

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**MARCOS HENRIQUE DE SOUZA SANTANA**

**PROPOSTA DE OTIMIZAÇÃO DE AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA  
EM TÊXTEIS**

**APUCARANA**

**2021**

**MARCOS HENRIQUE DE SOUZA SANTANA**

**PROPOSTA DE OTIMIZAÇÃO DE AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA EM TÊXTEIS**

**Proposal for the Optimization of Microbiological Evaluation in Textiles**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Têxtil da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Fabio Alexandre Pereira Scacchetti

Coorientadora: Prof. Dra. Graciana Freitas Palioto Pescim

**APUCARANA**

**2021**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação



Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Campus Apucarana

COENT – Coordenação do curso superior em Engenharia Têxtil

### TERMO DE APROVAÇÃO

**Título do Trabalho de Conclusão de Curso:**

**PROPOSTA DE OTIMIZAÇÃO DE AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA EM TÊXTEIS**

Por

MARCOS HENRIQUE DE SOUZA SANTANA

Monografia apresentada às 09 horas do dia 07 de maio de 2021, como requisito parcial, para conclusão do Curso de Engenharia Têxtil da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Apucarana. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação e conferidas, bem como achadas conforme, as alterações indicadas pela Banca Examinadora, o trabalho de conclusão de curso foi considerado **APROVADO**.

---

PROFESSOR DR. FABIO ALEXANDRE PEREIRA SCACCHETTI –  
ORIENTADOR(A)

---

PROFESSORA DR<sup>a</sup> DAYANE SAMARA DE CARVALHO COLTRE –  
EXAMINADORA

---

PROFESSORA DR<sup>a</sup> CAROLINE APOLONI CIONEK – EXAMINADORA

\*A Folha de aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.

## AGRADECIMENTOS

Ao concluir este trabalho, gostaria de agradecer a algumas pessoas próximas que me ajudaram de alguma forma a mais essa etapa conquistada de minha vida e que fazem a diferença.

A minha família e principalmente minha mãe por sempre ter apoiado meus estudos fazendo com que eu conseguisse me dedicar ao máximo a vida acadêmica por saber da importância da educação. E em especial minha irmã Jéssica e primos Talita, Bruno, Beatriz, Gabrielle, Fabiana, Rafael, Lavínia, Keli, Gustavo, Wanderson e Dionatam.

Ao meu orientador Fabio Scacchetti pela paciência, disponibilidade, sabedoria e tamanho profissionalismo passado sempre. É incrível o amor a educação que este pesquisador possui e é por professores assim que a vontade de aprender cresce. Também agradeço a coorientadora Graciana Pescim por tantos conhecimentos passados e paciência.

Aos meus amigos por sempre estarem ao meu lado, nos momentos difíceis e nos bons também, fazendo com que o caminho se tornasse mais leve e prazeroso. Em especial meus amigos Joyce Dias, Felipe Vidoto, Ana Clara Alcântara, Amanda Arenhart, Camila Arenhart, Ana Luisa Oliveira, Lucas Vinicius, Tamires Almeida, Ana Isabela Zavilensk, Luana Bueno, Bruna Gouvea, Carolina Almeida, Gisele Almeida, Débora Ferreira, Fernanda Lima, Samira Mendes, Isabella Rufino, Isabelle Balestra, Helen Firmino, Jacqueline Brandeli, Andreia Jadach e Fabricio Maestá.

Também agradeço ao Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa do Câmpus Apucarana (LAMAP) pelo apoio e ajuda sempre, em especial a utilização do equipamento UV-Vis que foi tão importante na realização desse trabalho. Também agradeço o Núcleo de Inovação Industrial (NII), em que faço parte, por toda ajuda estrutural.

Agradeço também a banca examinadora, professoras Caroline Cionek e Dayane Coltre, por tanto agregarem ao meu trabalho.

Viva a ciência.

