foi de encontro às interpretações realizadas por observação visual (Figura 25). As amostras tratadas por esgotamento apresentam maiores diferenças de cor, o que indica que estas têm maior ancoragem de nanopartículas, sugerindo que o esgotamento é o melhor processo para esta funcionalização, em comparação com a impregnação (maiores rendimentos).

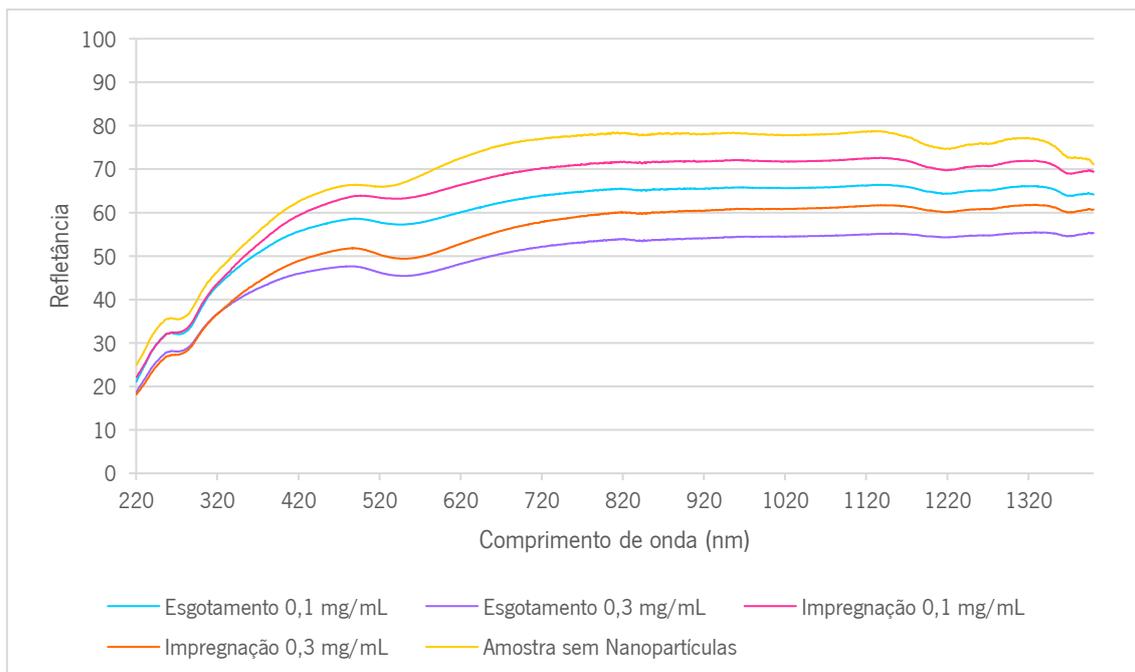


Gráfico 13: Refletância dos substratos CO após funcionalização com diferentes tratamentos e com diferentes concentrações.

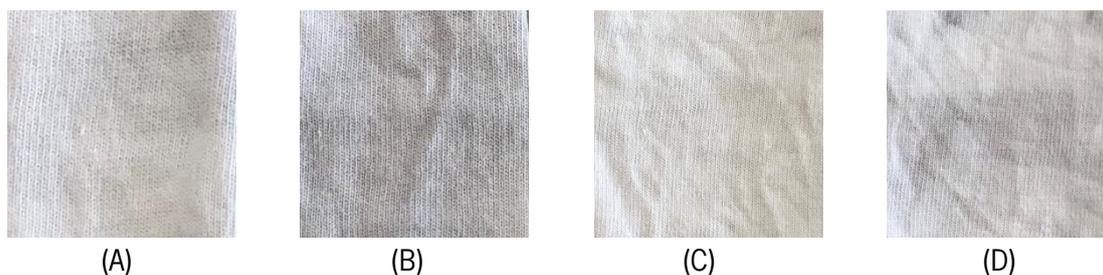


Figura 25: Substrato CO após funcionalização com diferentes tratamentos e com diferentes concentrações. (A) Esgotamento 0,1 mg/mL; (B) Esgotamento 0,3 mg/mL; (C) Impregnação 0,1 mg/mL; (D) Impregnação 0,3 mg/mL.

Nos Gráficos 14 e 15 verifica-se também que as amostras tratadas por esgotamento apresentam não só maior intensidade de cor, como também, em média, maior solidez à lavagem, ou seja, o ΔE das amostras tratadas antes e após 20 lavagens é superior nas amostras tratadas por esgotamento. Os cálculos da perda de cor comprovam ainda que há menor perda de cor nos processos de funcionalização por esgotamento: no esgotamento com 0,1 mg/mL de AuNPs há uma perda de 12,62 % de AuNPs; no esgotamento com 0,3 mg/mL de AuNPs há uma perda de 20,60 % de AuNPs; na impregnação com 0,1 mg/mL de AuNPs há uma perda de 28,14 % de AuNPs; na impregnação com 0,3 mg/mL de AuNPs há uma perda de 34,58 % de AuNPs.

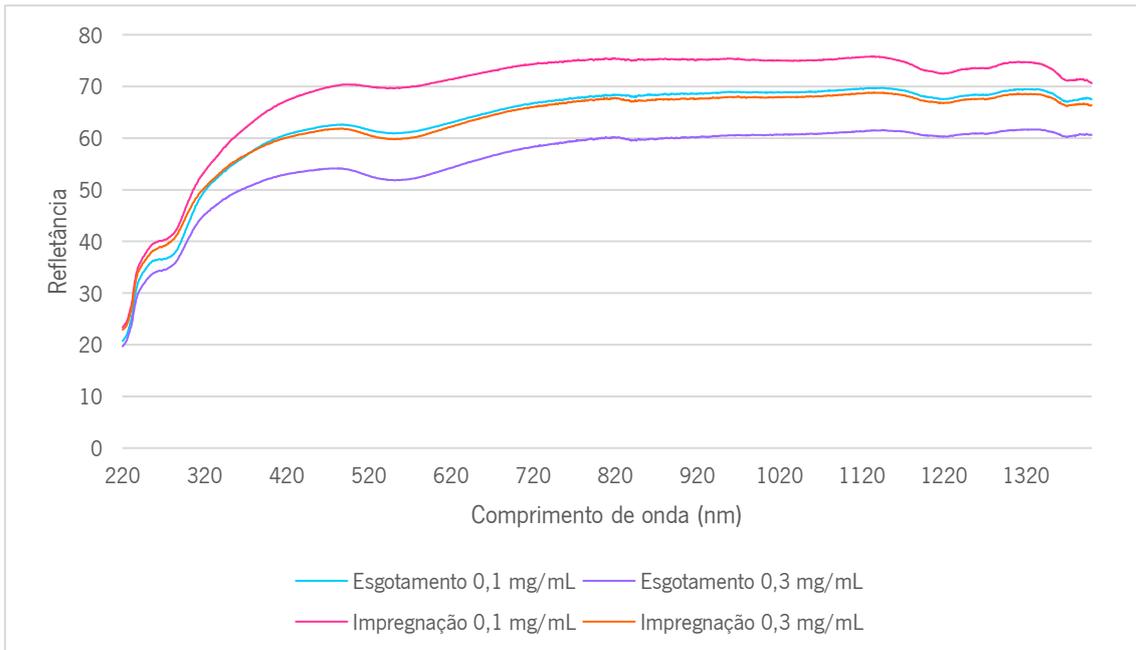


Gráfico 14: Refletância do substrato CO funcionalizado com diferentes tratamentos e com diferentes concentrações, após 20 lavagens.

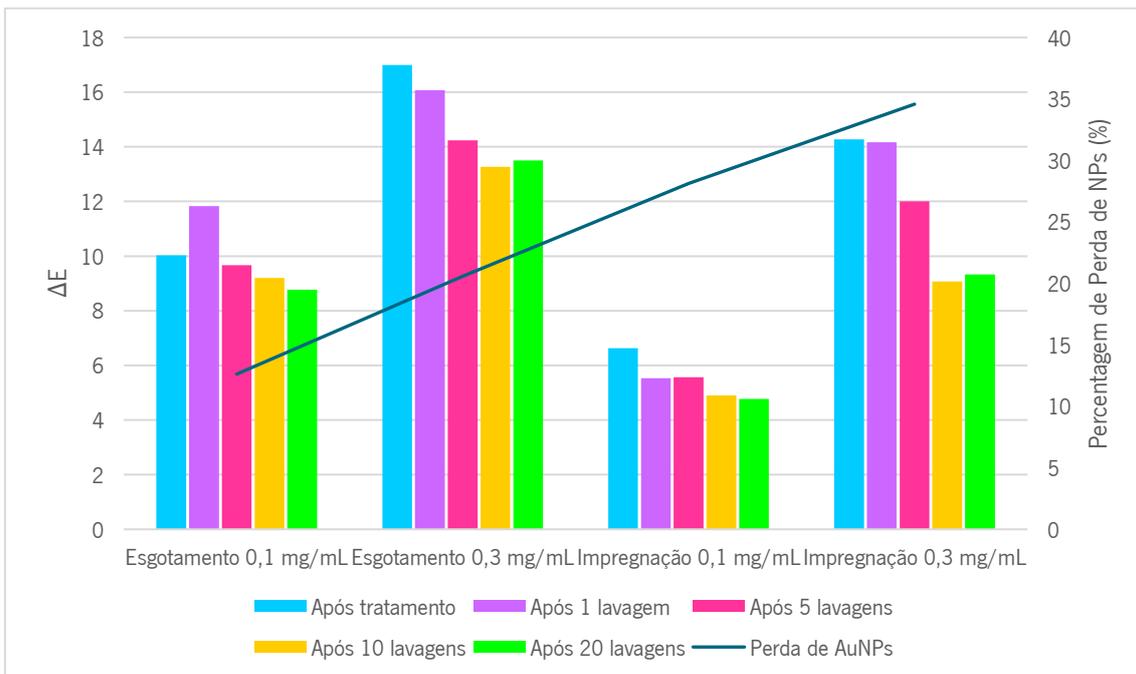


Gráfico 15: Influência das lavagens na diferença de cor das amostras de CO funcionalizadas com diferentes tratamentos e diferentes concentrações.

4.3.3. Influência do pH

Para avaliar se o pH da dispersão influenciava o processo, foram realizados dois esgotamentos (ensaio 3) com 0,3 mg/mL de NPs: 1 sem qualquer ajuste de pH, e outro usando carbonato de sódio para ajustar o pH até ≈ 9 (pH habitual nos processos de esgotamento).

Como é possível analisar no Gráfico 16 e na Figura 26, o ajuste do pH para 9 resultou num aumento significativo da intensidade da cor da amostra funcionalizada, aumentando o rendimento do esgotamento, ou seja, aparentemente há uma maior quantidade de AuNPs foi absorvida pela fibra. Porém, é preciso lembrar que o aumento da intensidade da cor pode não ser resultante de um aumento de AuNPs, mas sim pela modificação das mesmas. Por esse motivo, em trabalhos futuros, deve-se estudar o comportamento das AuNPs perante a presença de carbonato de sódio, para entender se o mesmo modifica as nanopartículas.

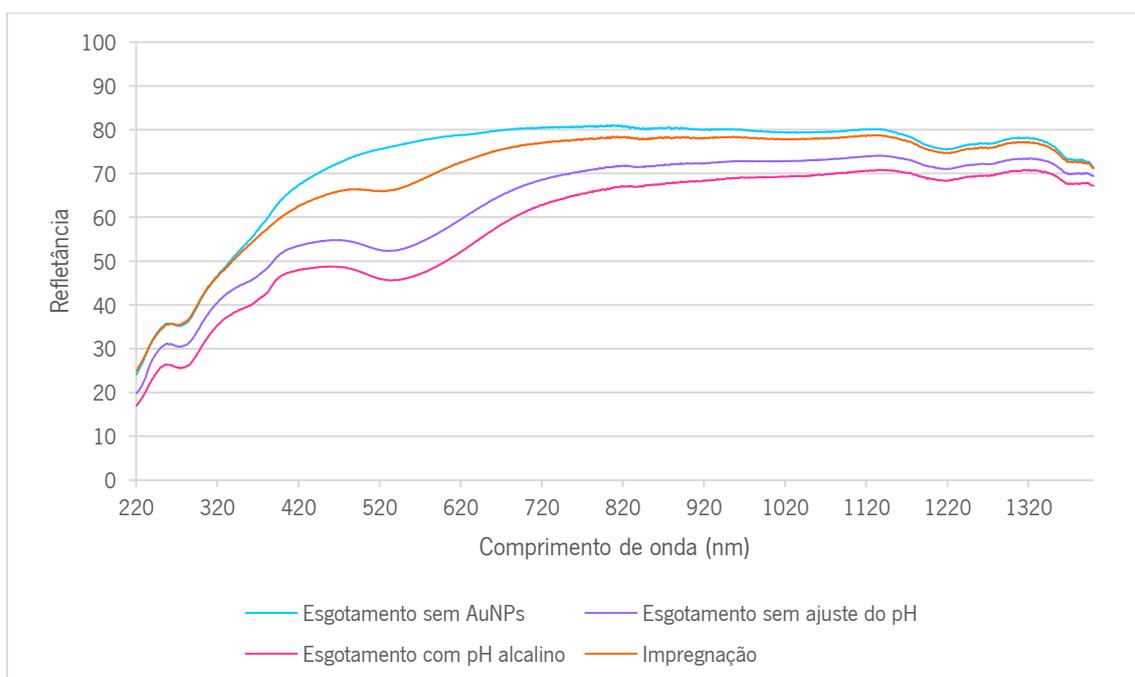


Gráfico 16: Refletância do substrato CO funcionalizado com 0,3 mg/mL AuNPs com e sem ajuste de pH.

Ainda assim, como se pode verificar pela Figura 26 as amostras tratadas apresentaram bastante manchamento.



Figura 26: Amostras de CO funcionalizadas com 0,3 mg/mL de AuNPs sem ajuste de pH (esquerda) e com ajuste de pH (direita).

Através do Gráfico 17, verifica-se que o substrato funcionalizado com ajuste de pH aparentemente tem menor solidez à lavagem, relativamente à amostra sem ajuste de pH, contudo, o ΔE da primeira continua a ser significativamente superior, mesmo após 5 lavagens, devido à maior quantidade de AuNPs que se ligaram ao substrato.

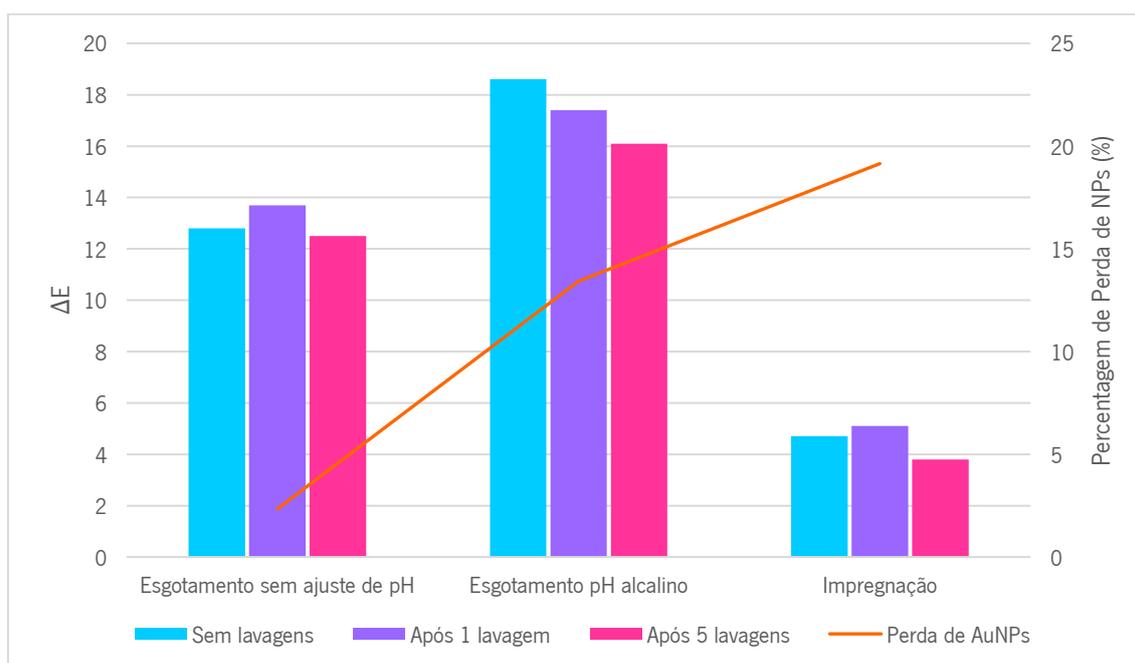


Gráfico 17: Diferença de cor das amostras funcionalizadas antes e após 5 lavagens.

4.3.4. Influência dos surfactantes

Durante a funcionalização dos substratos de algodão com as AuNPs, notou-se algum manchamento causado pela aglomeração destas. Como a adição de um surfactante tipicamente auxilia na dispersão das NPs e pode ajudar na absorção das mesmas pelo substrato têxtil, testaram-se três surfactantes (A e B e C – com propriedades referidas na secção 3.4. *Funcionalização dos substratos*), para perceber qual seria mais adequado ao processo (ensaio 6).

A primeira coisa que se pode constatar ao observar o Gráfico 18 é que, tal como fora mencionado anteriormente, os resultados da funcionalização por esgotamento são mais satisfatórios do que os da funcionalização por impregnação. A refletância na zona dos 500-600 nm é inferior na amostra funcionalizada com AuNPs através de esgotamento utilizando o surfactante A, o que indica que houve maior adsorção de nanopartículas por esta amostra. Na Figura 27 também se pode notar uma tonalidade mais intensa nesta amostra. A amostra funcionalizada com AuNPs por esgotamento usando o surfactante C também apresenta uma refletância baixa e, por isso, boa intensidade de cor, contudo, nesta amostra houve menos reprodutibilidade nas réplicas feitas para cada amostra na análise UV-Vis, o que indica que há menor uniformidade de cor (Gráfico 19). Por outro lado, o Gráfico 20, onde é apresentada a diferença de cor dos substratos ao longo das lavagens, mostra que a amostra funcionalizada por esgotamento com o surfactante B, apesar de não ter uma tonalidade tão intensa, acaba por ter mais solidez às lavagens. Vale ressaltar que, tal como no caso do pH, a refletância das amostras com surfactantes é uma avaliação superficial, visto que os surfactantes, tal como o carbonato de sódio, podem modificar as NPs e alterar a sua tonalidade.

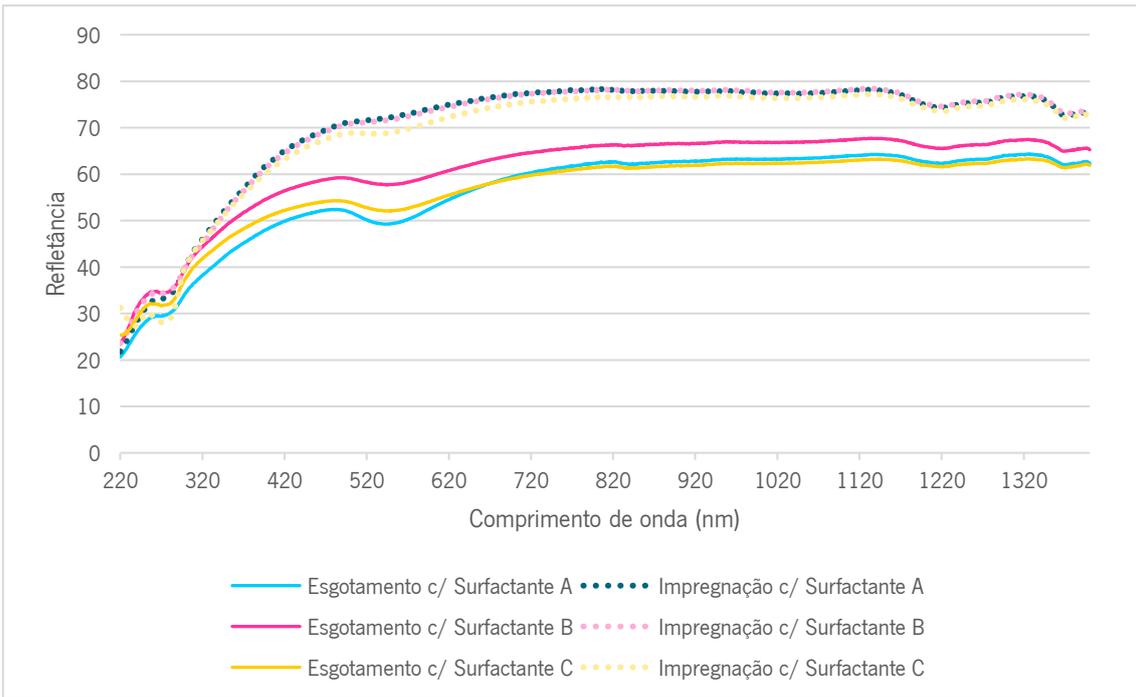


Gráfico 18: Refletância total dos substratos (CO) funcionalizados por esgotamento ou por impregnação utilizando surfactantes (0,1 mg/mL de AuNPs; Esgotamento a 60°C durante 60 min – ensaio 6).

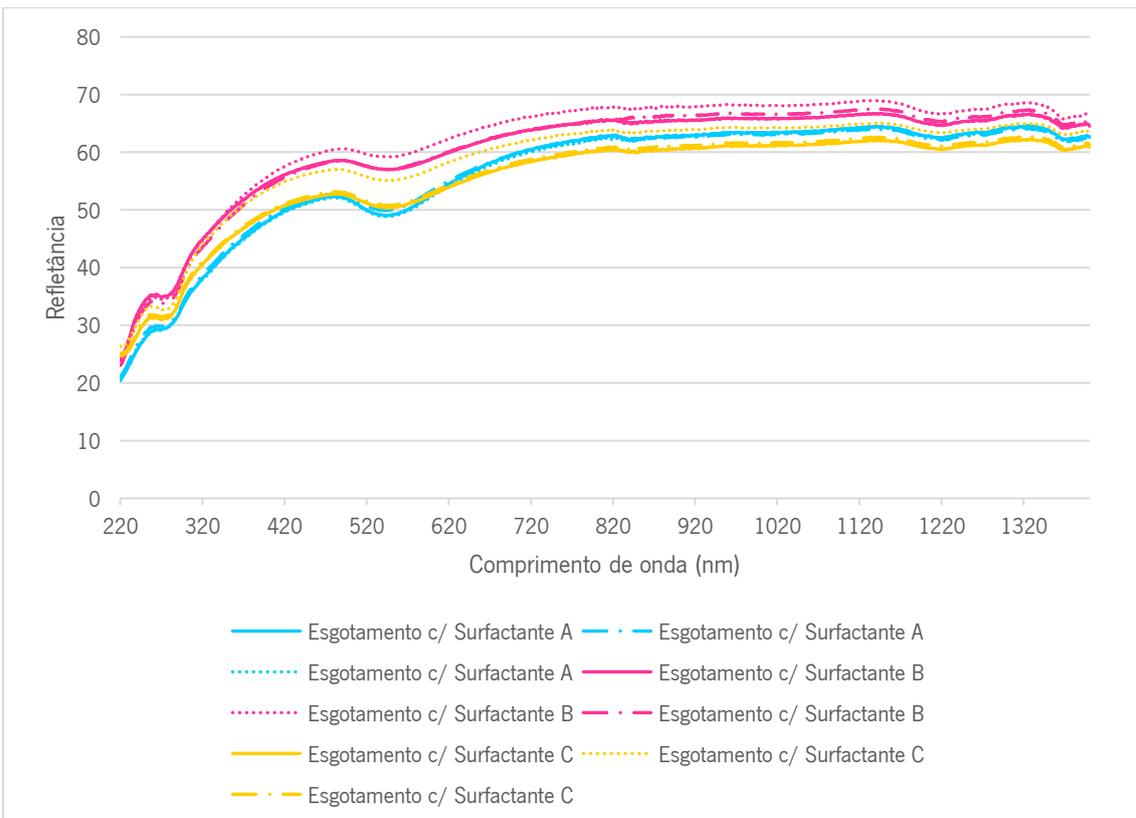


Gráfico 19: Reprodutibilidade das réplicas realizadas para cada amostra durante as leituras no equipamento UV-Vis.

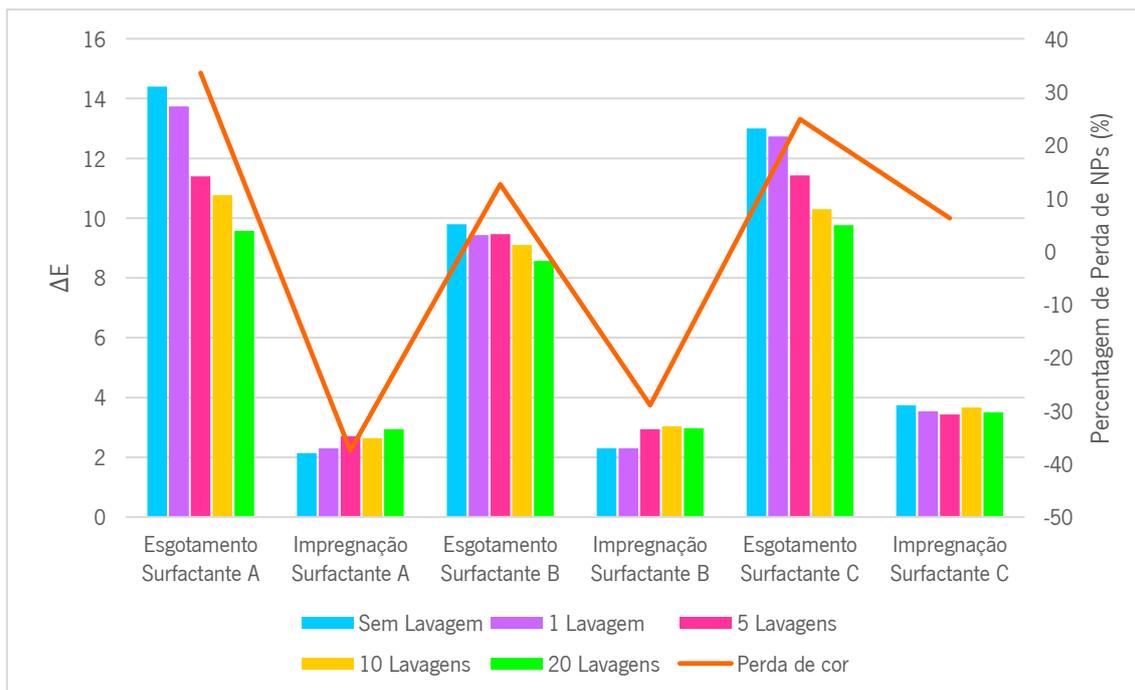


Gráfico 20: Diferença de cor dos substratos funcionalizados por esgotamento ou impregnação antes e após lavagens.

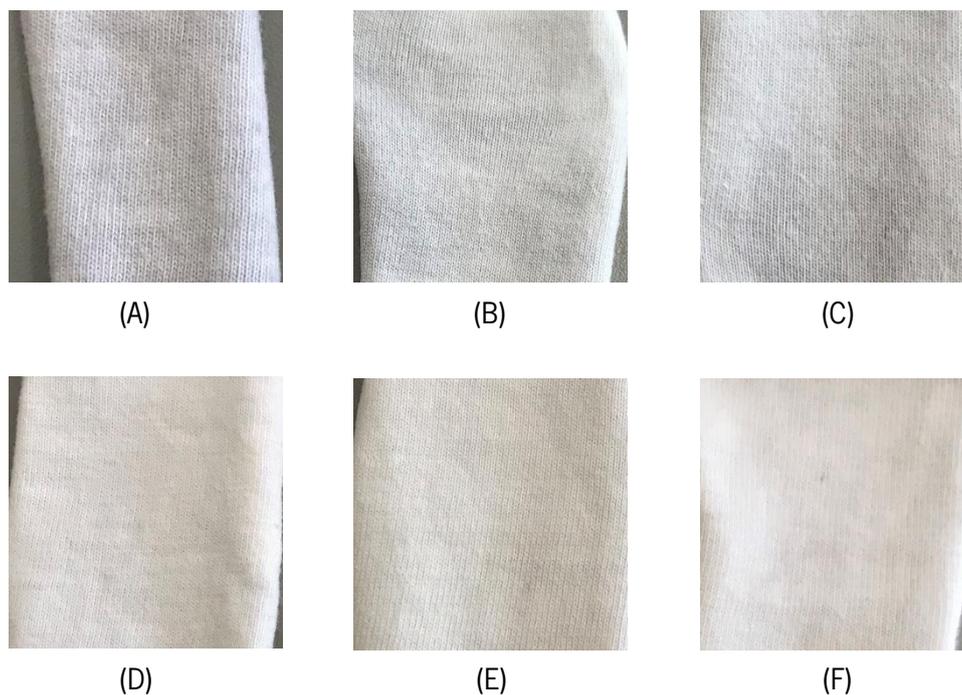


Figura 27: Substrato CO funcionalizado com AuNPs. (A) Esgotamento com surfactante A; (B) Esgotamento com surfactante B; (C) Esgotamento com surfactante C; (D) Impregnação com surfactante A; (E) Impregnação com surfactante B; (F) Impregnação com surfactante C.

De modo a analisar melhor qual seria o surfactante mais adequado para o esgotamento, realizou-se um novo ensaio, usando apenas os surfactantes A e B, conjugados com um novo

surfactante D (ensaio 14). A refletância das amostras resultantes deste ensaio é apresentada no Gráfico 21.

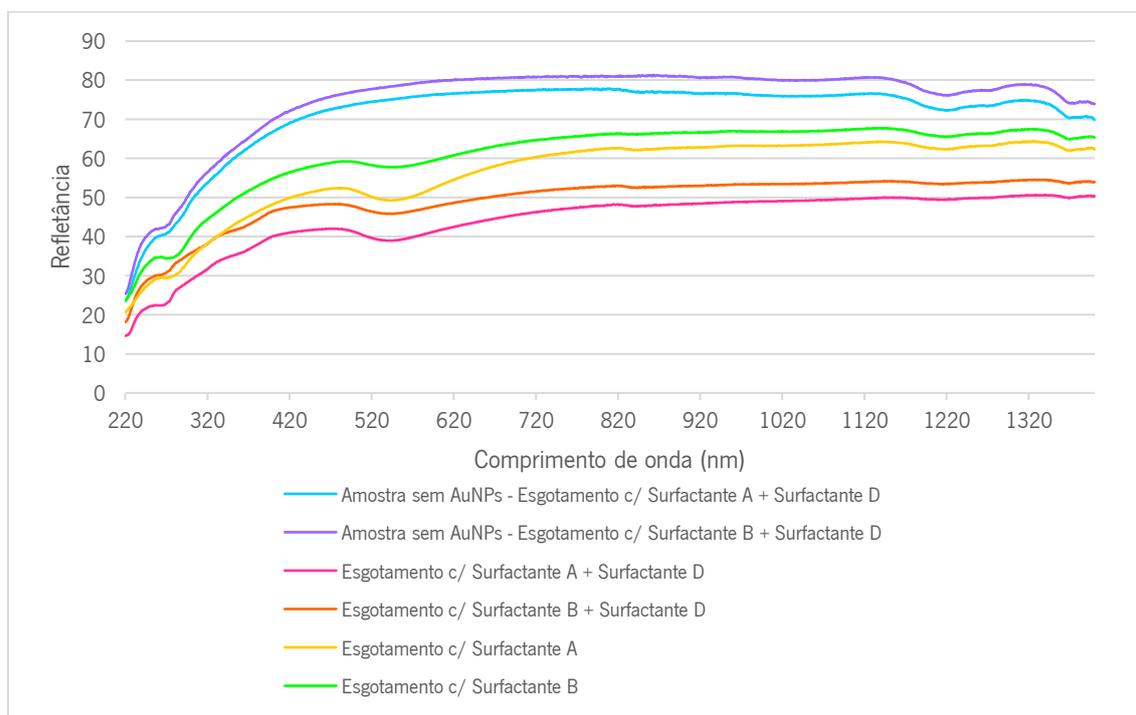


Gráfico 21: Refletância dos substratos CO funcionalizados por esgotamento utilizando surfactantes (Esgotamento a 70°C durante 10 min).

Tal como no Gráfico 18, o Gráfico 21 mostra que, na presença do surfactante A, existe, aparentemente, maior adsorção de nanopartículas no substrato, pelo aumento da tonalidade e consequente diminuição da refletância. Além disso, é possível verificar também que a presença do surfactante D, em conjunto com os surfactantes A ou B, incrementa consideravelmente a ligação de AuNPs, como é possível analisar pela diminuição da refletância das amostras. A Figura 28 também comprova a tonalidade mais escura na amostra funcionalizada por esgotamento com surfactante A + surfactante D.



Figura 28: Substratos CO funcionalizados com AuNPs. Esquerda: Esgotamento com surfactante A + surfactante D; Direita: Esgotamento com surfactante B + surfactante D.

O Gráfico 22, por sua vez mostra a absorvância das AuNPs na zona dos ≈ 550 nm, mais em concreto nas dispersões Mãe, ou seja, antes de ocorrer o esgotamento. Apesar de em ambas as dispersões estar presente a mesma concentração de AuNPs, a absorvância na dispersão com o surfactante A é mais elevada, e a curva das AuNPs é também mais acentuada, provavelmente devido à utilização de surfactantes distintos. Nas dispersões após esgotamento, a absorvância na zona dos ≈ 550 nm é semelhante e bastante próxima de 0, indicando que praticamente todas as AuNPs passaram para o substrato.

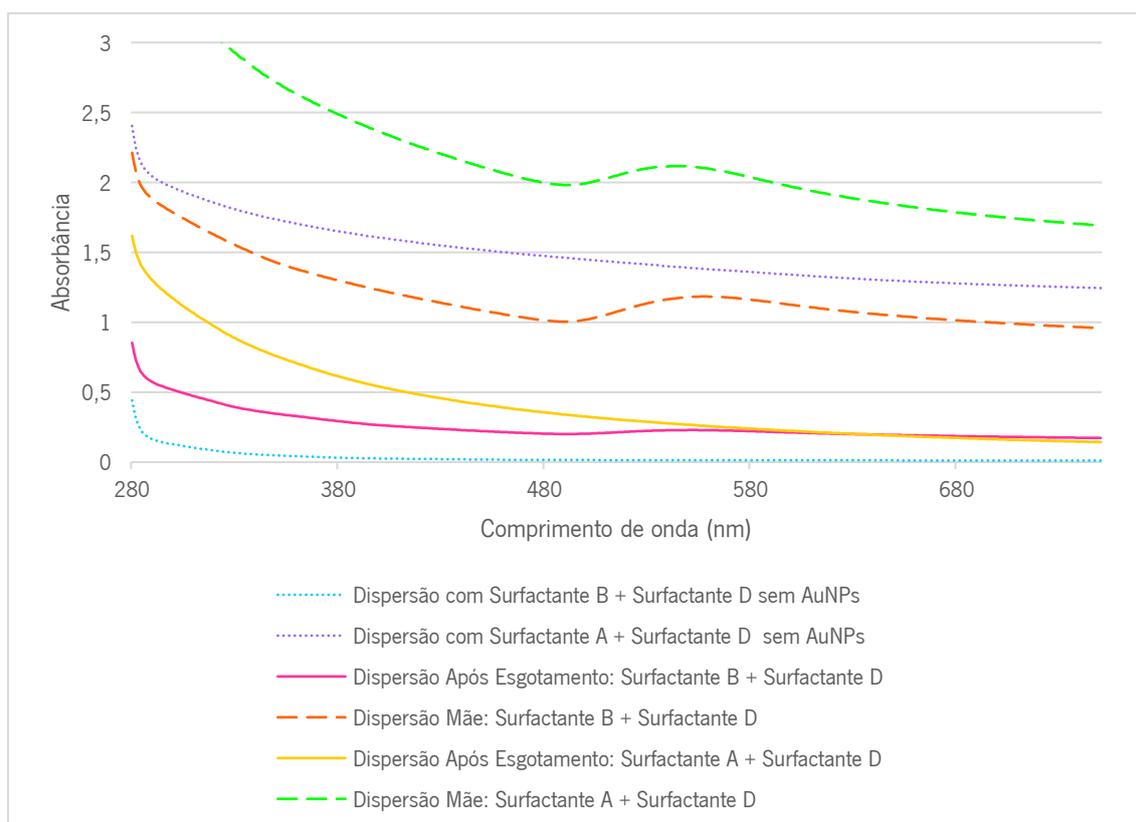


Gráfico 22: Absorvância das dispersões após esgotamento com surfactantes.

4.3.5. Influência da razão de banho

Como um dos objetivos era tornar o processo mais eficiente e sustentável, estudou-se a redução da razão de banho para o processo de esgotamento. Deste modo testaram-se duas novas razões de banho: 1:12 e 1:07.

Como se pode verificar no Gráfico 23, a diminuição da razão de banho levou a um aumento da refletância das amostras funcionalizadas e, deste modo a uma diminuição da intensidade da coloração das amostras têxteis, ou seja, uma diminuição da quantidade de AuNPs ligadas. Como foram utilizadas as mesmas quantidades de dispersão de esgotamento (alterou-se a dimensão da

amostra têxtil), poder-se-ia assumir que a menor intensidade da coloração era devido a uma maior dispersão das AuNPs nas amostras, contudo, na Figura 29, verifica-se que efetivamente não ocorreu um esgotamento completo das NPs, pois as dispersões após o esgotamento ainda acusam a presença de AuNPs.

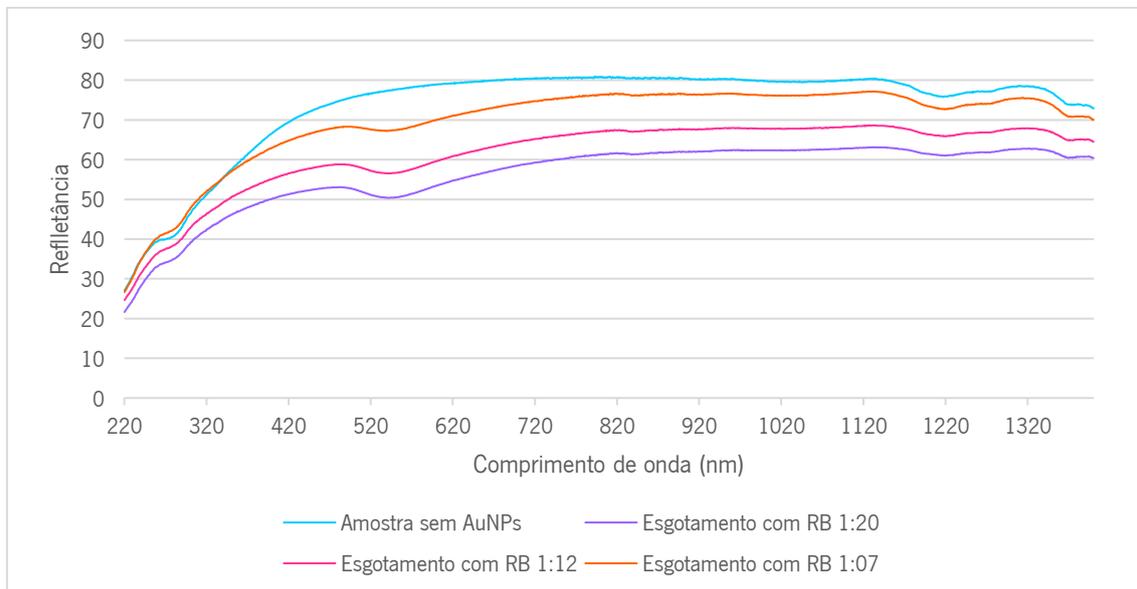


Gráfico 23: Refletância da amostra de CO funcionalizada por esgotamento utilizando diferentes razões de banho (Esgotamento a 60 °C durante 60 min).

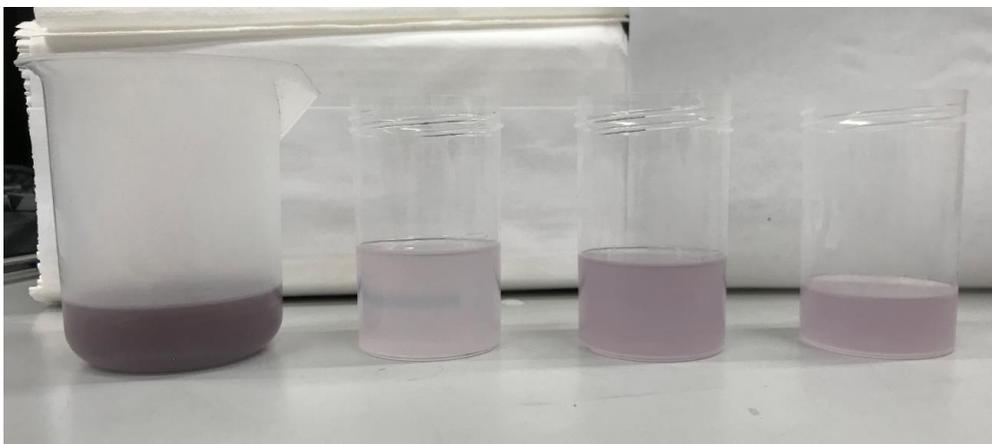


Figura 29: Da esquerda para a direita: Dispersão Mãe; Dispersão após esgotamento RB 1:20; Dispersão após esgotamento RB 1:12; Dispersão após esgotamento RB 1:07.

Ainda de acordo com a Figura 29, o Gráfico 24 mostra também que o processo foi menos eficiente nos esgotamentos com razão de banho inferior, sendo que estes apresentam uma absorvância com uma ligeira curva entre os 500-550 nm, que é a zona onde as AuNPs apresentam maior absorvância. Assim, ao contrário do que seria espectável, a diminuição da razão de banho leva a uma menor ligação/adsorção das AuNPs por parte do substrato de algodão. Quanto à solidez às lavagens (Gráfico 25), verifica-se alguma perda de AuNPs nos substratos funcionalizados

com qualquer uma das razões de banho. Contudo, na amostra com razão de banho 1:20, a quantidade de AuNPs parece estabilizar a partir das 5 lavagens.

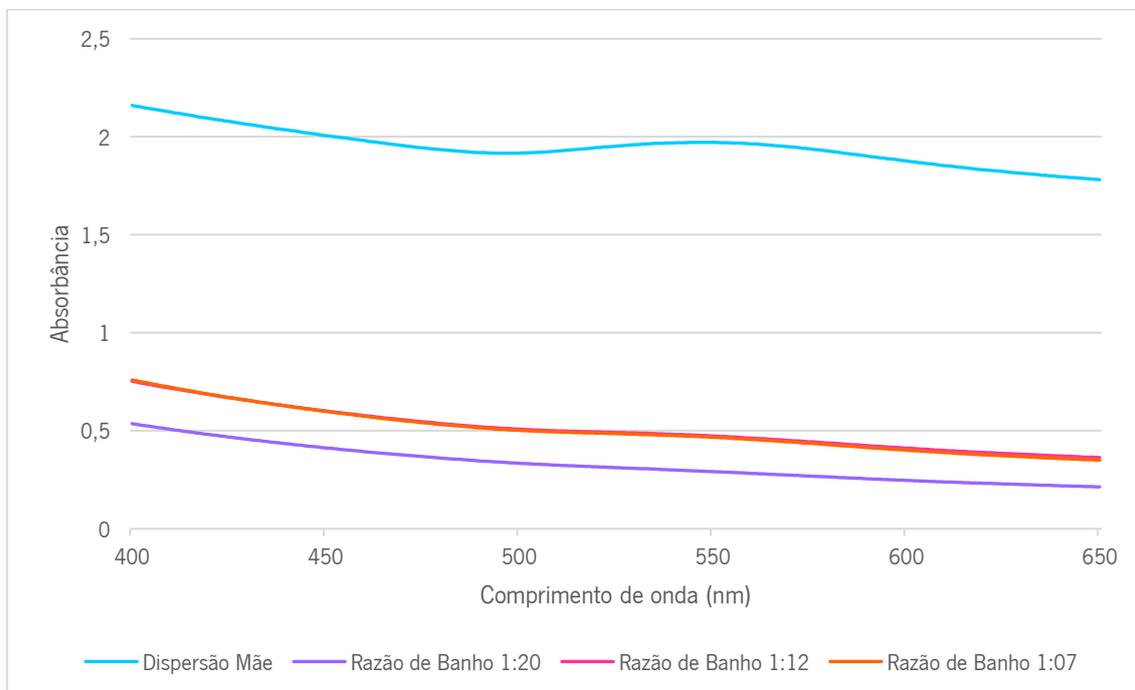


Gráfico 24: Absorbância das dispersões após esgotamento com diferentes razões de banho.

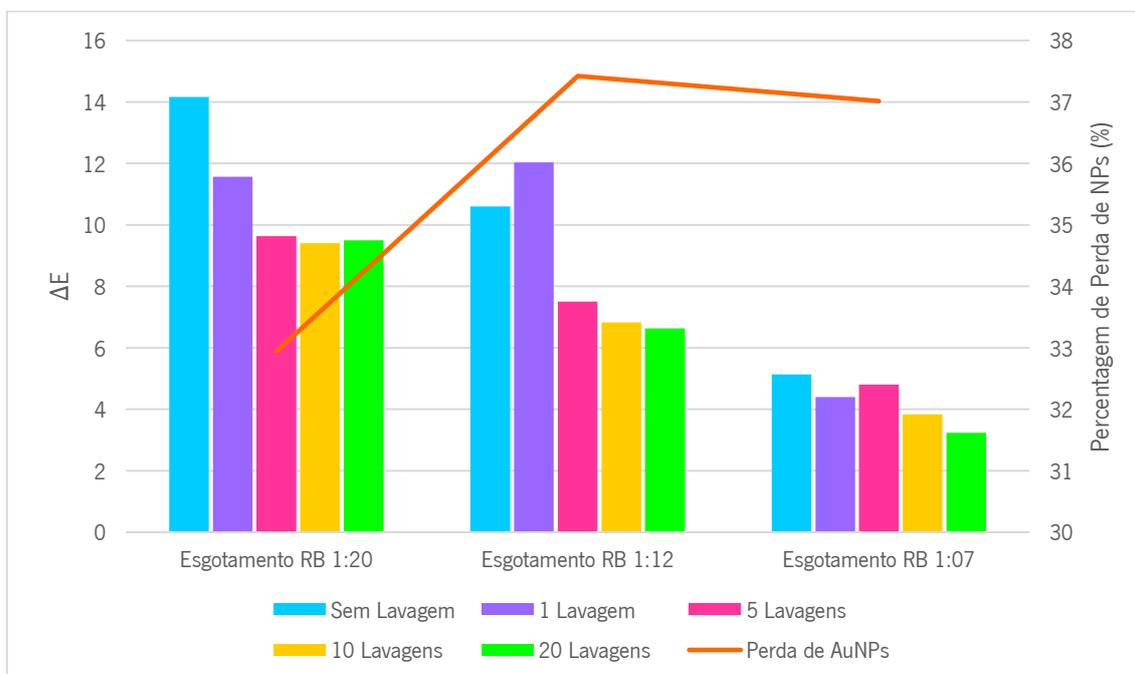


Gráfico 25: Diferença de cor dos substratos funcionalizados por esgotamento com diferentes razões de banho, antes e após lavagens.

4.3.6. Influência dos *crosslinkers*

De modo a incrementar/fortalecer a ligação de AuNPs ao substrato de algodão foram testados dois *crosslinkers* (ensaio 17), de acordo com o que foi estudado no enquadramento teórico: GTA e ácido cítrico.

No Gráfico 26 verifica-se que a amostra sem qualquer tipo de *crosslinkers* apresenta uma refletância bastante inferior na zona dos 570 nm, mostrando que os *crosslinkers* utilizados, ou o meio de aplicação dos mesmos, não foram os mais adequados para o propósito pretendido. Ainda assim, entre os dois *crosslinkers*, o ácido cítrico é o que mais se destaca de forma positiva, pois a amostra funcionalizada na presença deste apresenta refletância inferior. Adicionalmente, no Gráfico 27 verifica-se que a dispersão com ácido cítrico esgotou quase na totalidade. A dispersão com GTA tem valores muito próximos da dispersão sem qualquer tipo de *crosslinkers*. Os resultados contraditórios de ambos os gráficos podem indicar que, mais uma vez, parte das AuNPs foram removidas durante a lavagem superficial realizada antes da secagem das amostras. Isto sugere que, ao invés de servir como agente ligante durante a funcionalização, os *crosslinkers* parecem ter prejudicado na ligação das AuNPs ao substrato.