## RESUMO

Os têxteis há tempos são reconhecidos por serem suscetíveis ao ataque de microrganismos. Esses ataques são considerados inconvenientes pois resulta em perda de resistência, odores e problemas de saúde aos usuários. Dessa forma, acabamentos do tipo antimicrobiano surgem como produtos para proteção dos têxteis a esses ataques. O presente trabalho teve como objetivo a comparação de métodos de avaliação antimicrobiana, uma vez que os testes do tipo quantitativo podem ter um elevado número de experimentos. propondo, uma nova abordagem para avaliação, visando redução de custo e tempo neste procedimento. Para tal, um tecido de malha com composição 100% PES, funcionalizado com estrutura metal-orgânica, foi utilizado para o estudo. O tecido foi avaliado quantitativamente, por meio de adaptação da norma ASTM E2149-13. Então, um método de leitura indireta, visual e mais rápido, foi desenvolvido elaborando uma curva de crescimento de bactérias por avaliação espectrofotométrica a fim de determinar uma curva padrão de crescimento de bactéria *E. coli* ATCC® 25922™ e uma equação que relacione cor (devido a utilização do corante indicador Resazurina) com a concentração de UFC mL<sup>-1</sup> de um experimento com têxteis com potenciais antimicrobianos e comparar com a metodologia quantitativa. Como resultado do presente trabalho foi possível propor um método intermediário para testes quantitativos que seleciona amostras que se mostrem viáveis, de forma visual e simplificada pelo método, reduzindo tempo e custo de análise antimicrobiana quantitativa.

**Palavras chave:** Têxteis antimicrobianos. Bactéria. Espectrofotometro. Quantitativo.

## ABSTRACT

Textiles have long been recognized for being susceptible to attack by microorganisms. These attacks are considered inconvenient as it results in loss of resistance, odors and health problems for users. Thus, antimicrobial finishes appear as products to protect textiles from these attacks. The present work aimed to compare methods of antimicrobial evaluation, since quantitative tests can have a high number of experiments. proposing, a new approach for evaluation, aiming at cost and time reduction in this procedure. For this purpose, a mesh fabric with 100% PES composition, functionalized with a metal-organic structure, was used for the study. The tissue was evaluated quantitatively, through adaptation of the ASTM E2149-13 standard. Then, a method of indirect, visual and faster reading, was developed by elaborating a bacterial growth curve by spectrophotometric evaluation in order to determine a standard growth curve for *E. coli* ATCC® 25922TM bacteria and an equation that relates color (due to the use of the indicator dye Resazurina) with the concentration of CFU mL<sup>-1</sup> from an experiment with textiles with potential antimicrobials and compare with the quantitative methodology. As a result of the present work, it was possible to propose an intermediate method for quantitative tests that selects samples that prove viable, in a visual way and simplified by the method, reducing the time and cost of quantitative antimicrobial analysis.

**Keywords:** Antimicrobial textiles. Bacterium. Spectrophotometer. Quantitative.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Diferentes formas encontradas em bactérias .....	<b>14</b>
<b>Figura 2</b> - Estrutura morfológica da célula bacteriana, parede da célula gram-positiva representada à esquerda e gram-negativa à direita .....	<b>15</b>
<b>Figura 3</b> - Contagem em placa e diluição seriada .....	<b>20</b>
<b>Figura 4</b> - Mecanismo de determinação do número de bactérias utilizando espectrofotometria.....	<b>20</b>
<b>Figura 5</b> - Processo de diluição e emplacamento da solução bacteriana .....	<b>243</b>
<b>Figura 6</b> - Crescimento de colônias de E. coli do teste quantitativo em ágar macconkey. Acima placas do controle e abaixo são referentes ao tecido funcionalizado .....	<b>27</b>
<b>Figura 7</b> – Comparação entre petris de diluição número 2 do teste quantitativo. À esquerda controle e à direita em relação ao tecido funcionalizado com agente antimicrobiano .....	<b>28</b>
<b>Figura 8</b> – Leitura de absorção da solução bacteriana nos diferentes tempos em espectrofotômetro .....	<b>30</b>
<b>Figura 9</b> – Diferença entre o tempo zero (esquerda) e 6 horas (direita) na solução bacteriana com resazurina .....	<b>30</b>
<b>Figura 10</b> - Comportamento de crescimento das bactérias em relação ao tempo.....	<b>31</b>
<b>Figura 11</b> – Comportamento de crescimento do número de bactérias em relação a absorbância.....	<b>33</b>

# LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABIT</b>	Associação Brasileira da Indústria Têxtil
<b>CMI</b>	Concentração mínima inibitória
<b>CML</b>	Concentração mínima letal
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colônias
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>TSA</b>	Trypticase soy agar
<b>AATCC</b>	American Association of Textile Chemists and Colorists
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>ASTM</b>	American Society for Testing and Materials
<b>TSB</b>	Trypticase Soy Broth (Caldo de triptona de soja)