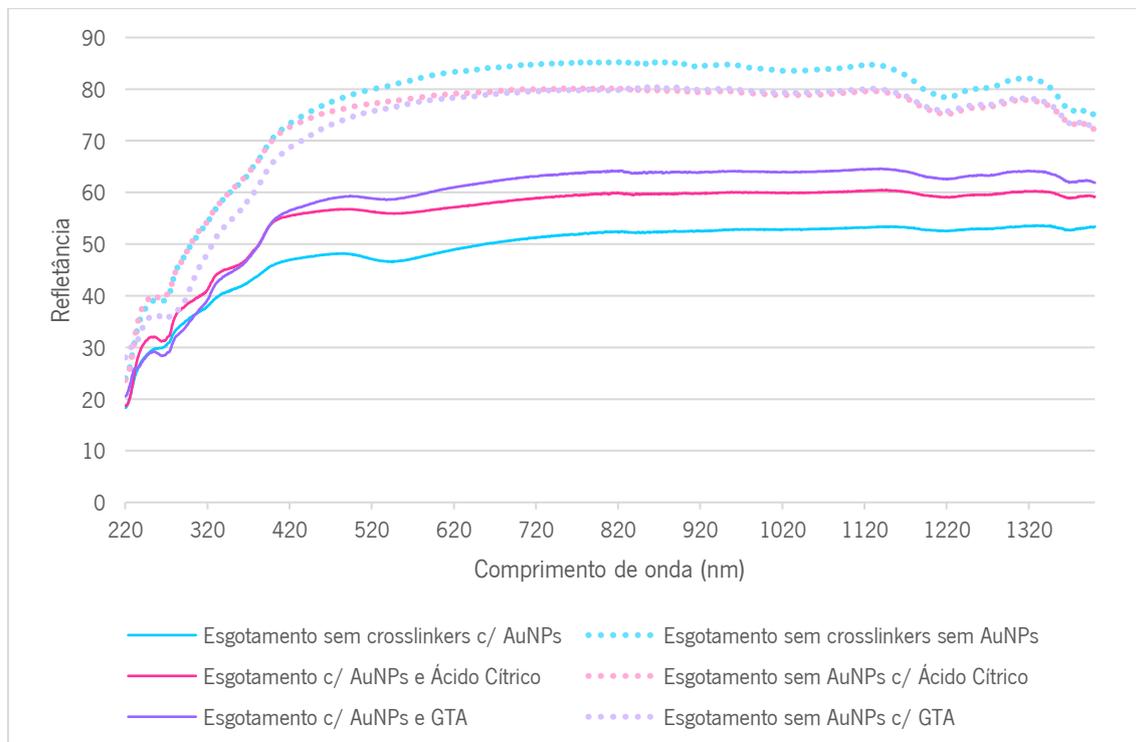


Gráfico 26: Refletância das amostras de CO funcionalizados por esgotamento utilizando diferentes de *crosslinkers*. (Esgotamento a 70 °C durante 10 minutos; 0,1 mg/mL de AuNPs; 4 g/L surfactante A; 5 g/L surfactante D; sem ajuste de pH na presença do ácido cítrico)

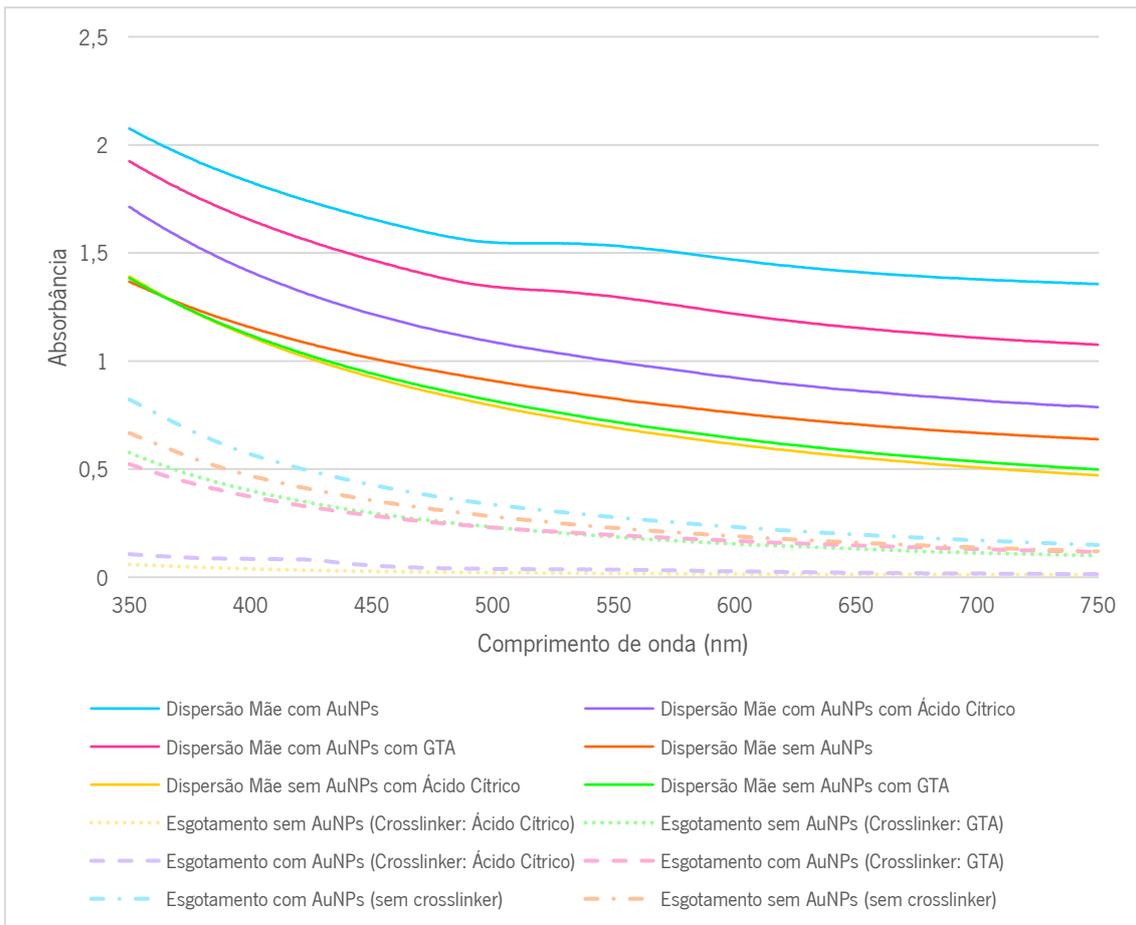


Gráfico 27: Absorbância das dispersões após esgotamento com diferentes *crosslinkers*.



Figura 30: Amostras de algodão funcionalizadas por esgotamento com ácido cítrico, sem AuNPs (esquerda) e com AuNPs (direita).



Figura 31: Amostras de algodão funcionalizadas por esgotamento com GTA, sem AuNPs (esquerda) e com AuNPs (direita).

A solidez às lavagens dos substratos funcionalizados na presença de *crosslinkers* foi inferior à do substrato funcionalizado sem *crosslinkers*, como mostra o Gráfico 28. De modo geral, o substrato funcionalizado com ácido cítrico perdeu aproximadamente 25 % de AuNPs ao longo das lavagens, o substrato funcionalizado com GTA perdeu aproximadamente 35 % de AuNPs, enquanto o substrato funcionalizado sem *crosslinkers* perdeu apenas cerca de 18 %. Verifica-se então que as nanopartículas não conseguiram ligar-se ao substrato de algodão eficazmente, utilizando *crosslinkers*.

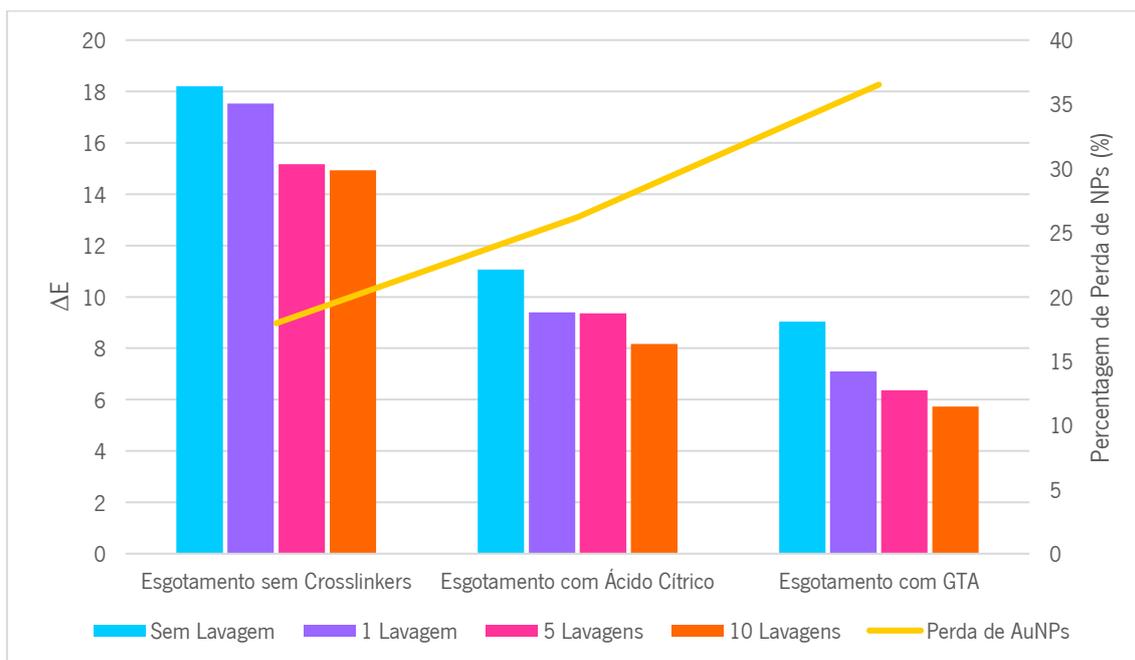


Gráfico 28: Diferença de cor dos substratos funcionalizados na presença de *crosslinkers* antes e após lavagens.

4.3.7. DoE

A utilização da metodologia DoE permitiu analisar duas variáveis em simultâneo: o tempo e a temperatura de esgotamento. O principal objetivo desta análise foi entender qual seria a melhor combinação destas duas variáveis, de modo a aumentar a eficiência do esgotamento. Como foi referido anteriormente, testaram-se duas temperaturas (20 °C e 80 °C) e dois tempos de esgotamento (10 min e 60 min), e por isso realizaram-se quatro ensaios com condições “extremas”, mais três ensaios com condições centrais.

Os valores da refletância e do ΔE antes e após lavagens foram inseridos no programa de DoE, para tentar entender quais eram as condições que potencializavam a ligação de AuNPs ao substrato, e aumentavam a solidez às lavagens. Como se pode analisar no Gráfico 29, apesar de

haver valores de refletância bastante próximos, a amostra com valor mais baixo e, portanto, com maior intensidade de cor, é a amostra resultante do esgotamento a 80 °C durante 10 minutos. Pode-se notar também que os esgotamentos a 80 °C e os esgotamentos com condições centrais (50 °C durante 35 minutos) apresentaram refletâncias bastante semelhantes, o que indica que a temperatura poderá ter mais influência que o tempo no resultado final da funcionalização do substrato. As amostras funcionalizadas em condições de menor temperatura, apresentaram maior refletância e, portanto, menor intensidade de cor.

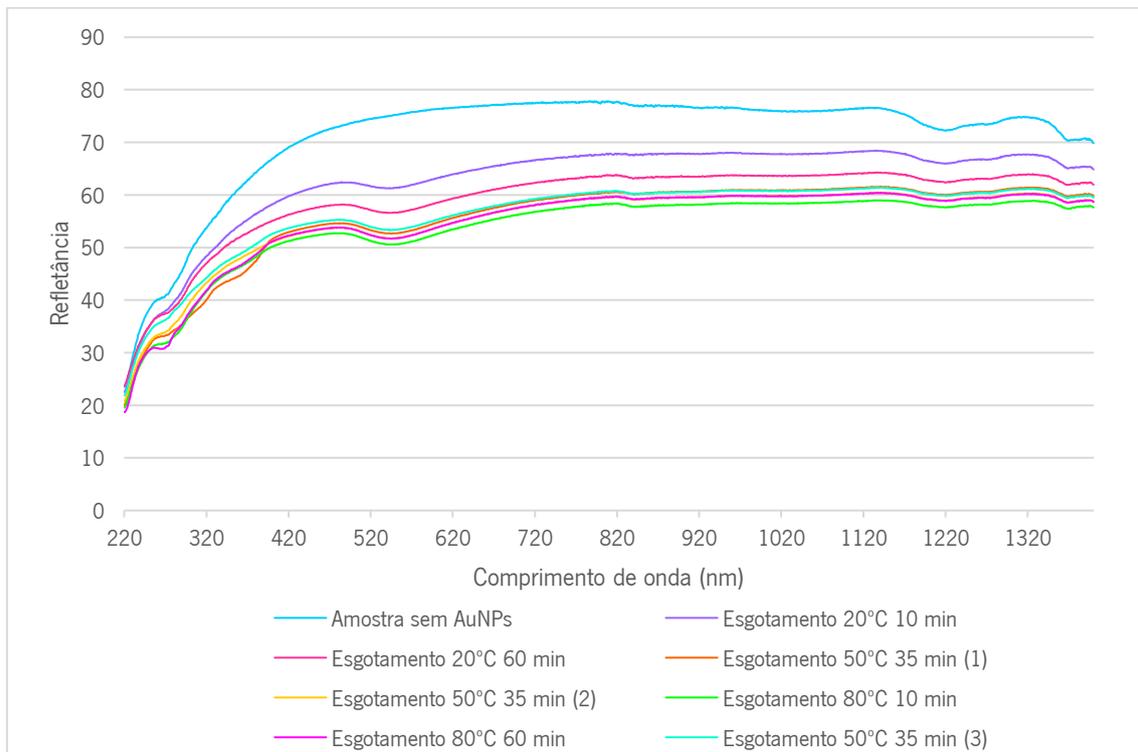


Gráfico 29: Refletância das amostras de CO funcionalizados por esgotamento utilizando diferentes condições de esgotamento.

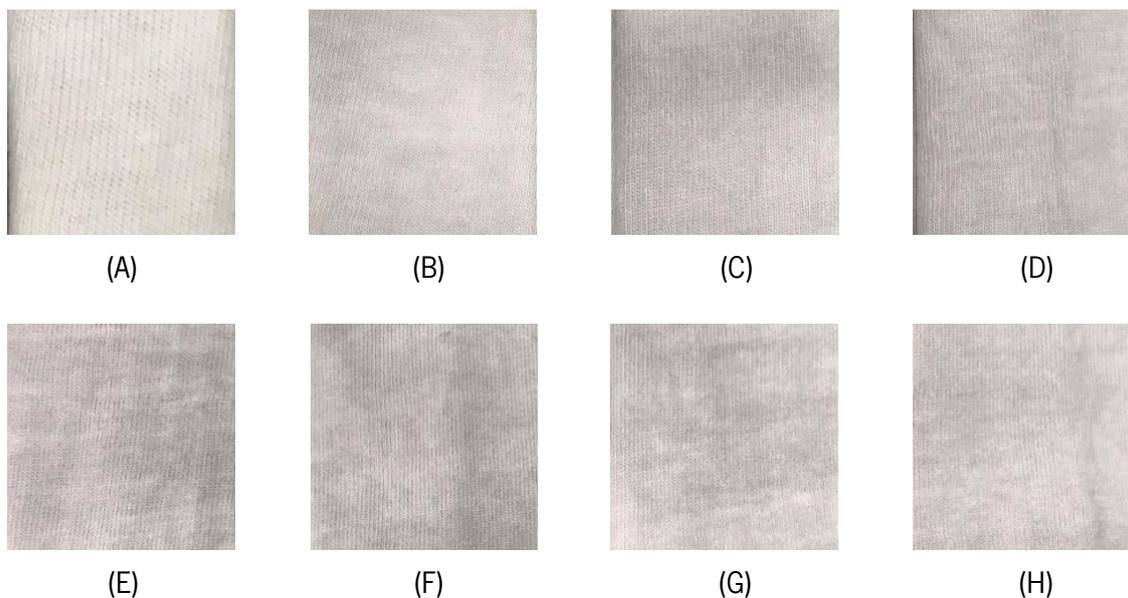


Figura 32: Amostras resultantes dos ensaios DoE. Esgotamento com 0,1 mg/mL AuNPs (ou sem NPs); 4 g/L Surfactante A; 5 g/L Surfactante D. (A) Branco, sem AuNPs, 60 °C durante 60 min. (B) 20°C durante 10 min. (C) 20°C durante 60 min. (D) 50°C durante 35 min. (E) 50 °C durante 35 min. (F) 80 °C durante 10 min. (G) 80 °C durante 60 min. (H) 50 °C durante 35 min.

No Gráfico 30 estão apresentados os diversos valores que foram analisados pelo programa DoE: Percentagem de refletância das amostras têxteis a 570 nm relativamente a uma amostra sem AuNPs; percentagem de absorbância das dispersões após esgotamento a 570 nm relativamente à solução mãe; K/S a 570 nm e diferença de cor (ΔE). No gráfico é possível constatar que a amostra com maior percentagem de refletância e, portanto, com maior proximidade à amostra sem AuNPs é a amostra funcionalizada a 20 °C durante 10 minutos, tal como era esperado, e indo de encontro ao Gráfico 29. As amostras funcionalizadas a mais de 50 °C apresentam valores próximos, maioritariamente abaixo dos 70 % de refletância. Por outro lado, a percentagem de absorbância das dispersões permite identificar a percentagem de AuNPs que ficaram na dispersão, considerando que a dispersão mãe, antes do esgotamento, equivale a 100 %. Nesta situação, verificou-se que todas as dispersões se mantêm abaixo dos 40 % sendo que, tal como era esperado, a dispersão do esgotamento a 20 °C durante 10 minutos apresenta o valor mais elevado de AuNPs, e a dispersão do esgotamento a 80 °C durante 10 minutos apresenta o valor mais baixo de AuNPs. A diferença de cor, assim como o K/S a 570 nm foram mais elevados na amostra funcionalizada a 80 °C durante 10 minutos. Por estes motivos, entende-se que o esgotamento fora mais eficaz nestas condições.

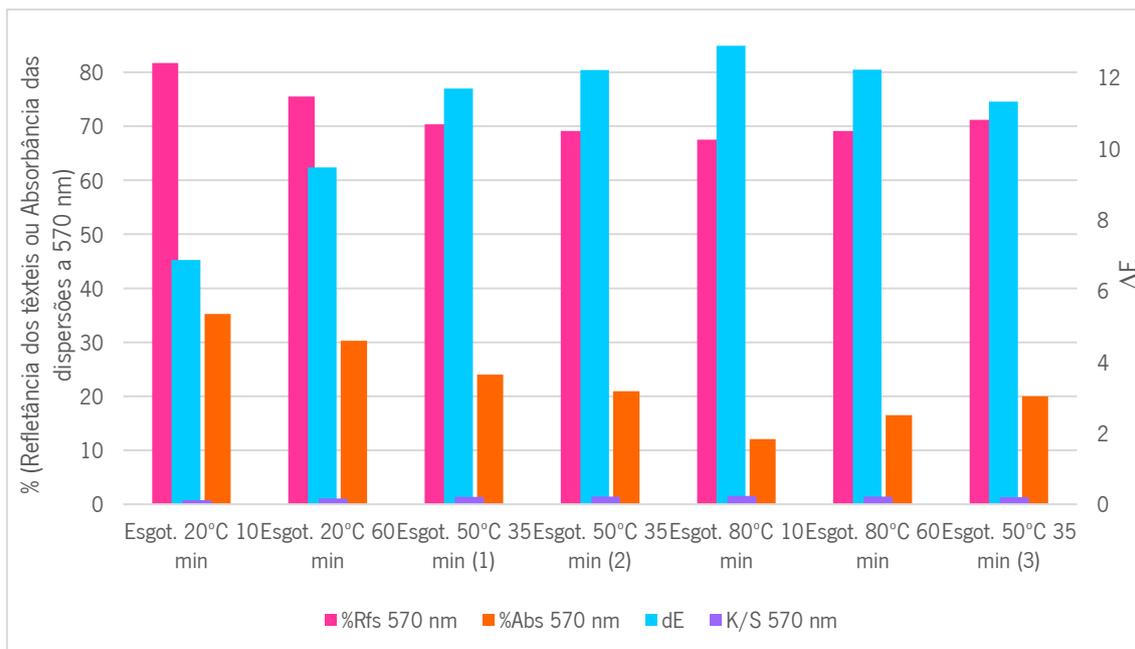


Gráfico 30: Relação entre os valores da percentagem de refletância a 570 nm (relativamente à amostra sem AuNPs); da percentagem de absorbância das dispersões após esgotamento a 570 nm (relativamente à dispersão mãe, com 0,1 mg/mL de AuNPs); do K/S a 570 nm e da diferença de cor (ΔE).

A solidez às lavagens (Gráfico 31) veio mostrar que, apesar do valor ΔE , antes das lavagens, ser superior na amostra funcionalizada a 80 °C durante 10 minutos, esta é também a amostra que mais perde nanopartículas ao longo das 20 lavagens, perdendo aproximadamente 36 % de AuNPs. Isto indica que a ligação entre as nanopartículas e as fibras têxteis pode não ter sido eficaz, por diversas razões, entre elas o tempo de esgotamento.

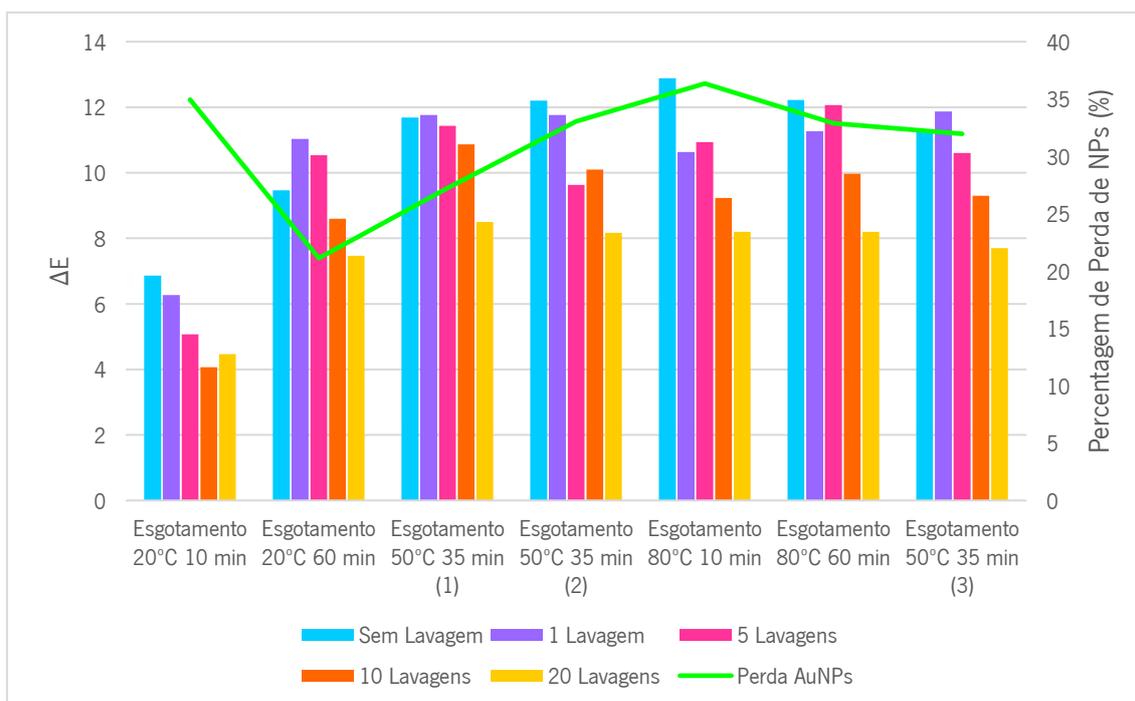


Gráfico 31: Diferença de cor dos substratos funcionalizadas por esgotamento com diferentes condições, antes e após lavagens.

Após submeter os valores anteriormente mencionados do programa DoE State-Ease® ‘Design Expert’ (version 12), analisaram-se os mesmos graficamente e por meio de regressão linear, concluindo-se que as condições ótimas para o esgotamento seriam a 70 °C durante 10 min. No Gráfico 32 é possível comparar os valores da percentagem de refletância, percentagem de absorvância, diferença de cor e K/S da amostra funcionalizada nas condições ótimas com as restantes amostras previamente funcionalizadas.

Como é possível verificar, a diferença de cor é superior nesta amostra, em comparação com as restantes, assim como o K/S. Para além disso, os valores da percentagem de refletância da amostra têxtil e de absorvância da dispersão de esgotamento são inferiores, indicando que houve uma maior quantidade de nanopartículas a passar da dispersão para o substrato e a ligar-se ao mesmo.

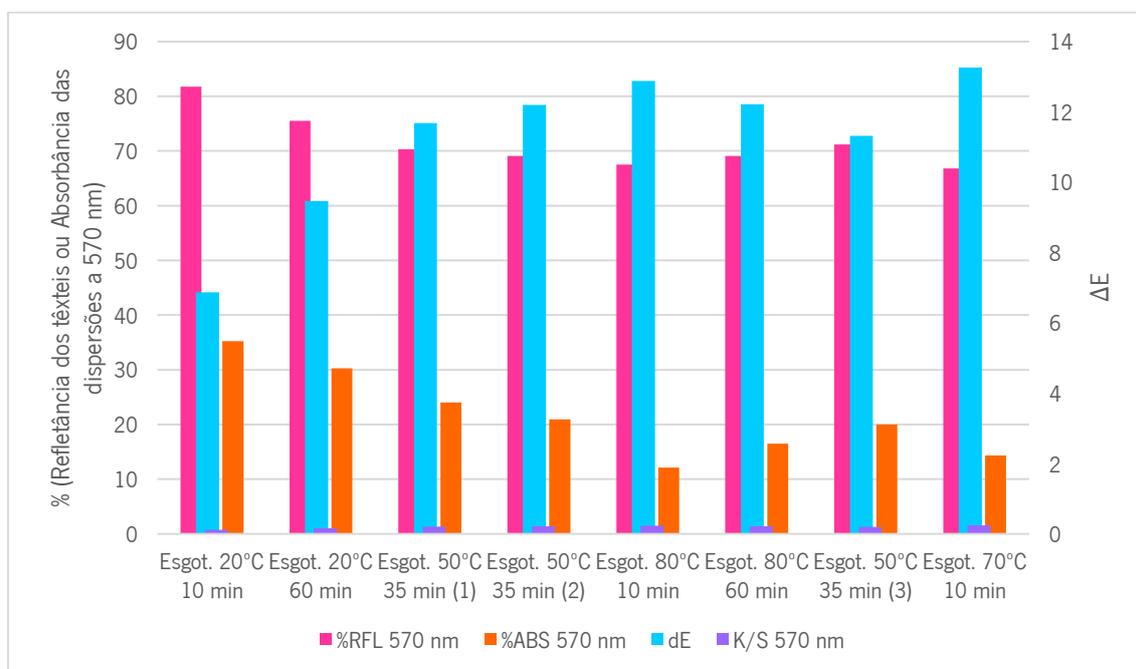


Gráfico 32: Relação entre os valores da percentagem de refletância a 570 nm (relativamente à amostra sem AuNPs); da percentagem de absorvância das dispersões após esgotamento a 570 nm (relativamente à dispersão mãe, com 0,1 mg/mL de AuNPs); do K/S a 570 nm e da diferença de cor (ΔE).

No Gráfico 33 é possível comparar novamente o comportamento das amostras funcionalizadas às lavagens, com a adição da amostra funcionalizada nas condições ótimas. Como foi referido anteriormente, a amostra funcionalizada a 80 °C durante 10 minutos, apresenta uma elevada diferença de cor, em comparação com as restantes, contudo, é também a amostra que mais perde nanopartículas ao longo das lavagens. A amostra funcionalizada a 70 °C durante 10 minutos apresenta uma diferença de cor mais elevada que as restantes, e evidencia também uma diminuição da perda de nanopartículas nas lavagens, relativamente à amostra mencionada

anteriormente, perdendo aproximadamente 28 % de AuNPs ao longo das lavagens. Apesar desta diminuição, há ainda amostras com comportamento à solidez mais estável, como é o caso da primeira amostra funcionalizada em condições centrais (50 °C durante 35 min). Apesar da perda de NPs nas lavagens, a amostra funcionalizada a 70 °C durante 10 min é a que apresenta maior ΔE ao fim de 20 lavagens, ou seja, é a que apresenta maior quantidade de NPs e daí se ter considerado estas as condições ótimas para a funcionalização.

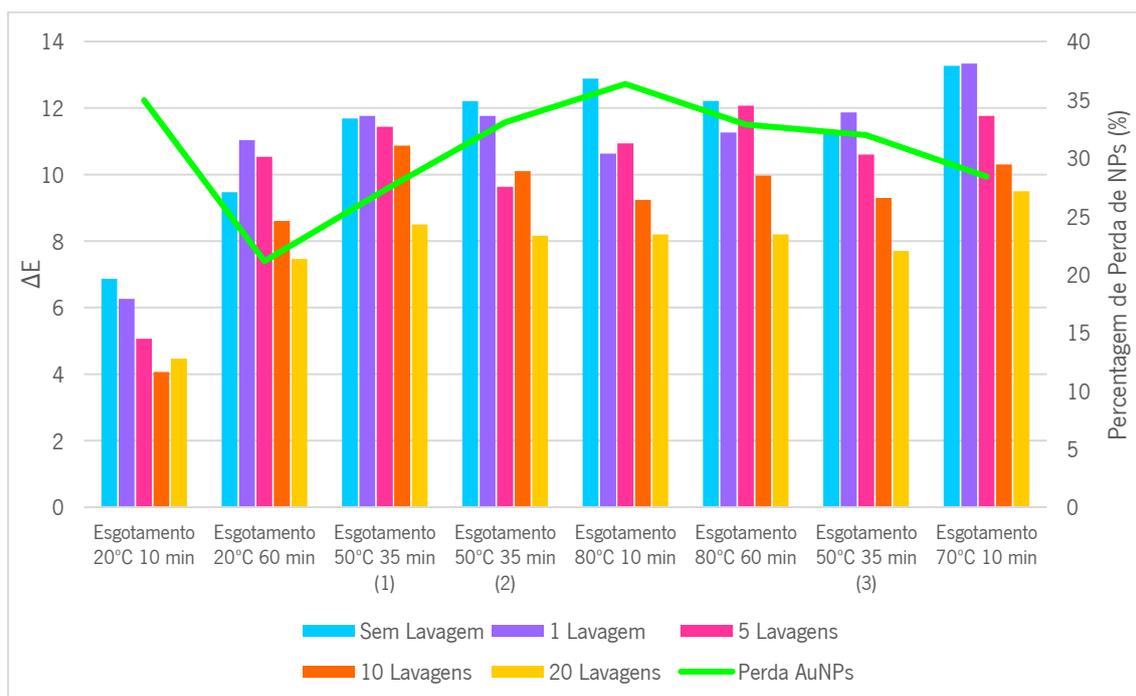


Gráfico 33: Diferença de cor dos substratos funcionalizadas por esgotamento com diferentes condições, antes e após lavagens.

4.3.8. Funcionalização nos diferentes substratos

Para uma melhor gestão de recursos, durante grande parte deste projeto foram realizados ensaios somente no substrato de algodão, por ser o mais hidrofílico, de modo a estabelecer as melhores condições para a funcionalização dos restantes substratos com as AuNPs. Após serem delineadas estas condições, passou-se à funcionalização dos restantes substratos: algodão tingido, mistura algodão/poliéster e poliéster branqueado.

O Gráfico 34 mostra a refletância dos substratos após o esgotamento com e sem AuNPs dos diferentes substratos. A amostra de algodão é a que apresenta maior diferença de refletância, a 570 nm, comparativamente à amostra sem AuNPs, evidenciando, portanto, maior quantidade de nanopartículas retidas no substrato. As amostras de algodão tingido com e sem NPs,

aparentemente, não têm qualquer diferença na refletância. Este facto pode ser derivado da cor escura do substrato, que acaba por “mascarar” a presença de nanopartículas. Para esta amostra, a melhor avaliação da funcionalização foi através do SEM-EDX e da absorção atômica, que serão analisados mais à frente neste trabalho.



Gráfico 34: Refletância das amostras dos diferentes substratos funcionalizados por esgotamento a 70°C durante 10 minutos, com 0,1 mg/mL de AuNPs, 4 g/L surfactante A e 5 g/L surfactante D.

As Figuras 33-36 vão de encontro ao que foi mostrado no Gráfico 34. A amostra de algodão com meia branqueação apresenta uma diferença de tonalidade significativa, assim como a amostra de poliéster branqueado. Ambas adquirem uma tonalidade mais escura, em tom roxo, característica destas NPs. A amostra da mistura de algodão/poliéster tem também uma alteração da tonalidade, contudo, não tão acentuada e, para além disso, existem vestígios de manchamento. Por último, a amostra de algodão tingido (olive) não apresenta, aparentemente, qualquer alteração de cor. Novamente, isto pode acontecer devido à amostra apresentar já uma tonalidade muito escura e, por isso, é difícil de observar a olho nu a presença das AuNPs.



Figura 33: Substratos de algodão com meia branqueação tratados por esgotamento sem AuNPs (esquerda) e com 0,1 mg/mL AuNPs (direita).



Figura 34: Substratos de algodão tingido (olive) tratados por esgotamento sem AuNPs (esquerda) e com 0,1 mg/mL AuNPs (direita).



Figura 35: Substratos de mistura algodão/poliéster tratados por esgotamento sem AuNPs (esquerda) e com 0,1 mg/mL AuNPs (direita).



Figura 36: Substratos de poliéster tratados por esgotamento sem AuNPs (esquerda) e com 0,1 mg/mL AuNPs (direita).

A análise da absorvância das dispersões após esgotamento (Gráfico 35), confirmou aquilo que se previa: a amostra de algodão tingido (olive) foi funcionalizada com nanopartículas, visto que, apesar de não ter um rendimento de 100 %, existe uma redução significativa de AuNPs, o que indica que, pelo menos uma parte delas, passou da dispersão para o substrato. O gráfico

mostra que os substratos que obtiveram menor rendimento de esgotamento foram os substratos de algodão tingido e mistura de algodão/poliéster. Isto pode ter acontecido devido, por exemplo, aos substratos serem tingidos e, por este motivo, não haver tantos grupos funcionais disponíveis para ligar com as nanopartículas. Por outro lado, a absorbância das dispersões após esgotamento com AuNPs dos substratos de algodão com meia branqueação e do poliéster branqueado é bastante próxima à absorbância das dispersões após esgotamento sem AuNPs nestes substratos. A Figura 37 mostra que a dispersão do esgotamento de algodão com meia branqueação é a mais límpida. Em contrapartida, as dispersões após esgotamento dos substratos de algodão tingido e da mistura algodão/poliéster evidenciaram perda de cor do próprio substrato, o que dificultou a percepção, a olho nu, de AuNPs na dispersão.

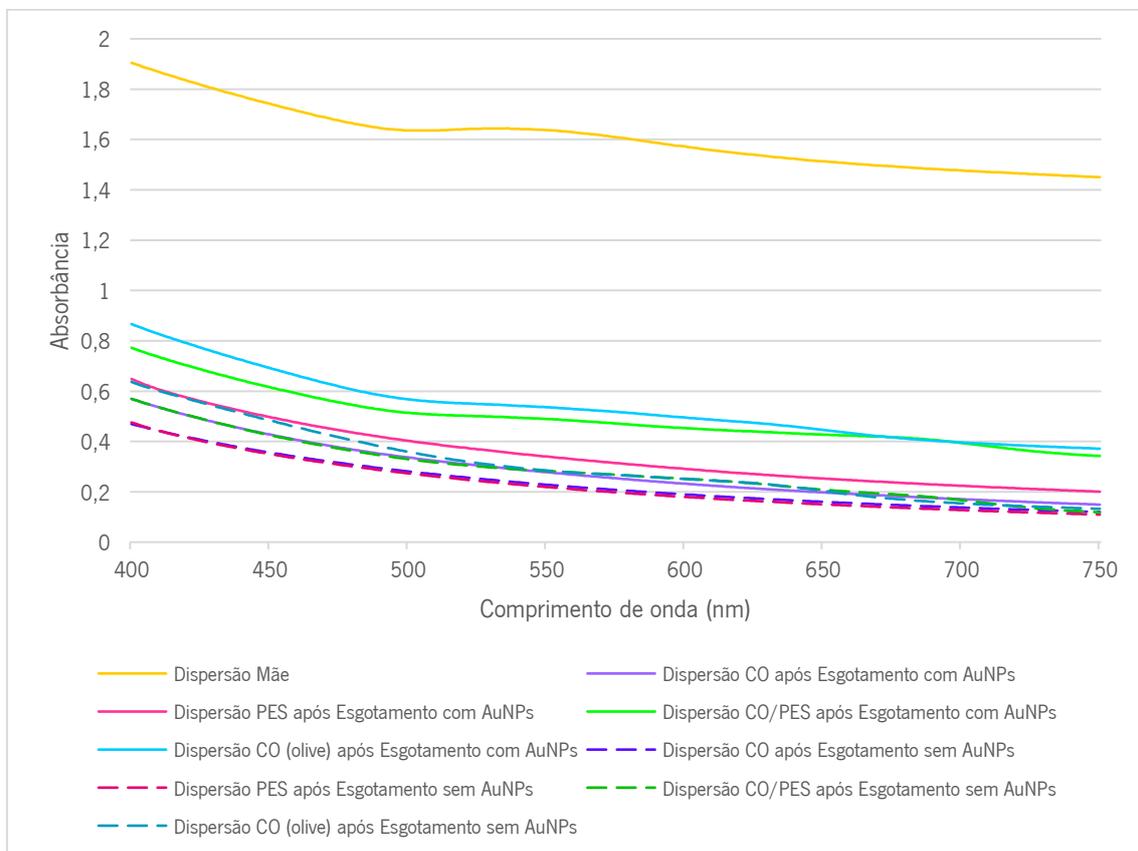


Gráfico 35: Absorbância das dispersões após esgotamento de diferentes substratos.

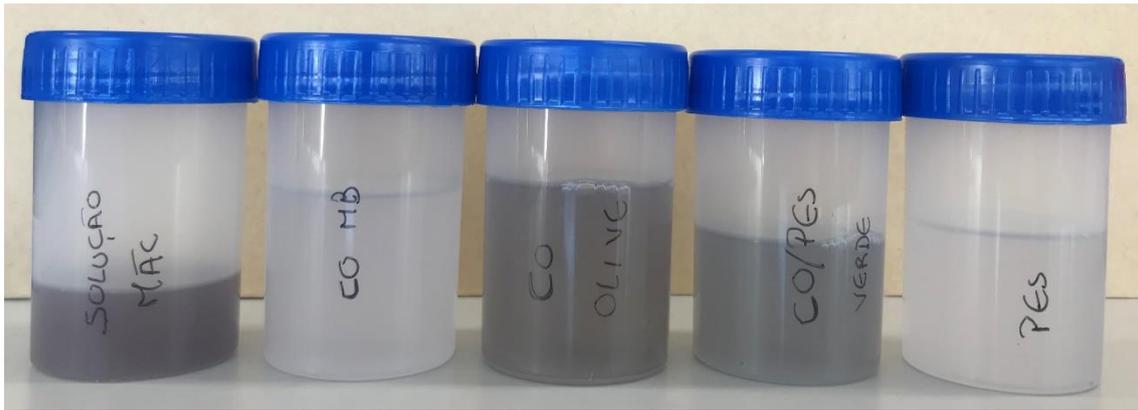


Figura 37: Dispersões após esgotamento de diferentes substratos: Da esquerda para a direita: Dispersão mãe (antes do esgotamento, com 0,1 mg/mL de AuNPs); Dispersão após esgotamento de algodão com meia branqueação; Dispersão após esgotamento de algodão tingido (olive); Dispersão após esgotamento de mistura algodão/poliéster; Dispersão após esgotamento de poliéster branqueado.

Relativamente à solidez às lavagens, verifica-se que o substrato de poliéster perde uma grande quantidade de AuNPs ao longo das mesmas. Isto significa que no momento do esgotamento as nanopartículas foram adsorvidas pelo substrato, mas apenas uma pequena parte delas formou ligação com as fibras e, por este motivo, as nanopartículas que não formaram ligação vão saindo ao longo das lavagens. Nos substratos de algodão tingido (olive) e mistura de algodão/poliéster, a leitura das diferença de cor acaba por ser dificultada devido à coloração que estes apresentam, principalmente o substrato de algodão tingido que já apresenta uma tonalidade escura e por isso os resultados são mais irregulares. No substrato de mistura algodão/poliéster evidencia-se uma perda de cor, provavelmente motivada pela presença do poliéster, que visivelmente não tem tanta afinidade para com as AuNPs como o algodão.

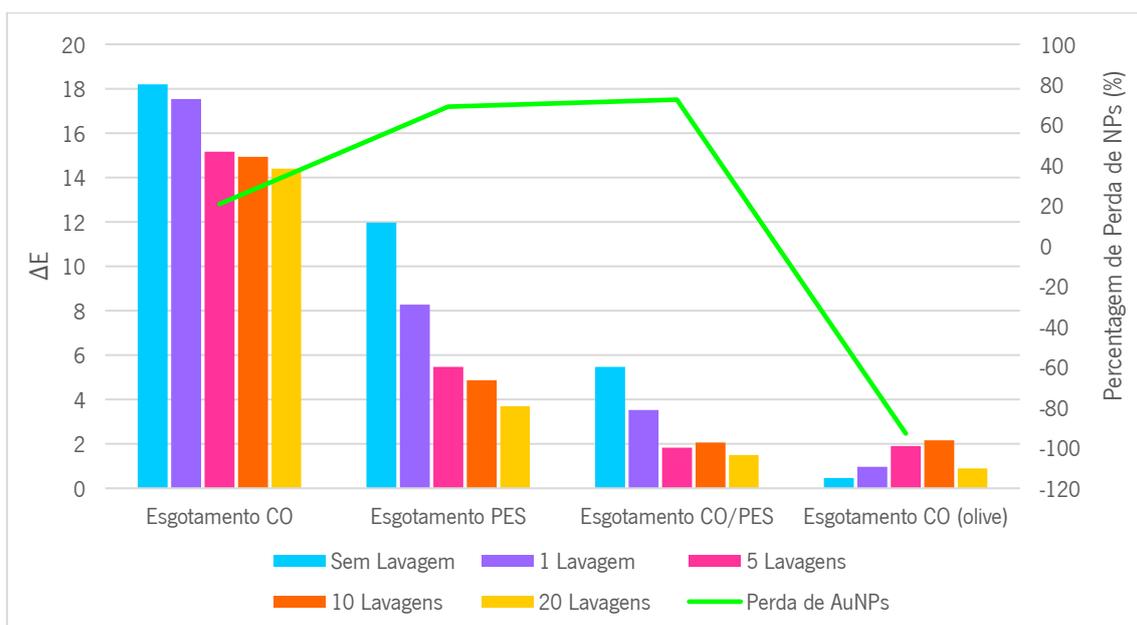


Gráfico 36: Diferença de cor dos diferentes substratos antes e após lavagens.

4.4. Avaliação da Funcionalização dos substratos

4.4.1. Absorção atômica

A absorção atômica permitiu fazer uma quantificação do ouro presente nas amostras têxteis com 1 lavagem e com 20 lavagens, para entender também a solidez à lavagem dos substratos, e quantificar a perda de NPs (através da perda de Au) durante as lavagens. O equipamento utilizado para proceder à absorção atômica determina o teor de ouro dissolvido juntamente com a amostra, e tem um limite de detecção (LD) equivalente a 0,09 mg/L Au e o limite de quantificação (LQ) corresponde a 0,24 mg/L Au. Todos os valores abaixo do LQ não foram quantificados.

As amostras utilizadas neste ensaio foram funcionalizadas nas condições finais: Esgotamento a 70 °C durante 10 minutos; 0,1 mg/mL de AuNPs; 4 g/L surfactante A; 5 g/L surfactante D; pH 9. Antes da funcionalização, o substrato de algodão cru foi submetido apenas a uma meia branqueação, para os substratos de mistura algodão/poliéster e poliéster branqueado aplicou-se lavagem doméstica seguida de plasma atmosférico, e para o substrato de algodão tingido (olive) aplicou-se apenas lavagem doméstica.

Na Tabela 10 é apresentada a quantidade de ouro dissolvido presente em cada uma das amostras. Neste ensaio não foram feitas réplicas devido à quantidade reduzida de amostra para análise.

Tabela 10: Quantificação de Au (mg/L) presente nos diferentes substratos com 1 e 20 lavagens

Amostra	Au (mg/L)
CO 1 lavagem	10,5
CO 20 lavagens	8,0
CO tingido (olive) 1 lavagem	4,4
CO tingido (olive) 20 lavagens	4,1
CO/PES 1 lavagem	7,5
CO/PES 20 lavagens	3,8
PES 1 lavagem	8,5
PES 20 lavagens	2,8

Os resultados apresentados vão de encontro aos resultados dos gráficos UV-Vis da refletância e diferença de cor (Gráficos 34 e 36), em quase todas as amostras. No caso do substrato de algodão, já era espectável que este substrato fosse o que tivesse maior concentração de ouro, tanto com 1 lavagem como com 20 lavagens. O substrato de algodão tingido (olive) apresentou uma concentração de ouro mais baixa, com apenas uma lavagem, que os restantes substratos. Contudo, a concentração de ouro manteve-se praticamente inalterada após 20 lavagens, o que indica que as poucas NPs que se ligaram ao substrato, formaram ligações fortes e resistentes a lavagens. O substrato de mistura algodão/poliéster evidencia uma baixa solidez das AuNPs às lavagens, visto que a quantidade de ouro diminuiu consideravelmente. Por último o substrato de poliéster foi o que teve o resultado menos esperado: elevada perda de AuNPs (associada à diminuição da quantidade de ouro). No entanto, é importante ressaltar que o pré-tratamento a que os substratos de PES e CO/PES foram sujeitos (plasma) é um tratamento realizado apenas à superfície e, por esse motivo, espera-se que a quantidade de NPs ligadas ao mesmo seja menor relativamente ao substrato de CO, que sofreu uma meia-branqueação em todo o substrato. Para além disso, o PES não apresenta fibrilas nem espaço intrafibrilar, o que dificulta a adsorção de AuNPs.

No Gráfico 36 verifica-se que, apesar de perder NPs ao longo das lavagens, a amostra de poliéster ainda apresenta uma diferença de cor considerável, inclusive, em relação aos substratos de algodão tingido e mistura de algodão poliéster e, por este motivo, o resultado não foi o espectável. O mesmo pode ser derivado de um erro durante a dissolução dos substratos.

Apesar de não ter sido realizado, seria interessante analisar uma dispersão com 0,1 mg/mL de AuNPs por absorção atômica, para entender a quantidade de ouro presente numa dispersão e perceber se as quantidades apresentadas na Tabela 10 indicam que a funcionalização dos substratos foi eficaz.

4.4.2. SEM-EDS

A análise SEM-EDS foi realizada tanto na Universidade do Minho como no Instituto Jožef Stefan (JSI). As amostras analisadas no JSI foram funcionalizadas por esgotamento a 70 °C durante 10 minutos, com 0,1 mg/mL de AuNPs; 4 g/L de surfactante A; 5 g/L de surfactante D; pH 9 e tinham 20 lavagens. Para além disso, os pré-tratamentos aplicados nos substratos foram meia-branqueação para o algodão tingido e lavagem doméstica para os restantes. As amostras analisadas na Universidade do Minho foram funcionalizadas por esgotamento a 70 °C durante 10 minutos, com 0,1 mg/mL de AuNPs; 4 g/L de surfactante A; 5 g/L de surfactante D; pH 9 e tinham 1 lavagem. O substrato de algodão foi pré-tratado com meia branqueação, o substrato de algodão tingido foi pré-tratado com lavagem doméstica e os substratos de algodão/poliéster e poliéster branqueado foram pré-tratados com plasma atmosférico.

Ensaio SEM – Instituto Jožef Stefan

As imagens resultantes da análise SEM mostram que o substrato de algodão foi o que apresentou maior quantidade e uniformidade de NPs, relativamente aos restantes substratos, tal como já era espectável (Figura 38). Nas restantes amostras, a quantidade de NPs nos substratos foi inferior, decrescendo de CO tingido para PES, até CO/PES (Figura 40). Na análise EDS foi detetado, em todos os substratos, não só ouro, proveniente das AuNPs, mas também cálcio, proveniente da apatite. Através das imagens sem AuNPs dos substratos, pode-se evidenciar também que alguns deles (CO tingido; CO/PES; PES) apresentavam impurezas. Apesar das amostras destes ensaios não serem as mesmas utilizadas no ensaio de absorção atômica, os resultados coincidem, pois no último verificou-se que, após 20 lavagens, o substrato de CO era o que apresentava maior quantidade de AuNPs, seguido de CO tingido, e os substratos de PES e CO/PES apresentavam a menor quantidade de AuNPs.

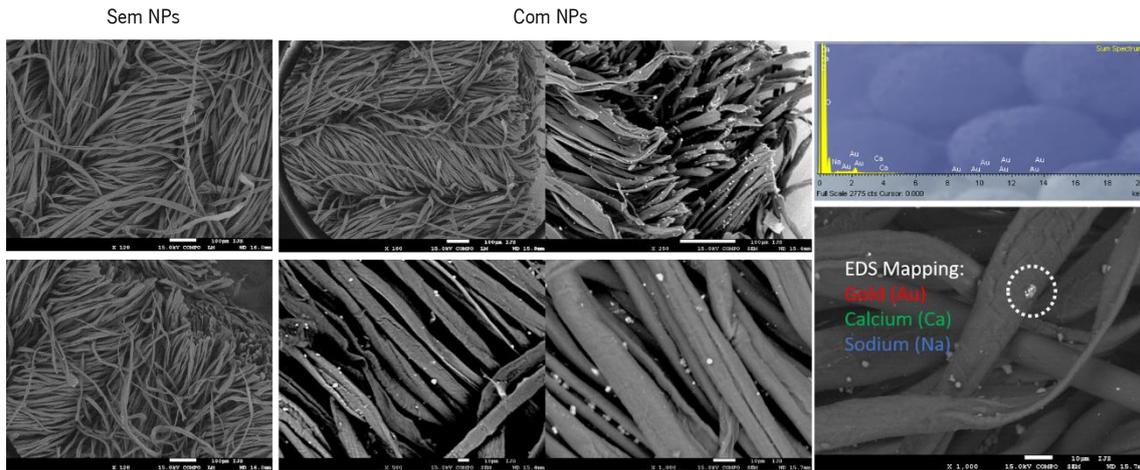


Figura 38: SEM do substrato de CO com e sem AuNPs; Espetro EDS e análise elemental mapeada.

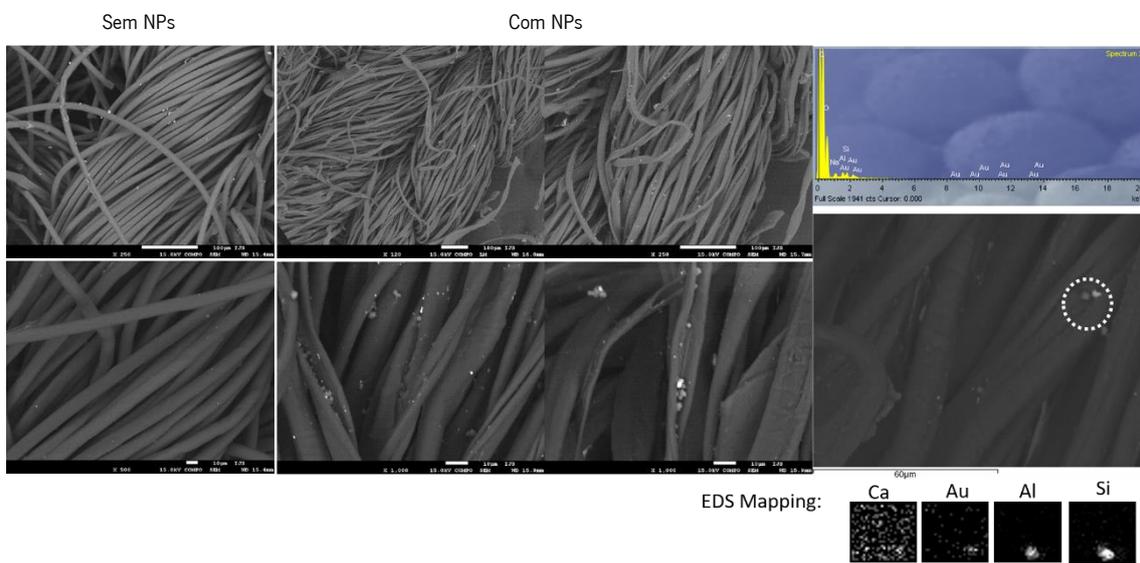


Figura 39: SEM do substrato de CO tingido (olive) com e sem AuNPs; Espetro EDS e análise elemental mapeada.