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>11</b>
1.1.1	Objetivo Geral.....	11
1.1.2	Objetivos específicos.....	11
<b>1.2</b>	<b>Justificativa</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Bactérias</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>Crescimento Microbianos em Têxteis</b> .....	<b>15</b>
<b>2.3</b>	<b>Têxteis Antimicrobianos</b> .....	<b>17</b>
<b>2.4</b>	<b>Métodos de averiguação do crescimento microbiano</b> .....	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Materiais</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2</b>	<b>Métodos</b> .....	<b>23</b>
3.2.1	Teste Quantitativo.....	23
3.2.2	Construção de curva de crescimento de <i>E. coli</i> ATCC® 25922™ por meio de avaliação indereta por espectrofotometria quantitativamente aceitável .....	25
3.2.3	Utilização e validação da curva de crescimento de crescimento de <i>E. coli</i> ATCC® 25922™ por meio de avaliação indireta por espectrofotometria utilizando tecido funcionalizado com estrutura metal-orgânica .....	26
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1</b>	<b>Avaliação microbiológica dos substratos têxteis</b> .....	<b>27</b>
4.1.1	Teste Quantitativo.....	27
4.1.1	Construção de curva de crescimento de <i>E. coli</i> ATCC® 25922™ por meio de avaliação indireta por espectrofotometria quantitativamente aceitável .....	29
4.1.2	Utilização e validação da curva de crescimento de crescimento de <i>E. coli</i> ATCC® 25922™ por meio de avaliação indireta por espectrofotometria utilizando tecido funcionalizado com estrutura metal-orgânica .....	34
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>37</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>39</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O consumo de matérias têxteis é expressivo no Brasil e no mundo. Segundo a Associação Brasileira da Indústria Têxtil (ABIT, 2020), a indústria têxtil brasileira é responsável pela produção de cerca de 1,3 milhões de toneladas anuais em média e a segunda maior geradora de emprego no cenário nacional. Os materiais têxteis, além do vestuário comum, são muito usados como equipamentos de proteção individual, incluindo os materiais avançados, estes estão em crescimento constante de demanda nas últimas décadas devido aos objetivos de redução de riscos, garantia de saúde, segurança e proteção (MAO, 2019).

Os têxteis há tempos são reconhecidos por serem suscetíveis ao ataque de microrganismos, isso se deve a fonte de umidade, energia e nutrientes, essenciais para o seu crescimento e encontrados em abundância nestes materiais (GAO; CRANSTON, 2008). Estes ataques são considerados inconvenientes pois resultam em perda de resistência, diminuição de alongamento, descoloração e alterações no aspecto do material, além de odores (ESTEVES, 2009; TEUFEL *et al.*, 2010). Ainda, o contato com microrganismos pode gerar problemas de saúde, uma vez que este contato pode ser responsável por gerar doenças e alergias (MATOS, 2014).

Dessa forma, os acabamentos do tipo antimicrobiano surgem como produtos para controle de saúde e higiene com o objetivo de evitar infecções e contaminações (principalmente em ambientes hospitalares), além de proteger os têxteis de ataques dos microrganismos, e se tornam um importante segmento no mercado. Contudo, acabamentos também podem ser prejudiciais a algumas espécies vivas importantes, como os humanos, e um dos requisitos é que este não cause malefícios a flora presente de bactérias não patogênicas na pele, uma vez que são importantes para a saúde (ESTEVES, 2009; PURWAR, 2019; UDDIN, 2014).

Ainda, com o surgimento do novo corona vírus, causador da síndrome respiratória aguda (SARS)-CoV-2, com alta taxa de transmissibilidade, o mundo enfrenta uma pandemia severa. Fica evidente a necessidade de diminuir a transmissão do vírus com quarentena, isolamento de contato, higiene das mãos e uso de máscaras (LAYNE *et al.*, 2020). A utilização de máscaras reduz a transmissão aérea, partículas infecciosas de aerossol poder ser liberadas durante a respiração e a fala por indivíduos infectados assintomáticos. Quando nenhum mascaramento é

utilizado a exposição é maximizada, todavia o mascaramento universal diminui a exposição ao vírus (PRATHER; WANG; SCHOOLEY, 2020).

Com o aumento drástico da utilização de máscaras faciais em todo o globo, houve escassez de equipamentos de proteção individual (EPI). Esta escassez ameaça à segurança de quem trabalha na linha de frente ao combate da pandemia e levou equipes médica a reutilizar máscaras que podem ter sido contaminadas durante os tratamentos. O desenvolvimento de EPI's reutilizáveis com aplicação de substâncias antivirais poderia diminuir o risco de transmissão secundária e sanar o problema da escassez. Certos metais mostram efeito antiviral e especificamente a do cobre é bem conhecida, uma vez que os cátions de cobre capturam prontamente bactérias e vírus com carga negativa e esta atividade impede a replicação viral e as funções de infecção (JUNG *et al.*, 2021).

A regulação de têxteis com propriedades antimicrobianas se dá pelo uso de normas internacionais, das quais estudam e comprovam o nível de atividade presente nos materiais, sendo que os procedimentos experimentais atuam em uma esfera qualitativa e quantitativa. O presente trabalho tem como objetivo avaliar um têxtil com propriedades antimicrobianas, de acordo com a norma estabelecida e propor uma nova abordagem minimamente confiável, visando a redução de custo e tempo das avaliações.

## **1.1 Objetivos**

### 1.1.1 Objetivo Geral

Efetuar um estudo comparativo entre os procedimentos para a determinação de propriedades antimicrobianas em têxteis a fim de propor uma nova abordagem otimizada quantitativamente e capaz de reduzir o tempo e custo de análise da atividade antimicrobiana em têxteis.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar quantitativamente as propriedades dos têxteis conforme norma técnicas;

- Efetuar a construção de curva de crescimento dos microrganismos pelo método de espectrofotometria;
- Efetuar a análise comparativa de têxteis com acabamentos antimicrobianos e têxteis sem acabamentos com o novo método;
- Propor uma nova abordagem de testes.

## **1.2 Justificativa**

Os testes com propriedades antimicrobianas devem confirmar sua atividade, para tal, necessitam seguir protocolos experimentais que comprovem sua ação. O caminho natural se inicia por uma comprovação qualitativa, um método baseado em normas para qualificar quais microrganismos são suscetíveis à ação do acabamento. Todavia, as análises podem prosseguir para um estudo maior, como por exemplo a determinação de comportamento bactericida e bacteriostático, obtidos por um teste quantitativo. Neste caso, a complexidade do protocolo torna um estudo de prazo e ônus diferenciados.

O presente trabalho tem como motivação efetuar um estudo que proporcione uma análise intermediária entre os protocolos existentes, no intuito de confirmar a tendência de comportamento antimicrobiano em amostras de uma forma rápida, reduzindo significativamente o número de análises quantitativas a serem realizadas posteriormente e, por consequência, reduzindo tempo de análise e custo.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