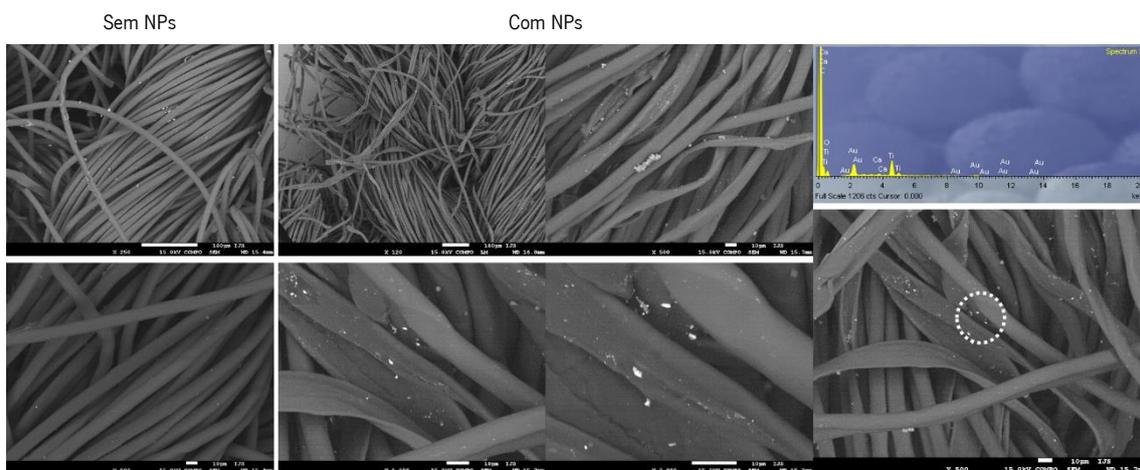


Figura 40: SEM do substrato de CO/PES com e sem AuNPs; Espetro EDS e análise elemental mapeada.

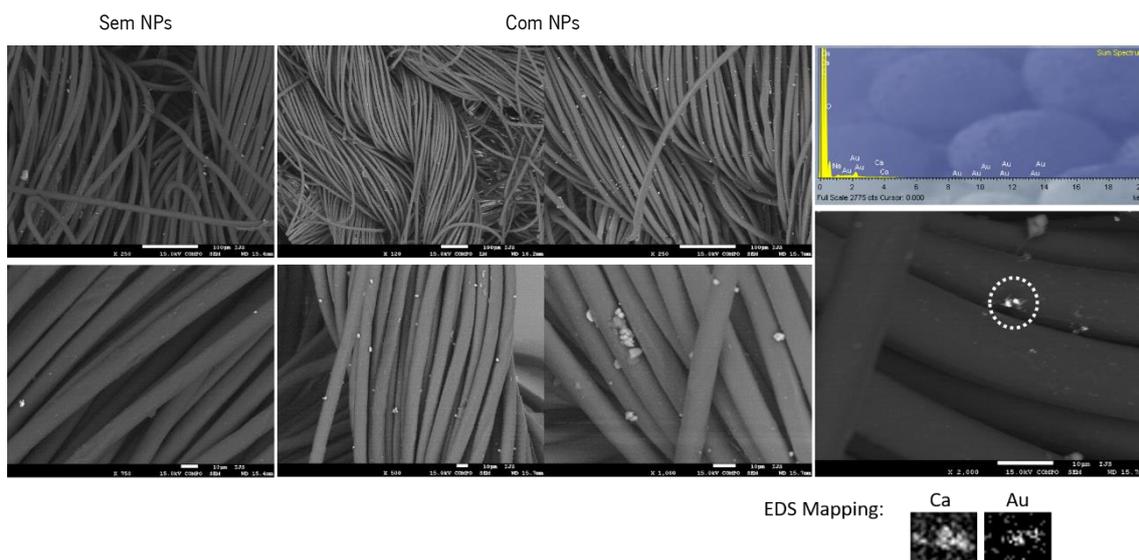


Figura 41: SEM do substrato de PES com e sem AuNPs; Espectro EDS e análise elemental mapeada.

Ensaio SEM - Universidade do Minho

Os ensaios SEM realizados na Universidade do Minho apresentam algumas discrepâncias relativamente aos anteriores, não só por causa da quantidade de lavagens aplicadas, mas também porque as nanopartículas utilizadas neste ensaio correspondem a um *batch* diferente. Por estes motivos, os resultados não podem ser comparados.

Aqui, o substrato de algodão tingido parece apresentar maior quantidade e uniformidade de AuNPs, (Figura 44). Contudo, a análise EDS mostra que é o substrato de CO (Figura 43) o que apresenta maior quantidade de ouro, seguido do PES (Figura 49) e do CO tingido (Figura 45), o que pode ser explicado pelas impurezas detetadas tanto na malha de CO tingido sem NPs (Figura 39), como na malha de PES (Figura 41). Os substratos de CO/PES e PES apresentam as AuNPs mais aglomeradas (Figura 46 e Figura 48). Em termos de quantidade efetiva de AuNPs, os resultados de EDS mostram alguma correlação com os resultados de absorção atómica (Tabela 10) dos substratos após 1 lavagem, no sentido em que as amostras com maior quantidade de ouro são o substrato de CO, seguido do PES.

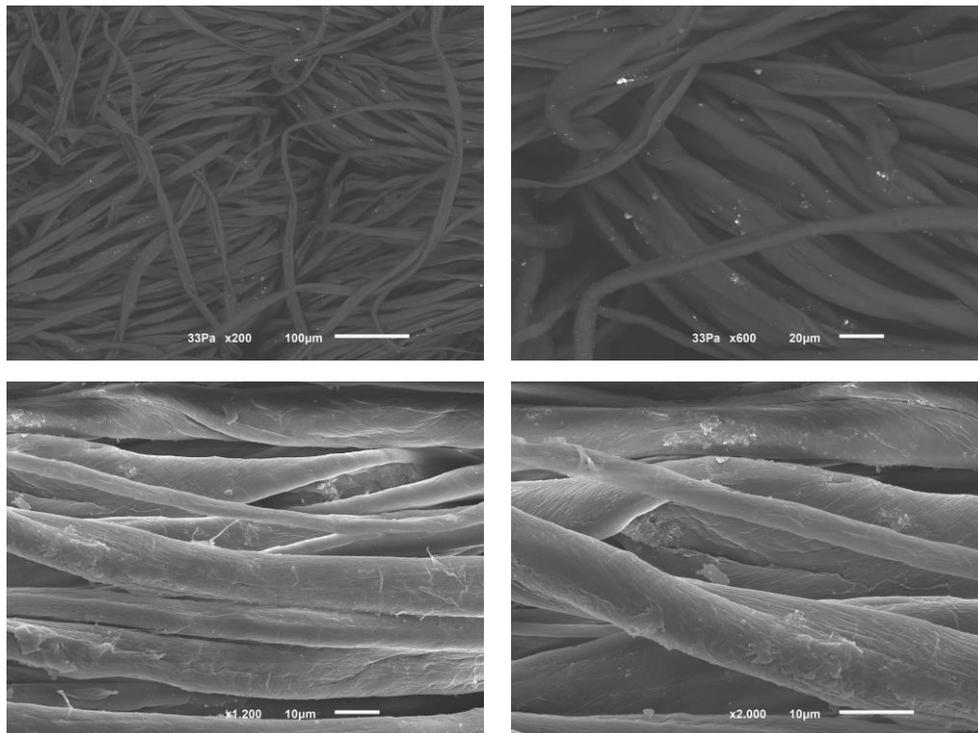


Figura 42: SEM do substrato de CO com AuNPs em diferentes ampliações.

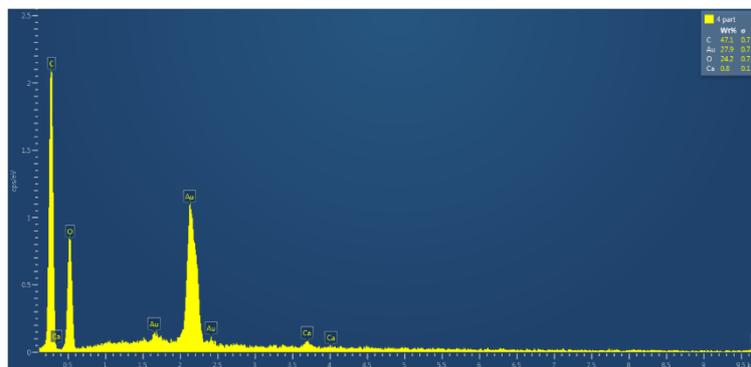


Figura 43: Espectro EDS do substrato CO.

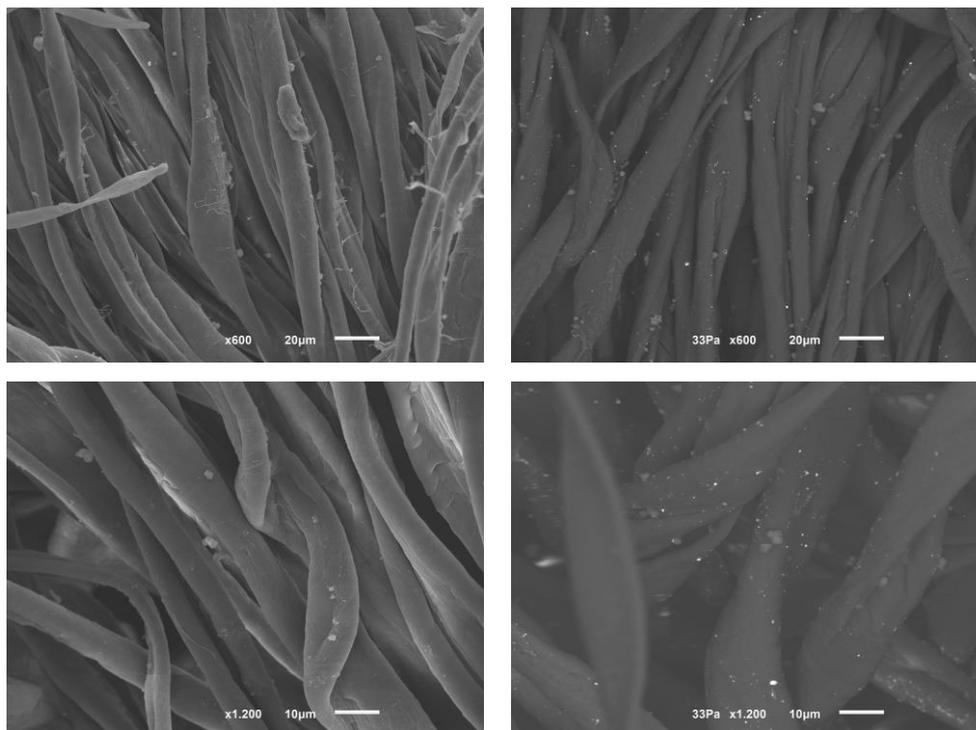


Figura 44: SEM do substrato de CO tingido (olive) com AuNPs em diferentes ampliações.

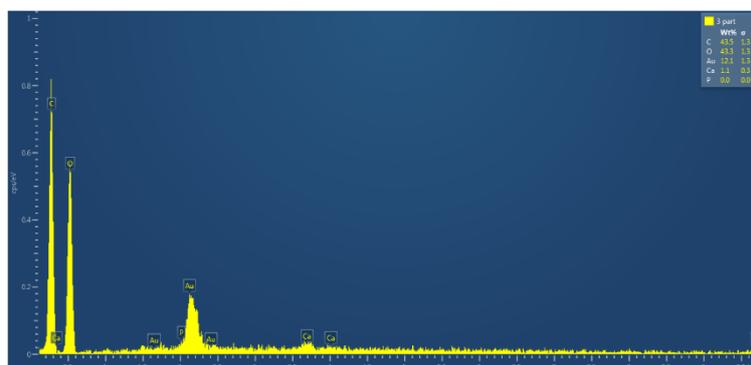


Figura 45: Espectro EDS do substrato CO tingido (olive).

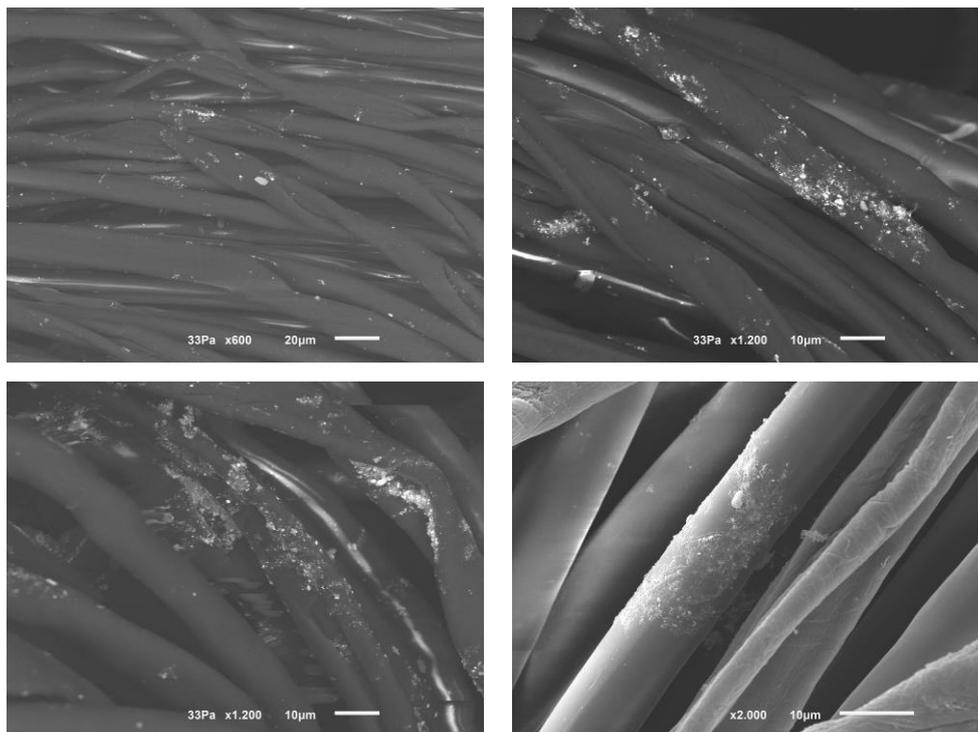


Figura 46: SEM do substrato de CO/PES com AuNPs em diferentes ampliações.

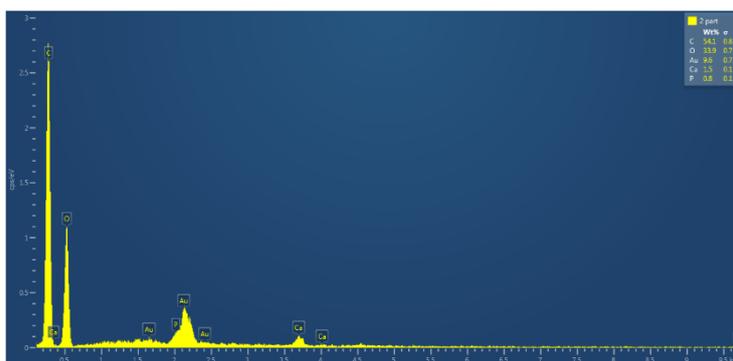


Figura 47: Espetro EDS do substrato CO/PES.

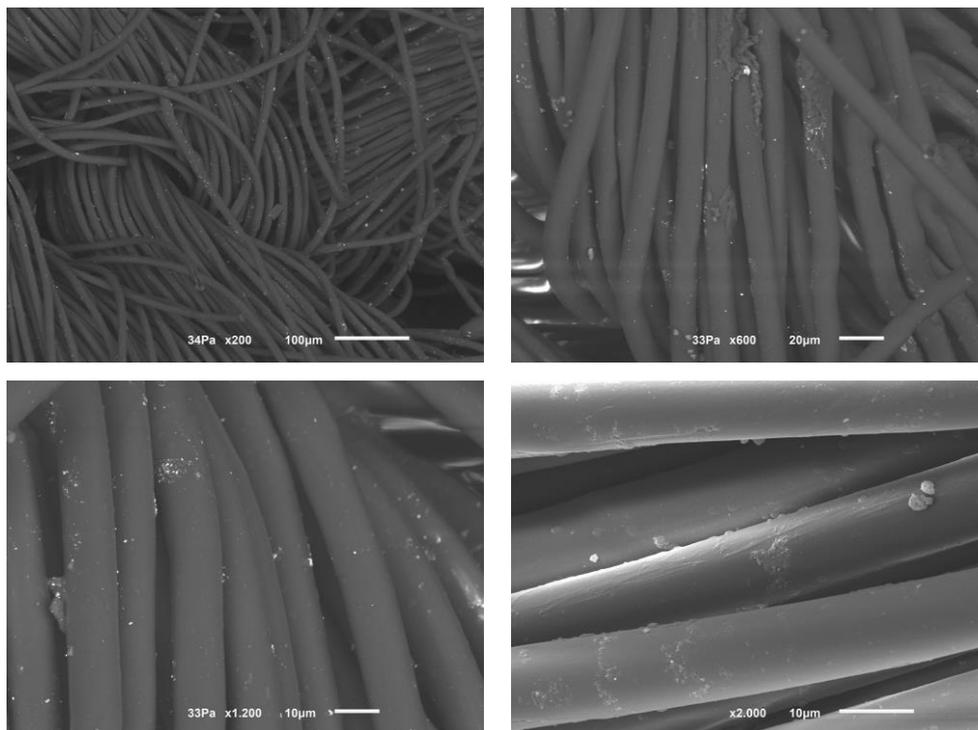


Figura 48: SEM do substrato de PES com AuNPs em diferentes ampliações.

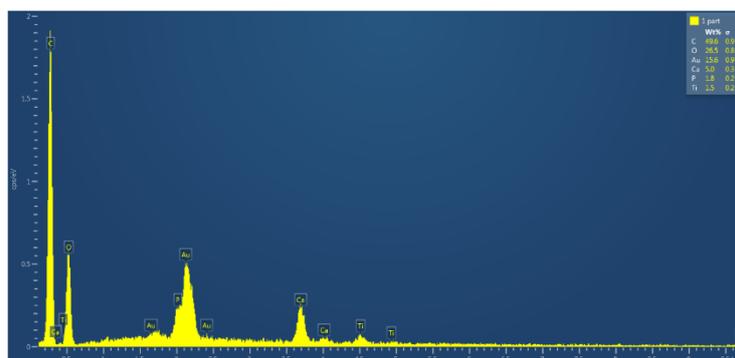


Figura 49: Espetro EDS do substrato PES.

4.4.3. Solidez ao suor

O ensaio da solidez ao suor permitiu entender se, em contacto com o suor humano, os substratos libertavam AuNPs. Deste modo, como a possível perda de AuNPs podia não alterar significativamente a cor das dispersões dos ensaios da solidez ao suor, optou-se por detetar e quantificar a presença de ouro nas mesmas, por meio de absorção atómica.

Para o ensaio utilizaram-se os substratos funcionalizados a 70 °C durante 10 minutos com 0,1 mg/mL de AuNPs, 4 g/L surfactante A, 5 g/L surfactante D e ajuste para pH 9. O substrato de algodão cru sofreu uma meia-branqueação, o substrato de algodão tingido foi submetido a uma lavagem doméstica, e os substratos de algodão/poliéster e poliéster branqueado foram pré-tratados com plasma atmosférico. Foram analisadas amostras com 1 e 20 lavagens. Durante o ensaio, retirou-se dispersão para análise de absorção atómica aos 0, 30, 60 e 240 minutos. Como já foi mencionado anteriormente, o equipamento tem um limite de deteção (LD) equivalente a 0,09 mg/L Au e o limite de quantificação (LQ) corresponde a 0,24 mg/L Au. Todos os valores abaixo do LQ não foram quantificados.

Como é possível observar na Tabela 11, parte das dispersões apresentaram quantidade tão baixa de ouro, que o equipamento não conseguiu quantificar. As restantes dispersões apresentaram valores bastante próximos ao valor do limite de quantificação. Como as dispersões analisadas foram retiradas de uma dispersão “mãe” onde a concentração de NPs que saiam do substrato ia aumentando com o tempo de contacto com os mesmos, era espectável que, ao fim de 240 min a concentração de ouro fosse superior a, por exemplo, ao fim de 0 ou 30 minutos. Como isso não aconteceu em praticamente nenhum substrato, conclui-se que os valores quantificados podem conter erros de leitura e que a quantidade de ouro libertada é residual.

Tabela 11: Quantificação da perda de AuNPs em dispersões que simulavam o suor alcalino, ao longo do ensaio da solidez ao suor

Amostra	Lavagens	Tempo (min)	Au (mg/L)
CO	1 lavagem	0	<LQ
		30	<LQ
		60	<LQ
		240	<LQ
	20 lavagens	0	0,34
		30	<LQ
		60	0,30
		240	0,32
CO tingido (olive)	1 lavagem	0	0,36
		30	0,27
		60	0,32
		240	0,39
	20 lavagens	0	0,27
		30	<LQ
		60	0,33
		240	<LQ
CO/PES	1 lavagem	0	0,34
		30	<LQ
		60	0,33
		240	0,28
	20 lavagens	0	0,33
		30	<LQ
		60	0,29
		240	0,28
PES	1 lavagem	0	0,33
		30	0,37
		60	0,32
		240	<LQ
	20 lavagens	0	0,35
		30	<LQ
		60	0,26
		240	0,26

4.4.4. Ensaio Antimicrobianos

Os ensaios antimicrobianos, como mencionado anteriormente, foram realizados no Instituto Jožef Stefan e no 2C2T da Universidade do Minho. No primeiro realizaram-se ensaios qualitativos e quantitativos aos substratos enquanto, no segundo, realizaram-se apenas ensaios quantitativos. Os ensaios quantitativos permitiram saber se os substratos apresentavam comportamento antimicrobiano.

Ensaio qualitativo – Instituto Jožef Stefan

Para os ensaios antimicrobianos realizados pelo JSI foram utilizadas amostras funcionalizadas com diferentes concentrações de AuNPs: 0 mg/mL (padrão); 0,06 mg/mL; 0,08 mg/mL; 0,1 mg/mL e 0,3 mg/mL. Todas as amostras sofreram uma lavagem para remover as NPs não ligadas à superfície do substrato. Utilizaram-se quatro estirpes de bactérias: duas gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) e duas gram-positivas (*S. epidermidis* e *B. subtilis*).

A análise qualitativa (susceptibilidade das bactérias na presença dos substratos) foi realizada nas amostras sem AuNPs (padrão), com 0,06 mg/mL de AuNPs (menor concentração) e com 0,3 mg/mL de AuNPs (maior concentração).

No caso das bactérias gram-negativas, verificou-se que em contacto com a amostra sem nanopartículas, ambas as estirpes de bactérias conseguiram crescer sem qualquer inibição, pela superfície da placa de Petri (Figura 50). Por outro lado, na presença de AuNPs, concluiu-se que existe inibição do crescimento, mesmo na concentração mais baixa, para a estirpe *E. coli*. No caso da estirpe *P. aeruginosa*, verificou-se que a inibição por parte do substrato funcionalizado é inferior, praticamente não ocorrendo inibição, na presença da amostra com concentração mais baixa de AuNPs.

É de salientar também que em nenhum microrganismo ou concentração se verificou a presença de halo em torno das amostras, mostrando que a inibição do crescimento antimicrobiano ocorreu exclusivamente nas áreas em contacto direto com as mesmas, o que vai de encontro ao mecanismo de inibição por contacto das nanopartículas antimicrobianas.