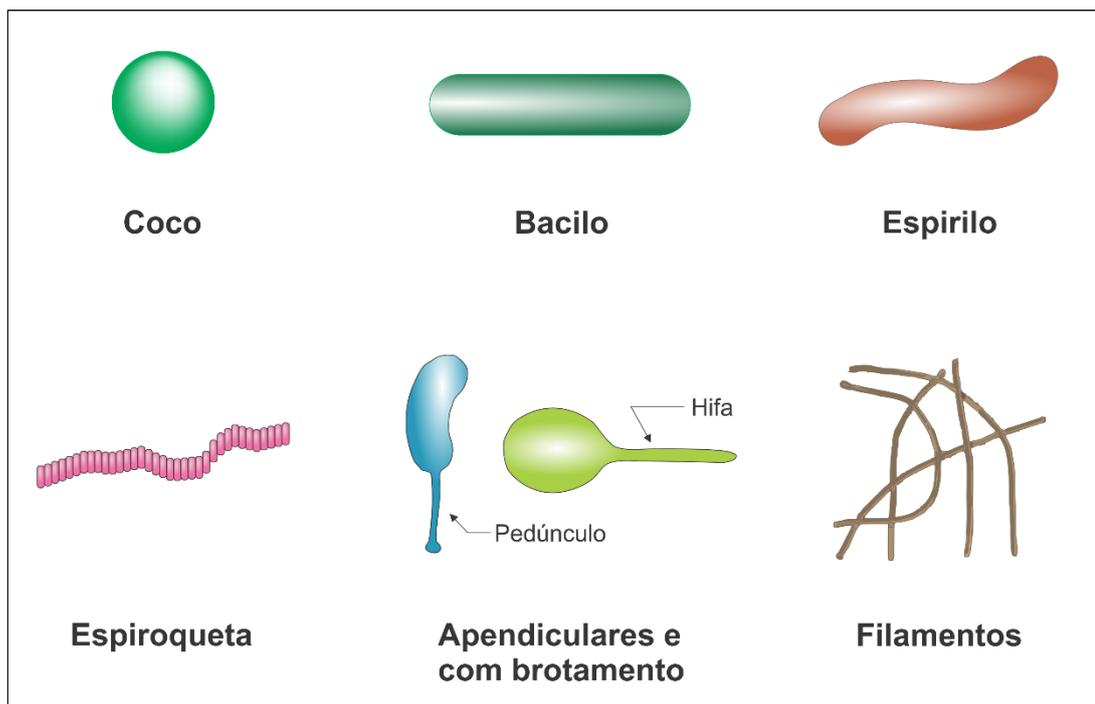
### 2.1 Bactérias

Os microrganismos são definidos como seres microscópios, individualmente e invisíveis a olho nu. São dotados de maior diversidade biológica conhecida (morfológica, fisiológica e ecológica), apresentam variadas formas celulares e ainda são metabolicamente capazes de efetuar todos os tipos de reações bioquímicas conhecidas, sendo encontrados em praticamente todos os ambientes. São capazes de crescerem e se reproduzirem, suas estruturas são organizadas e possuem DNA (ácido desoxirribonucleico). Ainda, são divididos em grupos conhecidos como: os vírus, as bactérias, as arqueas, as algas, os protozoários e os fungos (VERMELHO *et al.*, 2006).

Estes mesmos autores, Vermelho *et al.* (2006), consideram que os microrganismos podem ser classificados em procariotos e em eucariotos de acordo com a organização celular e estrutural. Os procariotos são células sem núcleo com membrana, enquanto os eucariontes são células com núcleo com membrana. A membrana da superfície celular, ou membrana plasmática, é o que regula o movimento de materiais para dentro e fora da célula e auxilia nos sinais elétricos entre células, além de definir o limite da célula, é de importância extrema pois sem essas membranas a vida não poderia existir (BOLSOVER *et al.*, 2004). Essas membranas possuem em sua composição fosfolipídios saturados, esfingolipídios, glicolipídios, colesterol, proteínas lipídicas e proteínas ancoradas a glicosilfosfatidilinositol (SEZGIN *et al.*, 2017).

As bactérias são classificadas em microrganismos procarióticos, em que fazem parte também deste grupo as denominadas arqueas, onde a diferença se dá pela composição de lipídios e organização da parede celular. Esses microrganismos procarióticos possuem geralmente um tamanho menor que 5 µm de diâmetro e a divisão celular usualmente acontece por fissão binária (BERTRAND *et al.*, 2018). As principais morfologias celulares das bactérias são apresentadas na Figura 1. Quando sua morfologia é esférica ou ovalada, denomina-se coco, para a forma cilíndrica se dá o nome de bastonete ou bacilo, quando um bacilo apresenta formas espiraladas estes são chamados de espirilos (MADIGAN *et al.*, 2016).

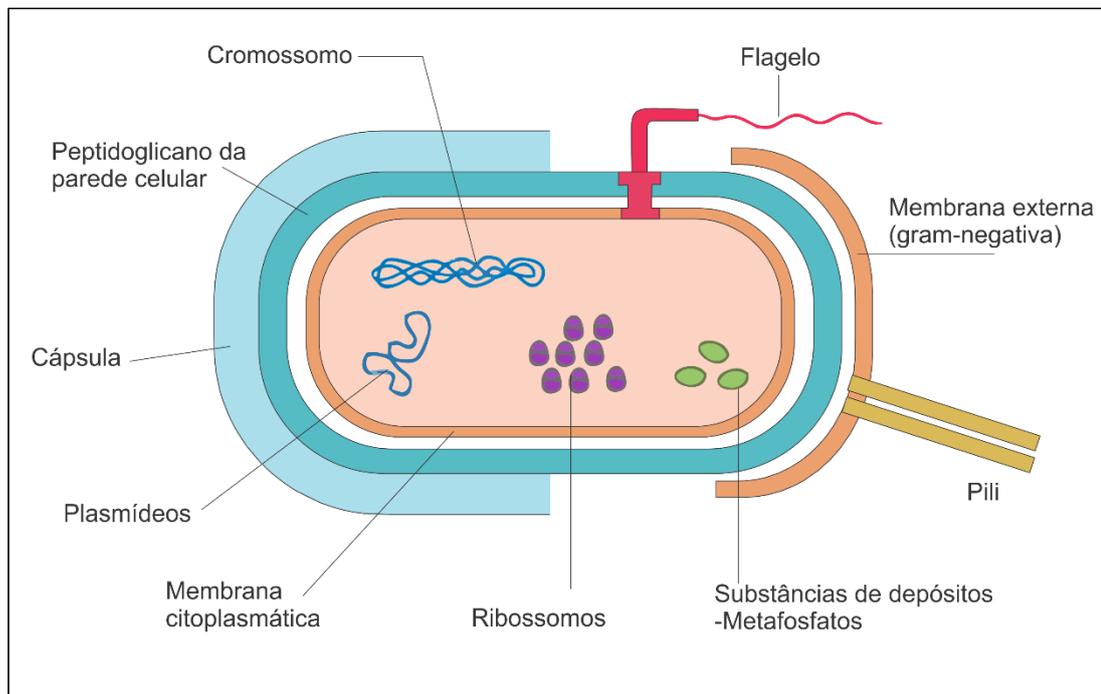
Figura 1 - Diferentes formas encontradas em bactérias



Fonte: Adaptado de Vermelho *et al.* (2006)

As espécies de bactérias são divididas em dois grandes grupos principais: os denominados *gram-positivos* e *gram-negativos*. As diferenças na estrutura da parede celular é o que determina a diferenciação entre esses grupos, as bactérias do tipo *gram-negativas* possuem a parede celular e uma membrana externa, enquanto nas *gram-positivas* há somente uma parede espessa (MADIGAN *et al.*, 2016). A Figura 2 apresenta, de forma simplificada, a estrutura celular das bactérias e aponta a diferença entre as paredes externas de *gram-positivas* e *gram-negativas*, esta última à direita da figura.

**Figura 2 - Estrutura morfológica da célula bacteriana, parede da célula *gram-positiva* representada à esquerda e *gram-negativa* à direita**



Fonte: Adaptado de Kayser *et. al.* (2005)

## 2.2 Crescimento Microbianos em Têxteis

A cultura de microrganismos refere-se ao mecanismo de propagação destes por meio do fornecimento de condições ambientais apropriadas para que o processo ocorra. Os microrganismos necessitam de todos os elementos que compõem sua matéria orgânica para que o crescimento possa ocorrer. Nutrientes contendo esses elementos são chamados de meio de cultura e classificados de acordo com as fontes de carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo e minerais. Outros fatores necessários para o crescimento desses organismos são o pH e temperatura, sendo que a maioria dos microrganismos possui uma faixa estreita de pH ideal para crescimento assim como as faixas de temperatura, ou seja, variam substancialmente de acordo com diferentes espécies (BROOKS *et al.*, 2013).

Os têxteis há muito são reconhecidos por darem suporte ao crescimento de microrganismos tais como bactérias e fungos, uma vez que atendem os requisitos acima descritos, favorecendo então sua proliferação. As fibras sintéticas possuem resistência maior ao ataque dos microrganismos, em sua maioria, devido ao caráter mais hidrofóbico destas em relação às fibras de origem natural. Os carboidratos

presentes no algodão e as proteínas existentes nas fibras queratínicas podem agir como fontes de energia e nutrientes em determinadas condições, assim como poeira e suor (GAO; CRANSTON, 2008).

A estrutura porosa e hidrofílica das fibras naturais, como o algodão, linho e lã, retém água e oxigênio fazendo com que se tornem fonte alimentar dos microrganismos e sejam mais susceptíveis a ataques microbianos. Por mais que fibras celulósicas não são fonte alimentar direta dos microrganismos, alguns fungos e bactérias podem segregar enzimas e converter a celulose, por hidrólise, em glicose, diminuindo então o grau de polimerização das fibras (PURWAR *et al.*, 2004). Já as fibras sintéticas, por mais que sejam hidrofóbicas (em relação às fibras naturais), não são totalmente livres desses ataques. Os inconvenientes da proliferação dos microrganismos são bastante consideráveis, tais como: perda de resistência, diminuição de alongamento, descoloração e alterações no aspecto (ESTEVEZ, 2009).

Um dos maiores problemas em relação ao crescimento microbiano em estruturas têxteis, devido a umidade, é a manifestação de odores (TEUFEL *et al.*, 2010). Além deste inconveniente, o contato com microrganismos pode gerar doenças e alergias, ou seja, são muitos os desconfortos e inconvenientes que a simples utilização de têxteis podem causar aos seus usuários. Outro problema são infecções em hospitais devido a condição de pacientes com feridas na pele, essas feridas servem de locais ideais para crescimento microbiano, uma vez que exalam fluidos combinados à temperatura do corpo e ricos componentes de nutrição (QIN, 2019).