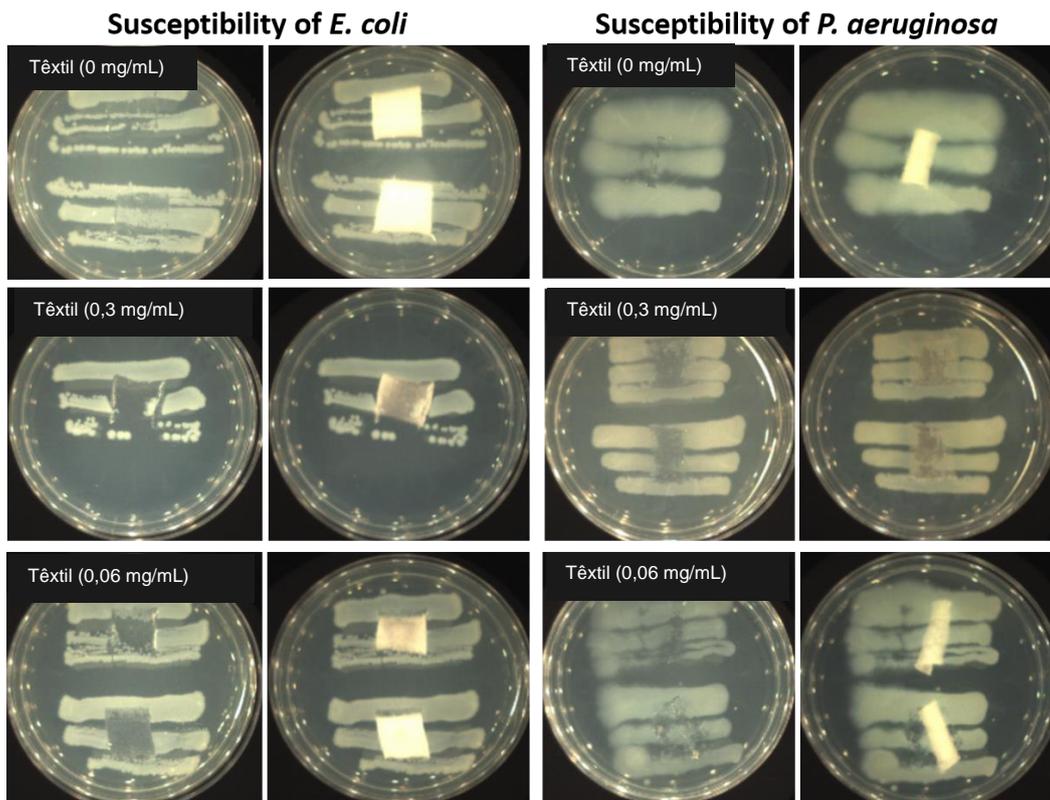


Figura 50: Ensaios antimicrobianos segundo a norma AATCC 147: suscetibilidade de bactérias gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) em contacto com substrato de CO funcionalizados com diferentes concentrações de AuNPs (0 mg/mL; 0,3 mg/mL e 0,06 mg/mL). Para cada estirpe e concentração é mostrada uma fotografia antes da remoção da amostra em teste (direita) e depois da remoção da amostra (esquerda), para melhor avaliação da área afetada (Instituto Jožef Stefan).

No caso das bactérias gram-positivas, mais em concreto para *B. subtilis*, verificou-se que, em contacto com as três amostras, inclusive a amostra sem AuNPs, ocorre inibição de crescimento, sendo esta total no caso da amostra com maior concentração de AuNPs. Isto pode indicar que, para além das AuNPs, o próprio substrato pode inibir o crescimento destes microrganismos. No caso da estirpe *S. epidermidis*, o resultado é semelhante, ocorrendo alguma inibição do crescimento do microrganismo na presença do substrato sem AuNPs ou funcionalizado com a concentração mais baixa. Por outro lado, o substrato com concentração mais elevada de AuNPs impediu eficazmente a formação de novas colónias (Figura 51).

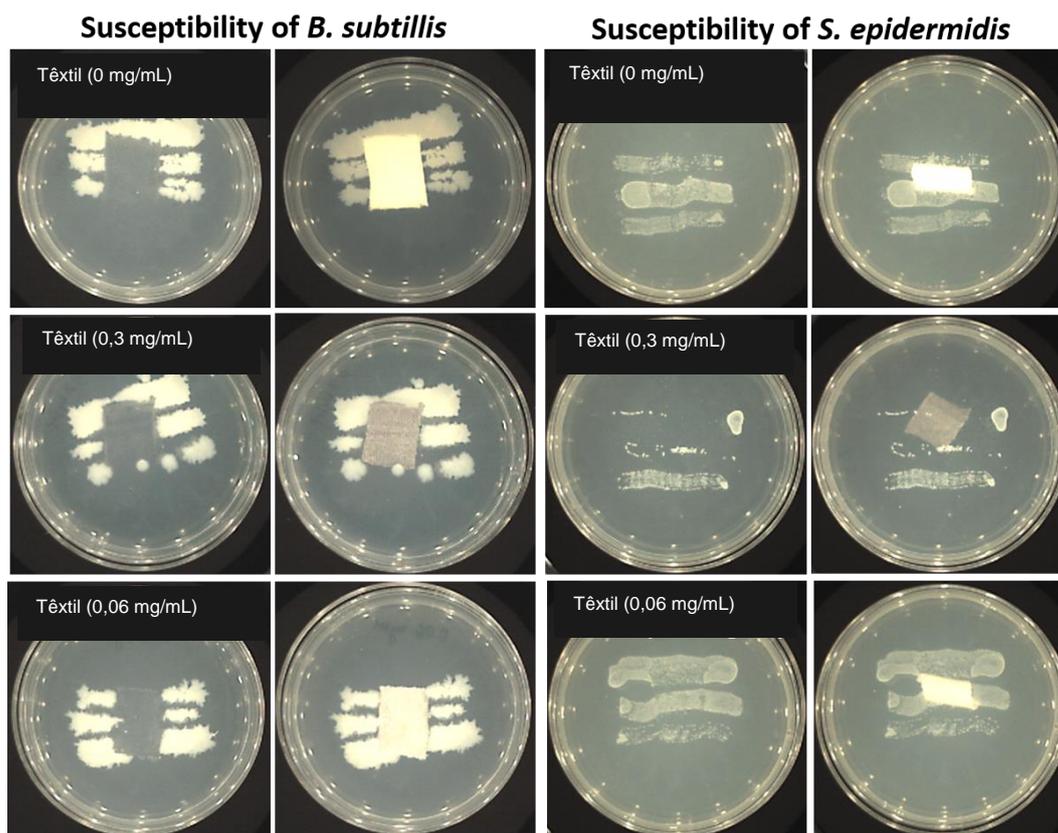


Figura 51: Ensaios antimicrobianos segundo a norma AATCC 147: suscetibilidade de bactérias gram-negativas (*B. subtilis* e *S. epidermidis*) em contacto com substrato de CO funcionalizados com diferentes concentrações de AuNPs (0 mg/mL; 0,3 mg/mL e 0,06 mg/mL). Para cada estirpe e concentração é mostrada uma fotografia antes da remoção da amostra em teste (direita) e depois da remoção da amostra (esquerda), para melhor avaliação da área afetada (Instituto Jožef Stefan).

Ensaios quantitativos – Instituto Jožef Stefan

Nos ensaios quantitativos realizados no JSI foram realizados diversos ensaios, não só ao substrato de CO funcionalizado com diferentes concentrações e em diferentes condições, mas também aos restantes substratos funcionalizados em condições ótimas. Para estes ensaios, foi analisada a redução logarítmica de CFU. Como já foi referido anteriormente, quanto maior for a redução, mais eficiente é o agente antimicrobiano, sendo que uma redução superior a 3 é considerada alta atividade bactericida e corresponde a 99,9 % de eficácia.

Numa fase inicial estudou-se o comportamento dos substratos de CO [funcionalizados a 70 °C durante 10 minutos, usando dois surfactantes (4 g/L de Surfactante A e 5 g/L de Surfactante D) e com ajuste do pH das dispersões de esgotamento até ≈ 9] com diferentes concentrações de AuNPs [0 mg/mL (padrão); 0,06 mg/mL; 0,08 mg/mL; 0,1 mg/mL e 0,3 mg/mL.] na presença das mesmas quatro estirpes de bactérias usadas nos ensaios qualitativos. Durante este ensaio, as

amostras inoculadas para a realização do mesmo foram posteriormente colocadas numa placa de Petri com agar, e analisou-se o crescimento de UFCs na área circundante das mesmas.

Relativamente à estirpe *E. coli*, verifica-se que o Log10 inicial correspondia a 5 e, após 24 horas de incubação a 37 °C, o log10 subiu para 9 aproximadamente. A amostra tratada sem AuNPs apresentou um Log10 próximo ao da bactéria, o que seria espectável, considerando que neste substrato não estão presentes nanopartículas com comportamento antimicrobiano. Das restantes amostras, a que tinha menor concentração de AuNPs foi a que apresentou maior log10 (aproximadamente 3) e, portanto, menor redução logarítmica, que ainda assim foi considerável (aproximadamente 6). Acima dessa concentração, os substratos conseguiram inibir o crescimento de microrganismos e, por esse motivo, o log10 foi 0 (ocorrendo uma redução logarítmica log10 de 9) (Figura 52, esquerda). Assim, considera-se que a atividade antibacteriana das AuNPs no substrato foi eficaz em todas as concentrações. Na imagem à direita (Figura 52) é possível observar também que, após a lavagem (para a contagem de bactérias realizada para determinação da redução logarítmica), apenas o substrato sem AuNPs mostrou crescimento da bactéria *E. coli* quando colocados novamente em meio de crescimento e incubados durante 24 horas, indicando assim um efeito antimicrobiano dos substratos funcionalizados, para com esta estirpe.

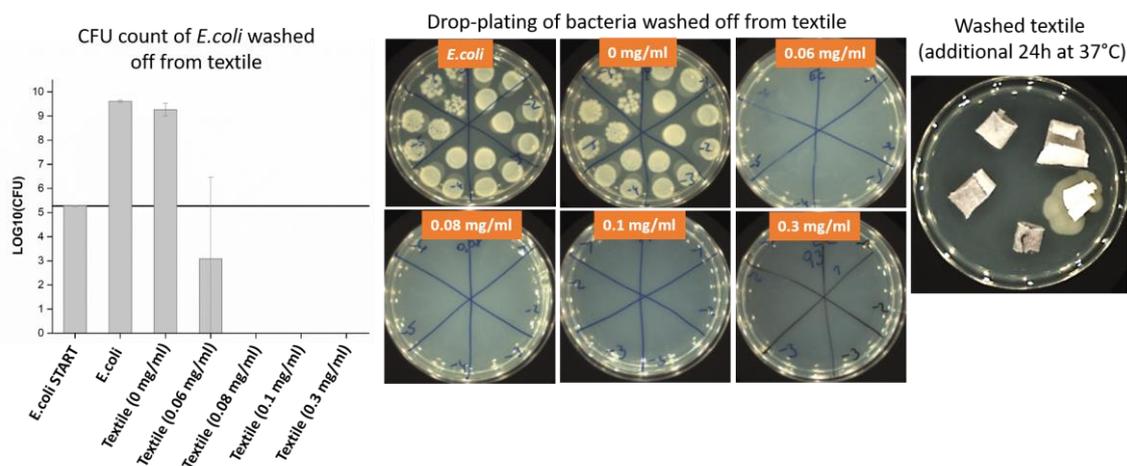


Figura 52: Ensaio AATCC 100 aos substratos de CO com diferentes concentrações de AuNPs para a estirpe *E. coli*. Esquerda: contagem dos CFUs através do logaritmo decimal; Meio: Placas de Petri com crescimento de colónias de *E. coli* após contacto com substratos funcionalizados; Direita: Crescimento de *E. coli* em substratos funcionalizados lavados (Instituto Jožef Stefan).

A segunda estirpe analisada, *P. aeruginosa*, também gram-negativa, apresentou resultados díspares relativamente aos anteriores (Figura 53, esquerda), o que poderá ser resultado do crescimento mais acelerado desta estirpe e pelo facto desta, de modo geral, apresentar maior

resistencia a agentes antimicrobianos. Aqui, o log₁₀ da bactéria após 24 h de incubação a 37 °C foi aproximadamente 10. O Log₁₀ da amostra sem AuNPs apresentou um valor semelhante, o que era esperado, considerando que não havia a presença de agente antimicrobiano. As amostras funcionalizadas com 0,06 mg/mL e 0,08 mg/mL de AuNPs apresentaram valores aproximados de 9,5 e 7, respetivamente, o que corresponde a uma redução logarítmica de cerca de 0,5 e 3. As amostras com 0,1 mg/mL e 0,3 mg/mL de AuNPs apresentaram resultados mais favoráveis, com um log₁₀ de cerca de 1 e 0, respetivamente, correspondendo a uma redução logarítmica de 9 e 10. Assim sendo, verifica-se que a atividade antimicrobiana dos substratos para a estirpe *P. aeruginosa* só é eficaz para concentrações acima de 0,08 mg/mL de AuNPs. Também foi observado crescimento bacteriano em todas as soluções de lavagem, exceto na solução da lavagem do substrato com maior concentração de AuNPs (Figura 53, meio). Na imagem à direita (Figura 53) onde é analisado o possível crescimento da estirpe nos substratos após a sua lavagem (para contagem de bactérias realizada para determinação da redução logarítmica) seguida da colocação dos mesmos em meio de crescimento e incubação (sem adição de mais bactérias), observou-se que o único substrato que conseguiu inibir eficazmente foi o funcionalizado com maior concentração de AuNPs (0,3 mg/mL).

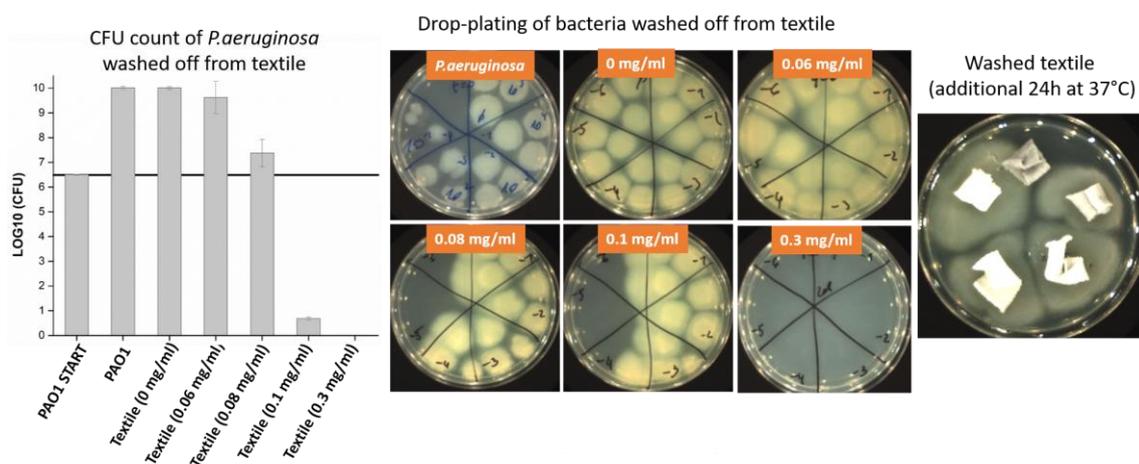


Figura 53: Ensaio AATCC 100 aos substratos de CO com diferentes concentrações de AuNPs para a estirpe *P. aeruginosa*. Esquerda: contagem dos CFUs através do logaritmo decimal; Meio: Placas de Petri com crescimento de colónias de *P. aeruginosa* após contacto com substratos funcionalizados; Direita: Crescimento de *P. aeruginosa* em substratos funcionalizados lavados (Instituto Jožef Stefan).

No caso da estirpe gram-positiva *B. subtilis*, verifica-se que após 24 h de incubação a 37 °C o log₁₀ aumenta de 5 para aproximadamente 8,5 (Figura 54, esquerda). A amostra sem AuNPs apresentou, naturalmente, o valor log₁₀ mais elevado (aproximadamente 7), seguida da amostra

com a concentração mais baixa de AuNPs, cujo Log10 correspondeu a 2, o que equivale a uma redução logarítmica de 6,5 valores. Nas restantes amostras com concentrações superiores de AuNPs não há crescimento de colónias de *B. subtilis* nas placas de Petri e, por esse motivo o valor de Log10 foi 0. Para além disso, na imagem à direita (Figura 54), verifica-se que houve crescimento de colónias apenas nas áreas circundantes à amostra funcionalizada sem AuNPs e com a concentração mais baixa, após lavagem. Nas restantes amostras não foi detetado qualquer crescimento. Conclui-se assim que a atividade antimicrobiana das AuNPs é eficaz para esta estirpe, em qualquer concentração.

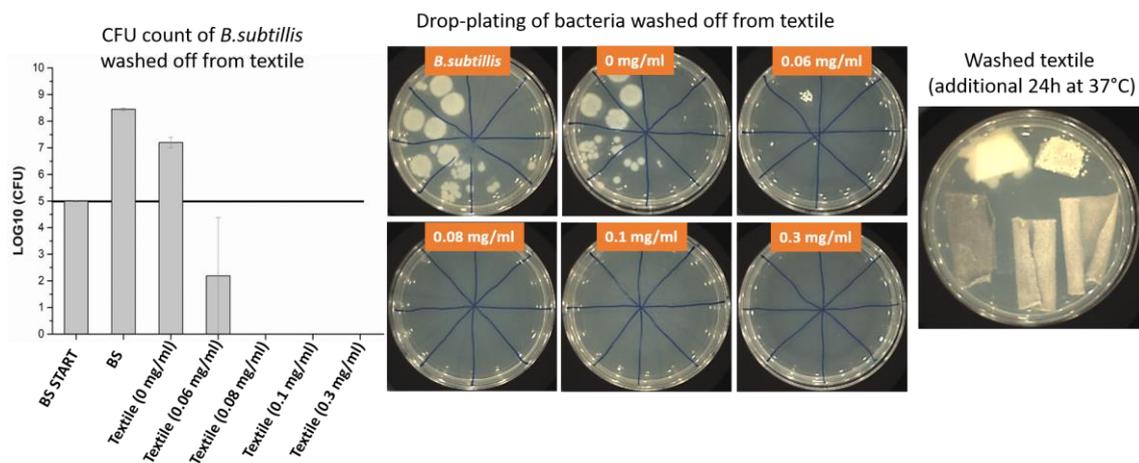


Figura 54: Ensaio AATCC 100 aos substratos de CO com diferentes concentrações de AuNPs para a estirpe *B. subtilis*. Esquerda: contagem dos CFUs através do logaritmo decimal; Meio: Placas de Petri com crescimento de colónias de *B. subtilis* após contacto com substratos funcionalizados; Direita: Crescimento de *B. subtilis* em substratos funcionalizados lavados (Instituto Jožef Stefan).

No caso da segunda estirpe gram-positiva, *S. epidermidis*, o valor log10 da bactéria passou de 5 para 8, após 24 horas de incubação a 37 °C (Figura 55, esquerda). O substrato sem AuNPs apresentou um valor log10 de aproximadamente 6, o que corresponde a uma redução logarítmica equivalente a 2, confirmando assim o efeito bacteriostático do têxtil. Na presença de nanopartículas, o valor log10 foi sempre 0, o que indica que o agente antimicrobiano foi altamente eficaz contra esta estirpe. Na imagem à direita (Figura 55) evidencia-se novamente que apenas o substrato sem AuNPs apresentou crescimento de UFCs na zona circundante à amostra.

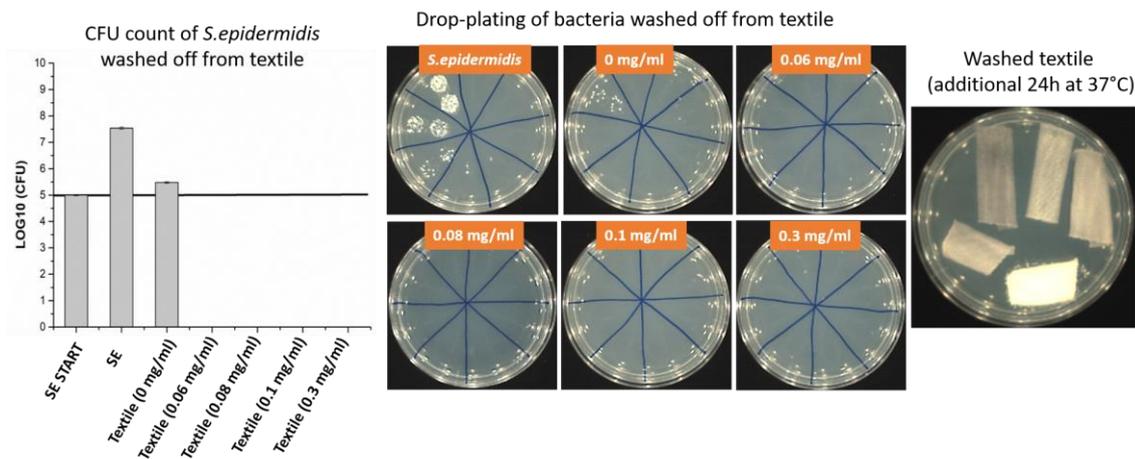


Figura 55: Ensaio AATCC 100 aos substratos de CO com diferentes concentrações de AuNPs para a estirpe *S. epidermidis*. Esquerda: contagem dos CFUs através do logaritmo decimal; Meio: Placas de Petri com crescimento de colónias de *S. epidermidis* após contacto com substratos funcionalizados; Direita: Crescimento de *S. epidermidis* em substratos funcionalizados lavados (Instituto Jožef Stefan).

A cinética do crescimento das diferentes bactérias provenientes das lavagens das amostras têxteis também foi analisada. Para tal, analisou-se a densidade ótica das dispersões de lavagem dos substratos inoculados com os microrganismos. Na Figura 56 é possível analisar os gráficos correspondentes ao crescimento cinético das diferentes bactérias. Como se pode constatar, as AuNPs apresentam comportamento bactericida relativamente às estirpes *E. coli*, *B. subtilis* e *S. epidermidis* pois em cada um dos gráficos, ao longo do tempo, ocorre um aumento da densidade ótica na dispersão contendo apenas o microrganismo e na dispersão de lavagem da amostra sem AuNPs. Nas restantes dispersões de lavagem a densidade ótica é praticamente nula sendo que apenas na presença de *S. epidermidis* ocorre uma ligeira subida da densidade ótica na dispersão de lavagem da amostra com menor concentração de AuNPs. Por outro lado, no caso da estirpe *P. aeruginosa*, o efeito das AuNPs foi bacteriostático, pois as dispersões de lavagem das amostras com AuNPs acompanharam o comportamento da dispersão com o microrganismo. Isto indica que, após deixarem de estar em contacto com o agente antimicrobiano, as bactérias cresceram naturalmente. Desde modo, conclui-se que as AuNPs não inviabilizam a estirpe *P. aeruginosa*, apenas inibem o seu crescimento.

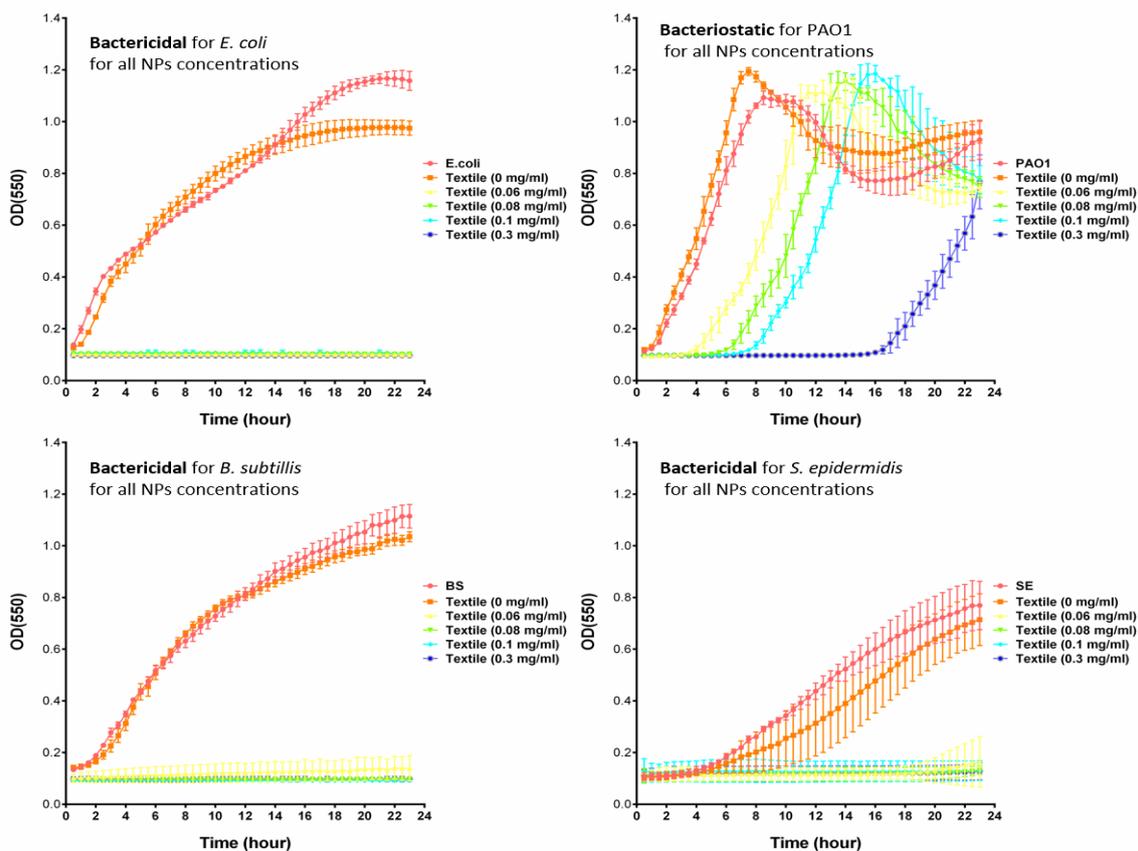


Figura 56: Cinética de crescimento das diferentes estirpes de bactérias [*E. coli* (EC); *P. aeruginosa* (PAO1); *B. subtilis* (BS); *S. epidermidis* (SE)] (Instituto Jožef Stefan).