Dessa forma, pacientes adquirem novas doenças em ambientes hospitalares, agravando o quadro hospitalar e nos piores casos, podem levar até a morte (QIN, 2019). O Serviço de Controle de Infecção Hospitalar evidencia que um dos maiores problemas em ambientes hospitalares é a infecção hospitalar, adquirida por pacientes após sua internação, provocadas pela proliferação de microrganismos patogênicos, para controle desses problemas medidas de higienização devem ser utilizadas. Uma forma de evitar ou reduzir esses problemas é a utilização de têxteis antimicrobianos, favorecendo então maior higiene, bem-estar e saúde para os utilizadores, além de proteger e aumentar a vida útil dos têxteis (MATOS, 2014).

### 2.3 Têxteis Antimicrobianos

Com a evidência de atividade microbiana nos têxteis e com o intuito de combater a proliferação e impedir a degradação desses materiais, torna-se interessante que haja um acabamento antimicrobiano nos substratos têxteis (RELVA, 2012). O termo antimicrobiano é utilizado para se referir a um vasto conjunto de tecnologias que podem disponibilizar diferentes níveis de defesa para produtos contra os microrganismos. Os antimicrobianos diferem em sua natureza química, mecanismo de ação, impacto nos usuários e no meio ambiente, durabilidade nos diferentes tipos de substratos, custos e como é a interação com os microrganismos (MONTICELLO; WHITE; VANDENDAELE, 2002). Para os autores Pelczar, Chan e Krieg (1993), um agente antimicrobiano é aquele que mata ou inibe o crescimento de microrganismos.

Agentes bactericida são aqueles que matam as bactérias, similar aos termos fungicida, viricida, esporicida que se referem a agentes que matam fungos, vírus e esporos, respectivamente. Já os agentes que impedem o crescimento das bactérias, mas não são necessariamente letais, são denominados agentes bacteriostáticos. Uma forma de avaliar esse efeito, é pela concentração mínima inibitória (CMI), definida como a menor concentração de um determinado agente antimicrobiano que inibe o crescimento visível de microrganismos (PELCZAR, CHAN E KRIEG, 1993).

A menor concentração de agentes antimicrobianos que impede o crescimento de microrganismos é chamado de concentração mínima letal (CML), ou seja, aquela concentração mínima que não somente inibe o crescimento como também mata os microrganismos presentes no meio (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1993). As aplicações principais em têxteis onde o uso de agentes antimicrobianos se torna interessantes são: vestuários esportivos, meias, forro de calçados, lingerie, filtros de ar, têxteis automotivos, móveis domésticos, tecidos médicos, tecidos antigos presentes em museus entre outros. Um acabamento considerado duradouro deve ser um meio eficaz com poder de controlar microrganismos em têxteis (PURWAR, 2019).

Purwar (2019) estabelece que um tecido ideal antimicrobiano deve cumprir os seguintes requisitos:

- Deve ser eficaz contra um amplo espectro de espécies bacterianas e fúngicas;
- Deve propiciar baixa toxicidade aos consumidores, ou seja, não causar alergia ou irritação aos utilizadores;
- Deve atender aos padrões dos testes de compatibilidade (citotoxicidade, irritação e sensibilização) antes de serem comercializados;
- Não deve matar a flora presente de bactérias não patogênicas na pele do utilizador, uma vez que são importantes para a saúde da pele, pois reduzem o pH da superfície da pele produzindo antibióticos e assim criando um ambiente desfavorável para crescimento de bactérias patogênicas;
- O acabamento deve ser duradouro para lavagem, limpeza a seco e prensagem a quente.

Ainda, os agentes antimicrobianos, dependendo da forma de ação, podem ser divididos em duas categorias: por contato ou por difusão. Os agentes por contato inibem microrganismos apenas na superfície do tecido enquanto por difusão esses são liberados lentamente até a superfície das fibras, ou seja, liberação controlada (RISTÍC *et al.*, 2011). A maneira como os agentes antimicrobianos inibem ou matam os microrganismos está relacionada com os danos da parede celular, alteração da permeabilidade da membrana celular, desnaturação de proteínas, inibição de atividades enzimática ou a inibição da síntese lipídica, uma vez que a sobrevivência ou crescimento de desses organismos depende da integridade da célula (PURWAR, 2019).