Por último foram analisados todos os substratos [funcionalizados a 70 °C durante 10 minutos com 0,1 mg/mL de AuNPs, 4 g/L surfactante A, 5 g/L surfactante D, ajuste de pH para 9 (ensaio 16)] com 20 lavagens. Os ensaios incluíram também os substratos sem AuNPs que serviram como padrão. Para este ensaio analisaram-se apenas duas estirpes, uma gram-negativa (*E. coli*) e uma gram-positiva (*S. epidermidis*).

Através da Figura 57 é possível analisar o comportamento dos diferentes substratos funcionalizados com e sem AuNPs perante a estirpe gram-negativa *E. coli*. No canto inferior esquerdo, é mostrado um gráfico onde constam os Log₁₀ (CFU) dos substratos e da bactéria sem a presença de substrato. Todos os substratos mostraram algum efeito bacteriostático, diminuindo o crescimento bacteriano quando comparado ao crescimento na ausência de substrato. Contudo, o efeito dos substratos com AuNPs é substancialmente superior. Como é possível analisar não só pelas fotografias das placas de Petri, mas também pelo gráfico, o substrato de CO funcionalizado é o que apresenta maior redução logarítmica seguido do substrato de CO tingido (olive). Estes resultados são coincidentes com os resultados anteriores da Absorção Atômica, que mostram que

os substratos de CO e CO tingido (olive) eram o que apresentavam maior quantidade de ouro após 20 lavagens.

Os substratos de PES e CO/PES funcionalizados, apesar de terem um efeito bastante inferior, o que seria esperado considerando tanto os resultados de absorção atômica como os de SEM-EDS, ainda apresentam algum efeito antimicrobiano, como uma redução logarítmica superior a 4, comparando com o crescimento da bactéria sem têxtil.

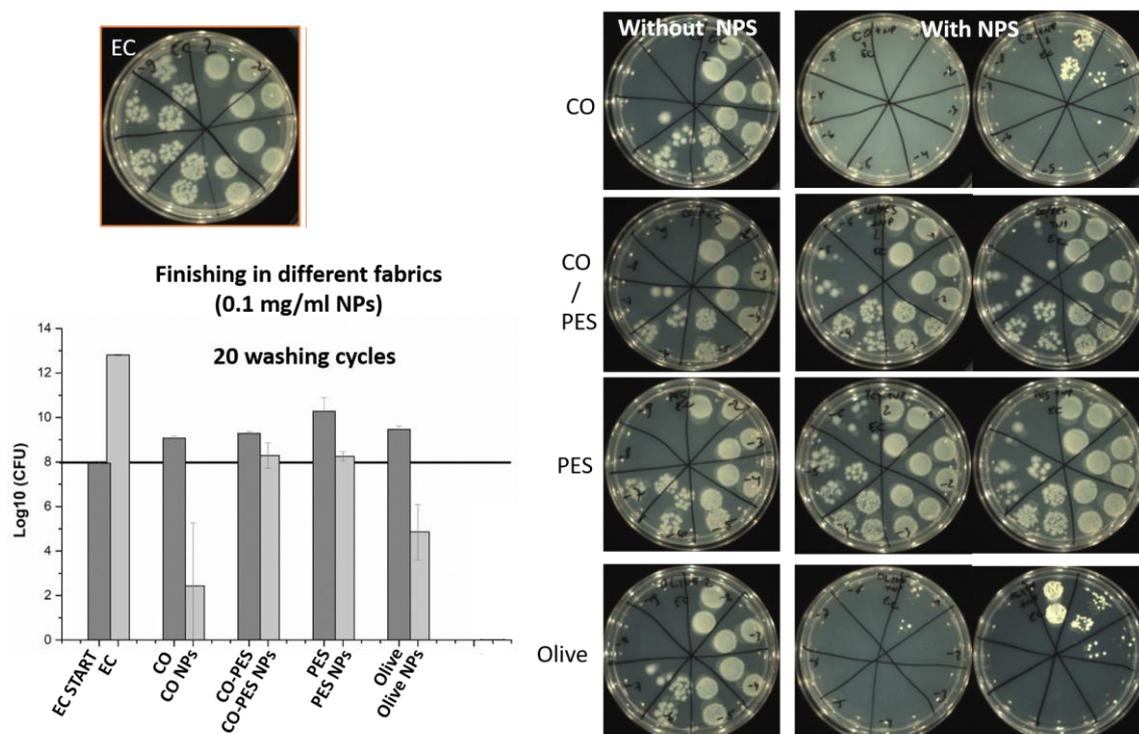


Figura 57: Ensaio AATCC 100 para a estirpe *E. coli* nos diferentes substratos [CO; CO/PES; PES; CO tingido (olive)] com e sem AuNPs (0,1 mg/mL). Canto inferior esquerdo: crescimento bacteriano da *E. coli* em logarítmico para cálculo da redução logarítmica. Direita: placas de Petri com CFUs de *E. coli* após contacto com substratos funcionalizados com e sem AuNPs (Instituto Jožef Stefan).

A Figura 58 evidencia o comportamento dos diferentes substratos perante a estirpe *S. epidermidis*. No gráfico do canto inferior esquerdo constata-se que, inicialmente o log₁₀ aumentou de aproximadamente 8 para 13, após incubação durante 24 h a 37 °C. No substrato de CO apenas ocorre formação de UFCs no substrato sem AuNPs. Deste modo, ocorre uma redução logarítmica equivalente a 13 no caso do substrato de CO funcionalizado com AuNPs. Dos restantes substratos, o que apresenta maior redução logarítmica é o substrato de CO tingido (olive), seguido do substrato CO/PES e, por fim PES. O primeiro tem uma redução aproximada de 8 log₁₀, e os restantes substratos apresentam uma redução aproximada de 7 e 6 log₁₀, respetivamente. Assim sendo, conclui-se que os substratos funcionalizados possuem efeito antibacteriano.

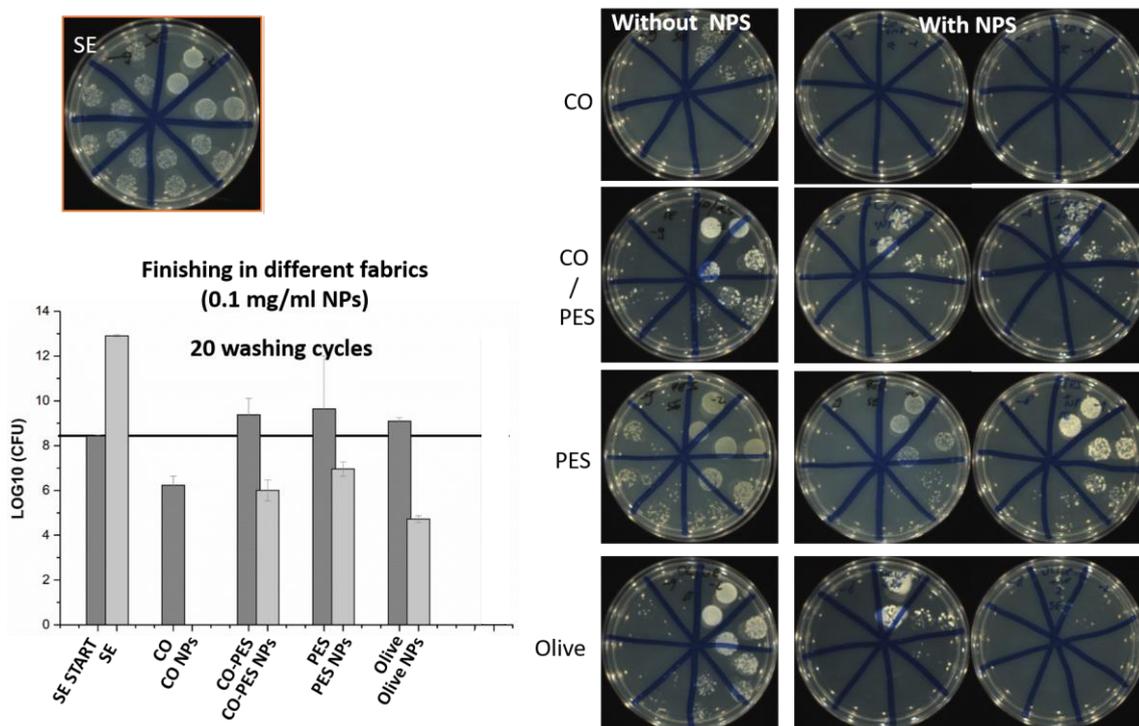


Figura 58: Ensaios AATCC 100 para a estirpe *S. epidermidis* nos diferentes substratos [CO; CO/PES; PES; CO tingido (olive)] com e sem AuNPs (0,1 mg/mL). Canto inferior esquerdo: crescimento bacteriano da *S. epidermidis* em logarítmico para cálculo da redução logarítmica. Direita: placas de Petri com CFUs de *S. epidermidis* após contacto com substratos funcionalizados com e sem AuNPs (Instituto Jožef Stefan).

Ensaios quantitativos antibacterianos – 2C2T (Universidade do Minho)

No centro 2C2T foram realizados ensaios antimicrobianos aos quatro substratos, funcionalizados 70 °C durante 10 minutos, com diferentes concentrações de AuNPs (0 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,3 mg/mL), 4 g/L de Surfactante A, 5 g/L de Surfactante D, ajuste de pH da solução de esgotamento para 9 e com 1, 10 e 20 lavagens. Para estes ensaios foram utilizadas três estirpes de bactérias (duas gram-negativas: *E. coli* e *P. aeruginosa*; e uma gram-positiva: *S. epidermidis*) e o bacteriófago *E. coli* MS2. Contrariamente ao estudo realizado no JSI, nesta análise é calculada diretamente a redução logarítmica.

Os resultados obtidos no centro 2C2T apresentaram algumas discrepâncias relativamente aos obtidos pelo JSI.

A Figura 59 representa o comportamento dos substratos funcionalizados com 0,1 mg/mL de AuNPs, na presença de *E. coli*. Contrariamente aos resultados apresentados anteriormente, nestes ensaios a redução logarítmica foi bastantes inferior, situando-se maioritariamente abaixo de 3. O

substrato de CO, inclusive, apesar de possuir uma redução logarítmica ligeiramente superior a 4, apresenta também um desvio padrão elevado e, por este motivo os valores não são satisfatórios.

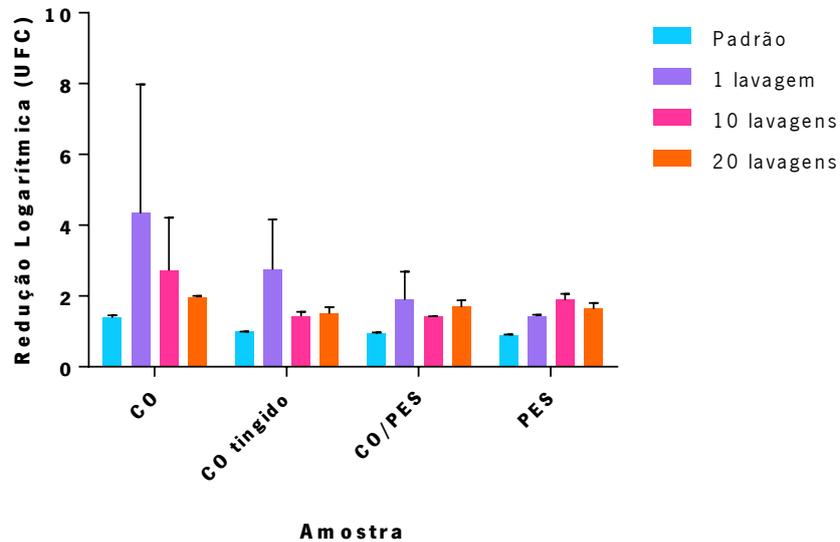


Figura 59: Ensaio AATCC 100 - Redução logarítmica dos diferentes substratos funcionalizados com (0,1 mg/mL) ou sem AuNPs (padrão), na presença de *E.coli*.

De igual forma, os substratos funcionalizados com 0,3 mg/mL de AuNPs apresentaram baixas reduções logarítmicas, à exceção do substrato de CO com uma lavagem, com redução logarítmica superior a 7 (Figura 60).

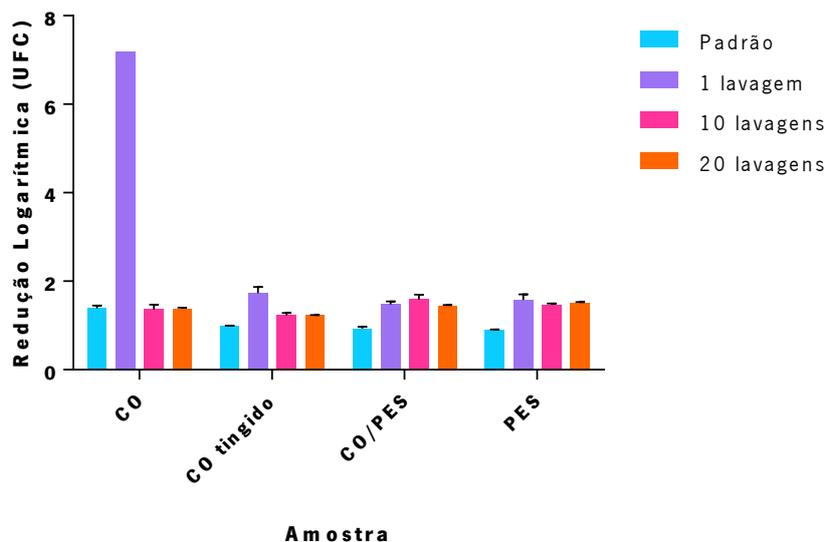


Figura 60: Ensaio AATCC 100 - Redução logarítmica dos diferentes substratos funcionalizados com (0,3 mg/mL) ou sem AuNPs (padrão), na presença de *E.coli*.

No caso da estirpe *S. epidermidis*, pode-se constatar no gráfico da Figura 61 que o substrato de CO funcionalizado com 0,1 mg/mL é o que apresenta maior redução logarítmica, em especial na amostra com apenas uma lavagem. Por outro lado, o substrato de PES, possui reduções logarítmicas iguais ou inferiores a 2 e, por esse motivo, a atividade antibacteriana deste substrato é praticamente inexistente.

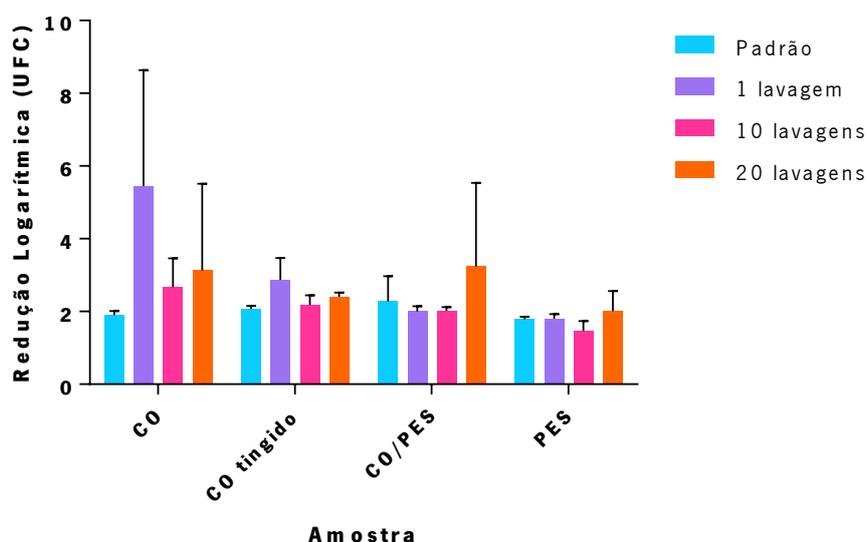


Figura 61: Ensaio AATCC 100 - Redução logarítmica dos diferentes substratos funcionalizados com (0,1 mg/mL) ou sem AuNPs (padrão), na presença de *S. epidermidis*.

No caso dos substratos funcionalizados com maior concentração de AuNPs (0,3 mg/mL), verifica-se que houve um ligeiro aumento da redução logarítmica nos substratos de CO tingido, CO/PES e PES. Por outro lado, contrariamente ao que seria espectável, a redução logarítmica do substrato de CO reduziu bastante. Por ter uma maior quantidade de AuNPs, era esperado que a redução logarítmica fosse igual ou superior, tal como se observou nos ensaios realizados no instituto JSI.

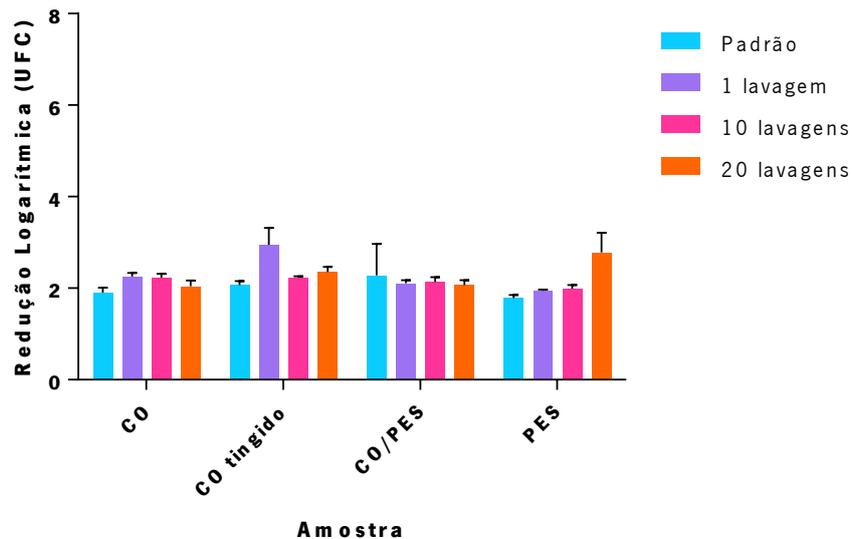


Figura 62: Ensaio AATCC 100 - Redução logarítmica dos diferentes substratos funcionalizados com (0,3 mg/mL) ou sem AuNPs (padrão), na presença de *S. epidermidis*.

Nos ensaios realizados no instituto JSI verificou-se que estirpe *P. aeruginosa* foi a única para a qual as AuNPs não apresentaram comportamento bactericida, mas sim bacteriostático. Deste modo, era espectável que os resultados aos ensaios antimicrobianos realizados no centro 2C2T também não fossem favoráveis.

As Figuras 63 e 64 mostram alguma falta de uniformidade dos resultados obtidos, apresentando amostras com mais lavagens e, portanto, com menor quantidade de AuNPs com reduções logarítmicas significativamente superiores. Contudo, o substrato de CO tingido (olive) aparenta alguma concordância nos resultados, apresentando reduções logarítmicas superiores aos demais substratos em ambas as concentrações. Isto pode indicar que algum componente neste substrato, provavelmente proveniente do tingimento, tem capacidade de inviabilizar esta estirpe. Por outro lado, o substrato de algodão é o que apresenta, em média, os piores resultados perante a *P. aeruginosa* apresentando, inclusive, reduções logarítmicas inferiores às obtidas nos ensaios realizados pelo instituto JSI.

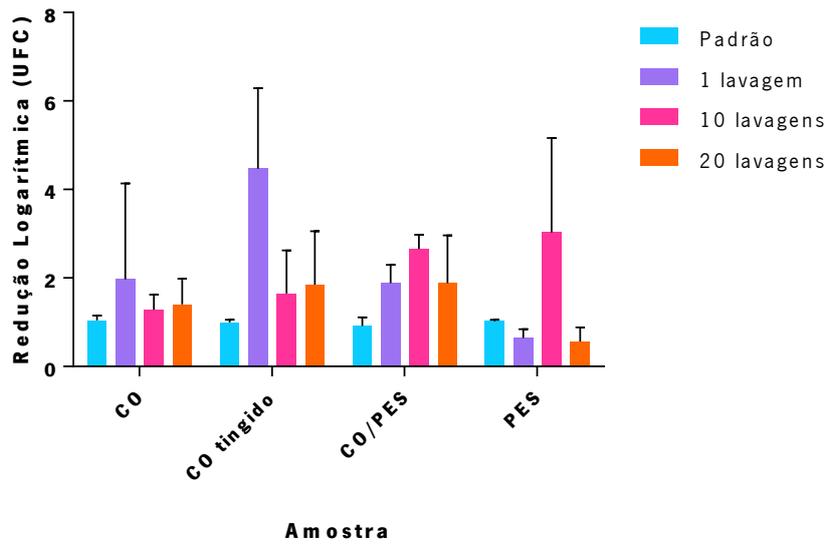


Figura 63: Ensaio AATCC 100 - Redução logarítmica dos diferentes substratos funcionalizados com (0,1 mg/mL) ou sem AuNPs (padrão), na presença de *P. aeruginosa*.

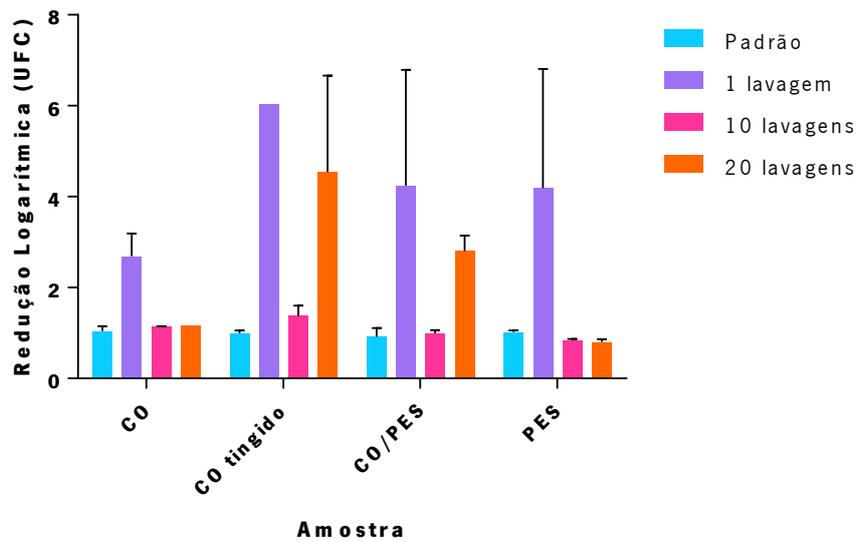


Figura 64: Ensaio AATCC 100 - Redução logarítmica dos diferentes substratos funcionalizados com (0,3 mg/mL) ou sem AuNPs (padrão), na presença de *P. aeruginosa*.

O ensaio ao comportamento antivirico dos substratos foi realizado através da adaptação das normas AATCC 100 e ISO 18184. Aqui, em vez de se analisarem UFCs, analisam-se UFPs, pois a presença do vírus manifesta-se através do efeito citopático, que origina placas.

Numa fase inicial analisou-se a atividade antivirica de substratos funcionalizados com diferentes concentrações de AuNPs, para entender qual a concentração mínima necessária de nanopartículas para os substratos serem considerados antiviricos. As concentrações analisadas foram as mesmas utilizadas nos ensaios antibacterianos: 0 mg/mL; 0,06 mg/mL; 0,8 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,3 mg/mL. Foi ainda testado uma amostra controlo, apenas tratada com meia branqueação.

A Figura 65 mostra que, contrariamente ao que se analisou nos ensaios antibacterianos, apenas a amostra com maior concentração de AuNPs apresentou comportamento antivirico, com uma redução logarítmica superior a 8. Perante este cenário, verifica-se que a concentração mínima de AuNPs necessária para inviabilizar o vírus MS2, é 0,3 mg/mL.

Por outro lado, a Figura 19 mostrou que, na concentração 0,08 mg/mL de AuNPs, houve atividade antibacteriana. Isto pode indicar que: a concentração de AuNPs no substrato é de tal forma inferior e, por esse motivo não é suficiente para inviabilizar o vírus MS2 ou grupos funcionais das AuNPs que lhes conferem o carácter antivirico deixam de estar disponíveis quando as mesmas estão no substrato e, por esse motivo, a atividade antivirica é inferior.

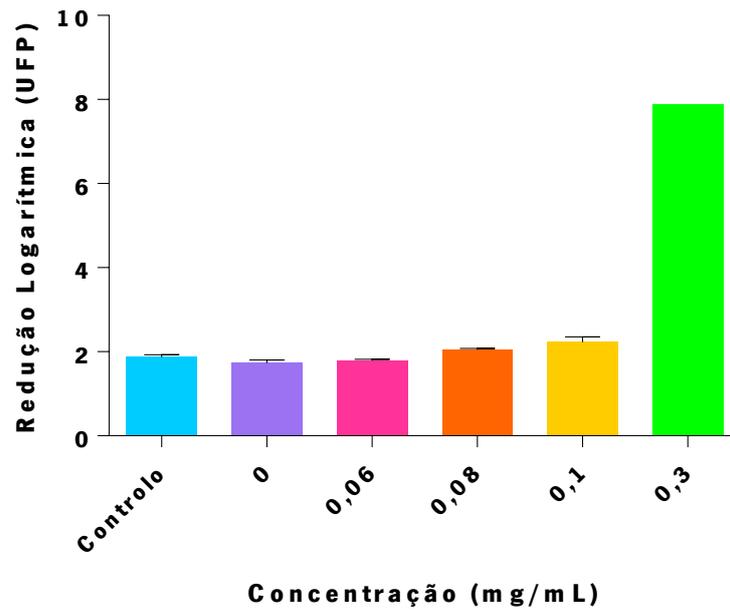


Figura 65: Ensaio norma AATCC 100 adaptada e ISO 18184 adaptada - Redução logarítmica de substratos CO funcionalizados com diferentes concentrações de AuNPs, na presença do bacteriófago *E. coli* MS2.

Posteriormente foi analisada a atividade antivírica nos diferentes substratos, com diferentes concentrações, antes e após lavagens.

Na Figura 66 é possível verificar que, em média, para 0,1 mg/mL de AuNPs todos os substratos apresentam uma redução logarítmica próxima de dois, após 1 lavagem, o que representa uma baixa atividade antivírica.

Nos substratos de algodão (com meia-branqueação ou tingido), um aumento das lavagens originou um aumento da redução logarítmica, o que não era espectável pois ao longo das lavagens ocorre perda de AuNPs e, por isso, a atividade antivírica deveria diminuir. Assim sendo, estes valores podem ser resultado do produto utilizado nas lavagens. Nos restantes substratos, por outro lado, a atividade antivírica mantém-se bastante baixa.

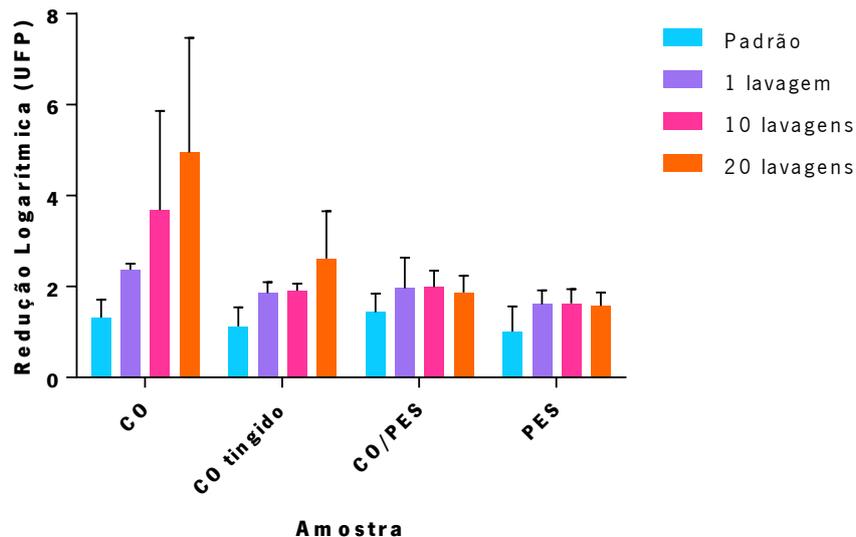


Figura 66: Ensaio norma AATCC 100 adaptada e ISO 18184 adaptada - Redução logarítmica dos diferentes substratos funcionalizados com (0,1 mg/mL) ou sem AuNPs, na presença do bacteriófago *E. coli* MS2.

Em contrapartida, na Figura 67 verifica-se que houve um aumento da atividade antivírica do substrato de CO, através do aumento considerável da redução logarítmica que passou de 2 para 4 no caso do substrato com 1 lavagem e de 5 para 7 no substrato com 20 lavagens.

Os restantes substratos, contudo, continuam a apresentar baixa redução logarítmica, com valores iguais ou inferiores a 2 e, por esse motivo, considera-se que a atividade antivírica dos mesmos é baixa.

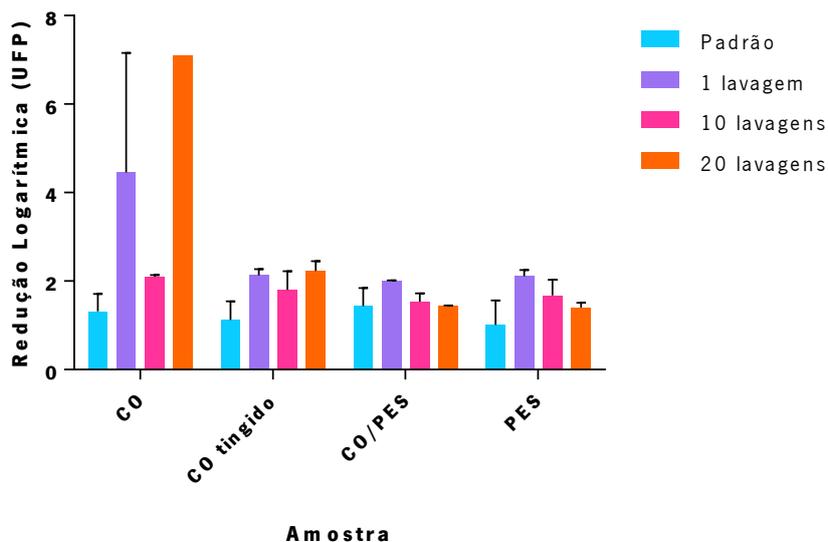


Figura 67: Ensaio norma AATCC 100 adaptada e ISO 18184 adaptada - Redução logarítmica dos diferentes substratos funcionalizados com (0,3 mg/mL) ou sem AuNPs, na presença do bacteriófago *E. coli* MS2.

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

O trabalho realizado permitiu estudar a aplicação de AuNPs com propriedades antimicrobianas em diferentes substratos têxteis, e a otimização do processo, para futuras aplicações em EPIs.

Ao longo do projeto, foram analisadas diversas variáveis que influenciam o processo de acabamento dos têxteis, entre elas: pré-tratamentos; tipo de processo (esgotamento ou impregnação); temperatura; tempo; razão de banho; produtos auxiliares. O principal objetivo foi otimizar o processo, incrementando a ligação das AuNPs aos substratos para, deste modo, haver maior solidez das mesmas a agentes mecânicos exteriores. Recorreu-se também ao uso da metodologia DoE para encontrar, de forma mais rápida e simples, as condições ideais do processo de aplicação das AuNPs.

Entre os diversos pré-tratamentos estudados, concluiu-se que, para o substrato de CO, a aplicação de uma meia branqueação foi suficiente para aumentar a adsorção de AuNPs sendo que, os restantes pré-tratamentos aplicados neste substrato evidenciaram resultados pouco satisfatórios. Por outro lado, para o substrato de CO tingido (olive) concluiu-se que, como pré-tratamento, é apenas necessária uma lavagem doméstica. Para os substratos de PES e CO/PES os resultados foram mais satisfatórios quando estes foram pré-tratados com plasma atmosférico.

Relativamente à funcionalização propriamente dita, os resultados da análise UV-Vis mostraram que o processo de esgotamento é bastante mais rentável, relativamente ao processo de impregnação, e promove maior adsorção de AuNPs. A razão de banho adequada é 1:20 pois, para razões de banho inferiores o esgotamento não ocorre na totalidade. Para além disso, através da metodologia DoE, concluiu-se que para otimizar o processo, o esgotamento deveria ocorrer a 70 °C durante 10 minutos. Um pH de esgotamento mais elevado (próximo de 9) mostrou também ser mais vantajoso, incrementando a adsorção das AuNPs.

A adição de produtos auxiliares também foi estudada e chegou-se à conclusão que, para otimizar a funcionalização dos substratos, era necessário adicionar dois surfactantes (A e D), pois, para além de promoverem a adsorção de AuNPs, diminuíam o manchamento das amostras. Por outro lado, a aplicação de *crosslinkers* não trouxe qualquer vantagem ao processo, muito provavelmente por, ao invés de criarem “pontes” de ligação entre as NPs e o substrato, acabaram por “obstruir” ocupando grupos funcionais livres.

Entre os substratos funcionalizados, o que obteve melhores resultados, foi o substrato de CO com meia-branqueação. Este mostrou uma maior ligação de AuNPs, tanto pelos resultados de refletância, como pela análise da Absorção Atômica e da análise EDS. De todos os substratos, este é também o que apresenta maior solidez às lavagens. O substrato de PES, apesar de apresentar uma elevada quantidade de ouro após 1 lavagem, a quantidade diminui drasticamente após 20 lavagens. O mesmo acontece com o substrato de CO/PES, ainda que este, aparentemente, apresente elevada quantidade de AuNPs nas imagens de SEM, é preciso lembrar que, para além de apresentar impurezas, este substrato apresentou também muito manchamento, e as imagens SEM podem ser reflexo disso. Por último, o substrato de CO tingido (olive) cuja cor dificultou a sua análise, espectroscopia UV-Vis, nos ensaios de Absorção Atômica mostrou que, mesmo com baixa quantidade de ouro após 1 lavagem, essa quantidade permanece praticamente constante até 20 lavagens, indicando assim uma elevada solidez à lavagem.

Relativamente ao ensaio de solidez ao suor, os resultados foram ligeiramente inconclusivos, havendo, contudo, indicações de que a libertação de AuNPs com o suor (alcalino) é bastante baixa, com valores próximos ao valor mínimo de deteção e, por esse motivo, conclui-se que a solidez dos substratos ao suor é elevada.

Os ensaios antimicrobianos mostraram que as AuNPs, por si só, apresentam comportamento antimicrobiano com diferentes estirpes de bactérias e com o bacteriófago MS2. Os ensaios realizados pelo instituto JSI também evidenciaram o comportamento antibacteriano dos substratos, salientando-se as propriedades bactericidas perante as estirpes *E. coli*, *S. epidermidis* e *B. subtilis*, e bacteriostáticas para a estirpe *P. aeruginosa*. Em contrapartida, os ensaios antimicrobianos realizados no centro 2C2T da Universidade do Minho apresentaram resultados dispare, com baixas reduções logarítmicas e, conseqüentemente, baixa atividade antimicrobiana para qualquer uma das estirpes.

É necessário relembrar, contudo, que as AuNPs utilizadas neste projeto encontra-se ainda em fase de investigação, tendo-se, por exemplo, verificado diferenças significativas entre os *batches* recebidos. Assim, é natural que o seu comportamento nem sempre seja reprodutível, o que dificulta bastante a interpretação dos resultados obtidos. Numa fase inicial, as AuNPs foram usadas falcon a falcon, mas devido à não reprodutibilidade observada em alguns ensaios, juntou-se as dispersões de todos os falcons numa única dispersão, de modo a diminuir as variáveis do processo, mas já não foi possível repetir todos os ensaios/testes.

5.5. Perspetivas Futuras

Para além da utilização de NPs sob investigação/em desenvolvimento, outra dificuldade sentida ao longo do projeto foi a elevada quantidade de variáveis a analisar para otimizar o processo. Adicionalmente, os ensaios antimicrobianos realizados no centro 2C2T da Universidade do Minho também se mostraram desafiadores, devido ao comportamento imprevisível de algumas bactérias, em especial da *P. aeruginosa*. De salientar que o laboratório de microbiologia é um ambiente delicado, onde um mau manuseamento do material pode facilmente conduzir a erros nos resultados obtidos.

Assim sendo, e considerando que devido às limitações temporais não foi possível realizar novos ensaios, são apresentadas algumas propostas de tarefas para continuidade deste trabalho:

- › Novo estudo da diminuição da razão de banho, em condições ótimas de tempo e temperatura;
- › Utilização de ultrassons durante o processo para promover a dispersão de AuNPs nas dispersões de esgotamento e eventualmente nas de impregnação;
- › Estudo da aplicação de novos *crosslinkers* nos diferentes substratos;
- › Investigação e aplicação de novos métodos para diminuir o manchamento e aumentar a solidez dos substratos;
- › Realização de novos ensaios antimicrobianos em novas amostras;
- › Realização do ensaio da Absorção Atômica numa dispersão de esgotamento com 0,1 mg/mL de AuNPs, para analisar o rendimento do esgotamento;
- › Estudar a degradação das AuNPs ao longo do tempo, que poderá ter influenciado de forma negativa os resultados dos ensaios antimicrobianos;
- › Avaliar a toxicidade das AuNPs e se a mesma é modificada na presença de produtos auxiliares de esgotamento/impregnação;
- › Analisar se a alteração do pH e a adição de produtos auxiliares modifica as AuNPs de forma a afetar os resultados obtidos nas análises da refletância.

Referências Bibliográficas

Al-balakocy, N. G., El-badry, K. and Hassan, T. M. (2019) 'Multi-Finishing of Polyester and Polyester Cotton Blend Fabrics Activated by Enzymatic Treatment and Loaded with Zinc Oxide Nanoparticles', in *Cellulose*.

Almeida, T. *et al.* (2016) 'GUIA GERAL PARA A SELEÇÃO DE EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL (EPI)'. Lisboa, p. 28.

Anjum, S. *et al.* (2019) 'Preparation and biological characterization of plasma functionalized poly (ethylene terephthalate) antimicrobial sutures', *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, pp. 1–9. doi: 10.1080/00914037.2019.1655748.

Arakawa, F. S. *et al.* (2015) 'Síntese De Nanopartículas Metálicas E Óxidos Metálicos Suportadas Em Carvão Ativado Para Remoção De Escherichia Coli Da Água Synthesis of Metallic Nanoparticles Supported on Activated Carbon for Escherichia Coli Removal of Drinking Water', *E-Xacta*, 8(1), pp. 87–98.

Balakumaran, M. D. *et al.* (2016) 'Mycosynthesis of silver and gold nanoparticles: Optimization, characterization and antimicrobial activity against human pathogens', *Microbiological Research*, 182, pp. 8–20. doi: 10.1016/j.micres.2015.09.009.

Chang, Y. Bin *et al.* (2008) 'A study on chitosan modification of polyester fabrics by atmospheric pressure plasma and its antibacterial effects', *Fibers and Polymers*, 9(3), pp. 307–311. doi: 10.1007/s12221-008-0049-6.

Chung, Y. S., Lee, K. K. and Kim, J. W. (1998) 'Durable Press and Antimicrobial Finishing of Cotton Fabrics with a Citric Acid and Chitosan Treatment', *Textile Research Journal*, 68(10), pp. 772–775. doi: 10.1177/004051759806801011.

Davey, R. (2019) *Que é cristalografia do raio X?*, *News Medical Life Sciences*. Available at: [https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-X-ray-Crystallography-\(Portuguese\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-X-ray-Crystallography-(Portuguese).aspx) (Accessed: 17 November 2020).

Emam, H. E. (2019) 'Generic strategies for functionalization of cellulosic textiles with metal salts', *Cellulose*, 26(3), pp. 1431–1447. doi: 10.1007/s10570-018-2185-5.

Fan, F., Zhang, W. and Wang, C. (2015) 'Covalent bonding and photochromic properties of

double-shell polyurethane-chitosan microcapsules crosslinked onto cotton fabric', *Cellulose*, 22(2), pp. 1427–1438. doi: 10.1007/s10570-015-0567-5.

Ferreira, H. H. (2016) 'Importância do estudo em Microscopia Eletrônica de Varrimento de amostras incluídas em parafina para fins de diagnóstico', *Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Tecnologias Biomédicas*, pp. 26–27.

Fundamentos básicos FTIR (no date) *Bruker*. Available at: <https://www.bruker.com/pt/products/infrared-near-infrared-and-raman-spectroscopy/ftir-basics.html> (Accessed: 17 November 2020).

Gao, D. *et al.* (2014) 'Preparation, characterization and antibacterial functionalization of cotton fabric using dimethyl diallyl ammonium chloride-allyl glycidyl ether-methacrylic / nano-ZnO composite', *Chemical Engineering Journal*, 258, pp. 85–92. doi: 10.1016/j.cej.2014.07.072.

Gopalakrishnan, D. and Aswini, R. K. (2007) *Antimicrobial Finishes*. Available at: <https://www.fibre2fashion.com/industry-article/1240/antimicrobial-finishes> (Accessed: 8 March 2021).

Gulrajani, M. L. *et al.* (2008) 'Application of silk sericin to polyester fabric', *Journal of Applied Polymer Science*, 109(1), pp. 314–321. doi: 10.1002/app.28061.

Gunst, R. F., Myers, R. H. and Montgomery, D. C. (1996) 'Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments', *Technometrics*, 38(3). doi: 10.2307/1270613.

Haji, A. *et al.* (2015) 'RSM optimized self-cleaning nano-finishing on polyester/wool fabric pretreated with oxygen plasma', *Journal of the Textile Institute*, 107(8), pp. 985–994. doi: 10.1080/00405000.2015.1077023.

Harifi, T. and Montazer, M. (2017) 'Application of sonochemical technique for sustainable surface modification of polyester fibers resulting in durable nano-sonofinishing', *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, pp. 158–168. doi: 10.1016/j.ultsonch.2017.01.006.

Hasanvand, T. *et al.* (2021) 'A comparative study on antibacterial activity of carvacrol and glutaraldehyde on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* isolates: an in vitro study', *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 19, pp. 475–482. doi: 10.1007/s40201-021-00620-1/Published.

Ibrahim, N. A. *et al.* (2017) 'Loading of chitosan – Nano metal oxide hybrids onto cotton/polyester fabrics to impart permanent and effective multifunctions', *International Journal of Biological Macromolecules*. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.099.

Journal, A. I. *et al.* (2016) 'Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery', 1401. doi: 10.3109/21691401.2014.955107.

Khalifa, I. B. *et al.* (2016) 'Crosslinking of Sericin on air atmospheric plasma treated polyester fabric', *The Journal of The Textile Institute*, (June). doi: 10.1080/00405000.2016.1193983.

Kong, F. Y. *et al.* (2017) 'Unique roles of gold nanoparticles in drug delivery, targeting and imaging applications', *Molecules*, 22(9). doi: 10.3390/molecules22091445.

Korshed, P. *et al.* (2016) 'The molecular mechanisms of the antibacterial effect of picosecond laser generated silver nanoparticles and their toxicity to human cells', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0160078.

Lv, J. *et al.* (2014) 'Preparation and properties of polyester fabrics grafted with O-carboxymethyl chitosan', *Carbohydrate Polymers*, 113, pp. 344–352. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.06.088.

Magalhães, A. P. S. A. (2015) 'Atividade antimicrobiana em têxteis', *Tese MSc, Universidade do Porto*, p. 93.

Maria Fernanda Cerini (2018) *Simulações ambientais e caracterização espectroscópica in situ de potenciais bioassinaturas moleculares para aplicação em missões espaciais*. Universidade de São Paulo.

Matte;, D. L. *et al.* (2020) 'Recomendações sobre o uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) no ambiente hospitalar e prevenção de transmissão cruzada na COVID-19*', *ASSOBRAFIR Ciência*, 11, pp. 47–64. doi: 10.47066/2177-9333.AC20.covid19.005.

Meng, L. *et al.* (2018) 'Surface carboxyl-activated polyester (PET) fibers decorated with glucose carbon microspheres and their enhanced selective adsorption for dyes', *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 123(July), pp. 378–388. doi: 10.1016/j.jpics.2018.08.005.

Mocan, L. *et al.* (2017) 'Laser thermal ablation of multidrug-resistant bacteria using functionalized gold nanoparticles', *International Journal of Nanomedicine*. International Journal of

Nanomedicine, pp. 2255–2263. doi: 10.2147/IJN.S124778.

Morais, D. S., Guedes, R. M. and Lopes, M. A. (2016) 'Antimicrobial approaches for textiles: From research to market', *Materials*, p. 498. doi: 10.3390/ma9060498.

Mustra, C. J. G. O. (2009) 'Aplicação da técnica de espectrofotometria de absorção atômica na análise de metais e metalóides em amostras biológicas.', *Faculdade de Medicina de Lisboa*, p. 124.

Nascente, P. (2010) 'Caracterização De Materiais Por Espectroscopia De Fotoelétrons', in *19º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais*, pp. 6113–6118.

Öktem, T. (2003) 'Surface treatment of cotton fabrics with chitosan', *Coloration Technology*, 119, pp. 241–246.

Park, S. Y. *et al.* (2012) 'Covalent assembly of metal nanoparticles on cellulose fabric and its antimicrobial activity', *Cellulose*, 19(6), pp. 2141–2151. doi: 10.1007/s10570-012-9773-6.

Pelczar, R. M. and Pelczar, M. J. (2020) *microbiology, Encyclopedia Britannica*. Available at: <https://www.britannica.com/science/microbiology> (Accessed: 3 November 2021).

Porto, R. C. T. *et al.* (2017) 'Nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas pelo método poliol: Caracterização e avaliação da atividade antibacteriana', *Revista Materia*, 22. doi: 10.1590/S1517-707620170005.0248.

Rai, A., Prabhune, A. and Perry, C. C. (2010) 'Antibiotic mediated synthesis of gold nanoparticles with potent antimicrobial activity and their application in antimicrobial coatings', *Journal of Materials Chemistry*, 20(32), pp. 6789–6798. doi: 10.1039/c0jm00817f.

Raza, Z. A., Taqi, M. and Tariq, M. R. (2021) 'Antibacterial agents applied as antivirals in textile-based PPE: a narrative review', *Journal of the Textile Institute*. doi: 10.1080/00405000.2021.1889166.

Rodrigues, A. da C. *et al.* (2017) 'Análise Química por Espectroscopia de Raio-X por Dispersão Energia (EDS): Adaptação Aplicada à Raízes de Dendzeiro', in *21o Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Oriental*. Belém - Pará, pp. 20–23.

Rodrigues, J. (2014) *Espectroscopia de Infravermelhos (FTIR) - Laboratório Online, Fciências*. Available at: <https://www.fcencias.com/2014/11/13/espectroscopia-de-infravermelhos-ftir>

laboratorio-online/ (Accessed: 17 November 2020).

Saidin, S. *et al.* (2021) 'Organic and inorganic antibacterial approaches in combating bacterial infection for biomedical application', *Materials Science and Engineering C*, 118(August 2020). doi: 10.1016/j.msec.2020.111382.

Sharaf, S. *et al.* (2011) 'Comparative investigations on the efficiency of different anchoring chemicals for the permanent finishing of cotton with chitosan', *Autex Research Journal*, 11(2), pp. 71–77.

Shim, E. J. *et al.* (2016) 'Development of an enzyme-immobilized support using a polyester woven fabric', *Textile Research Journal*, pp. 1–12. doi: 10.1177/0040517515624874.

Silva, Í. O. Da (2017) *Nanoestrutura plasmônica de ouro e sua aplicação em nanobiotecnologia têxtil: Avaliação antimicrobiana e citotoxicidade*. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Soares, G. (2020) *Funcionalização de materiais têxteis - Textos de Apoio*.

Thambiraj, S., Hema, S. and Ravi Shankaran, D. (2018) 'Functionalized gold nanoparticles for drug delivery applications', *Materials Today: Proceedings*, 5(8), pp. 16763–16773. doi: 10.1016/j.matpr.2018.06.030.

Tortella, G. R. *et al.* (2020) 'Silver nanoparticles: Toxicity in model organisms as an overview of its hazard for human health and the environment', *Journal of Hazardous Materials*, 390(November 2019), p. 121974. doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.121974.

Vukomanovic, M. J., Skapin, S. D. and Suvorov, D. (2013) 'Functionalized Hydroxyapatite/Gold Composites As "Green" Materials With Antibacterial Activity And The Process For Preparing And Use Thereof', *European Patent Office*. Slovenia. doi: 10.1021/ja1028843.

Wei, Z. and Gu, Z. (2001) 'A Study of One-Bath Alkali – Amine Hydrolysis and Silk- Fibroin Finishing of Polyester Microfiber Crepe Fabric', pp. 1467–1473.

Xu, Q. B. *et al.* (2018) 'Surface modification by carboxymethyl chitosan via pad-dry-cure method for binding Ag NPs onto cotton fabric', *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, pp. 796–803. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.091.

Xu, Y. *et al.* (2014) 'Crosslinking chitosan into H₃PO₄/HNO₃-NANO₂ oxidized cellulose

fabrics as antibacterial- finished material', *Carbohydrate Polymers*, 112, pp. 186–194. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.05.054.

Yaqoob, S. B. *et al.* (2020) 'Gold, Silver, and Palladium Nanoparticles: A Chemical Tool for Biomedical Applications', *Frontiers in Chemistry*. doi: 10.3389/fchem.2020.00376.

Yin, I. X. *et al.* (2020) 'The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry', *International Journal of Nanomedicine*, 15, pp. 2555–2562. doi: 10.2147/IJN.S246764.

Zemljić, L. F., Peršin, Z. and Stenius, P. (2009) 'Improvement of chitosan adsorption onto cellulosic fabrics by plasma treatment', *Biomacromolecules*, 10(5), pp. 1181–1187. doi: 10.1021/bm801483s.

Zhang, F. *et al.* (2009) 'The antimicrobial activity of the cotton fabric grafted with an amino-terminated hyperbranched polymer', *Cellulose*, 16(2), pp. 281–288. doi: 10.1007/s10570-008-9253-1.

Zhang, Y. *et al.* (2015) 'Antimicrobial Activity of Gold Nanoparticles and Ionic Gold', *Journal of Environmental Science and Health - Part C Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews*, 33(3), pp. 286–327. doi: 10.1080/10590501.2015.1055161.

Zhou, Y., Sternlicht, H. and Padture, N. P. (2019) 'Transmission Electron Microscopy of Halide Perovskite Materials and Devices', *Joule*, 3(3), pp. 641–661. doi: 10.1016/J.JOULE.2018.12.011.

Zille, A. (2019) *Plasma technology in fashion and textiles, Sustainable Technologies for Fashion and Textiles*. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/B978-0-08-102867-4.00006-2.