## **2.4 Métodos de averiguação do crescimento microbiano**

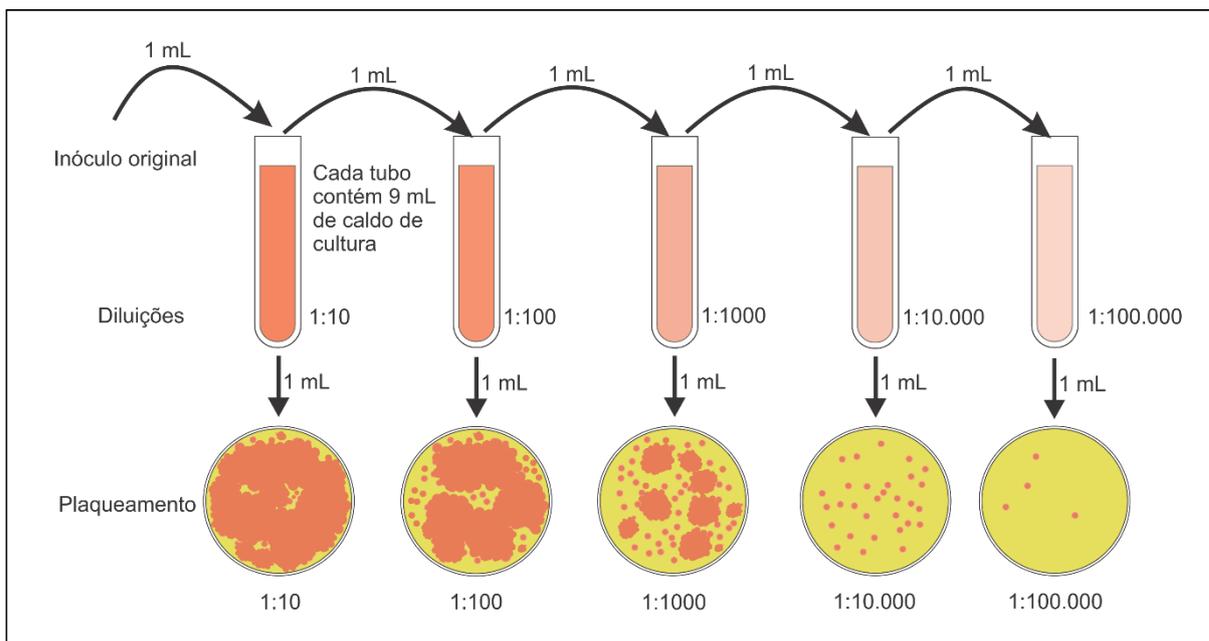
Uma vez que os têxteis são suscetíveis aos ataques de microrganismos, fazendo-se até do uso de tratamentos que atuem contra o ataque, são necessários métodos de averiguação quanto ao ataque e comportamento do têxtil. Desta forma, é possível aplicar métodos qualitativos e quantitativos na determinação do crescimento de uma população microbiana por meio de diferentes métodos.

O método do tipo qualitativo, também conhecido por método de disco-difusão, foi idealizado por Bauer *et al.* (1966) e se caracteriza por ser prático, barato e pouco complexo, deste modo se tornou um dos testes mais utilizados no Brasil em laboratórios de microbiologia. O mecanismo de avaliação se dá pela difusão do material analisado em ágar, assim um halo é formado em volta da amostra, onde a concentração mínima inibitória (CMI) é inversamente proporcional ao diâmetro do halo. O resultado deste método é somente qualitativo e classifica as bactérias como suscetível, intermediária ou resistente ao antimicrobiano analisado (SEJAS *et al.*, 2003). Dessa forma uma avaliação do tipo quantitativa se torna interessante para melhor avaliação dos agentes antimicrobianos.

Existem vários testes do tipo quantitativo, como a determinação da quantidade de células ou pela massa total delas, uma vez que é diretamente proporcional ao número de células. Para contagem de populações bacterianas, que são muito grandes, são utilizadas pequenas amostras e estimadas por meio de cálculos matemáticos. Uma das técnicas mais utilizadas para quantificação de população bacteriana é o método de contagem de placa. Este método considera que uma colônia é originada de um grumo ou cadeia de bactérias, assim o resultado é expresso em unidades formadoras de colônias (UFC) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Para Tortora, Funke e Case (2005), para o sucesso na realização deste método, é substancial que somente um número limitado de colônias cresça na placa analisada, uma vez que há uma saturação quando há um número elevado de colônias e isto impede algumas colônias de crescerem, o que resulta em uma contagem incorreta. A convenção do *Food and Drug Administration* determina que a contagem de colônias nas placas deve ser realizada em placas que possuam de 25 a 250 colônias. Para obtenção de placas que contenham um número de colônias na faixa determinada pela convenção, faz-se necessário a utilização do método de diluição seriada. Este método é esquematizado na Figura 3.

**Figura 3 - Contagem em placa e diluição seriada**



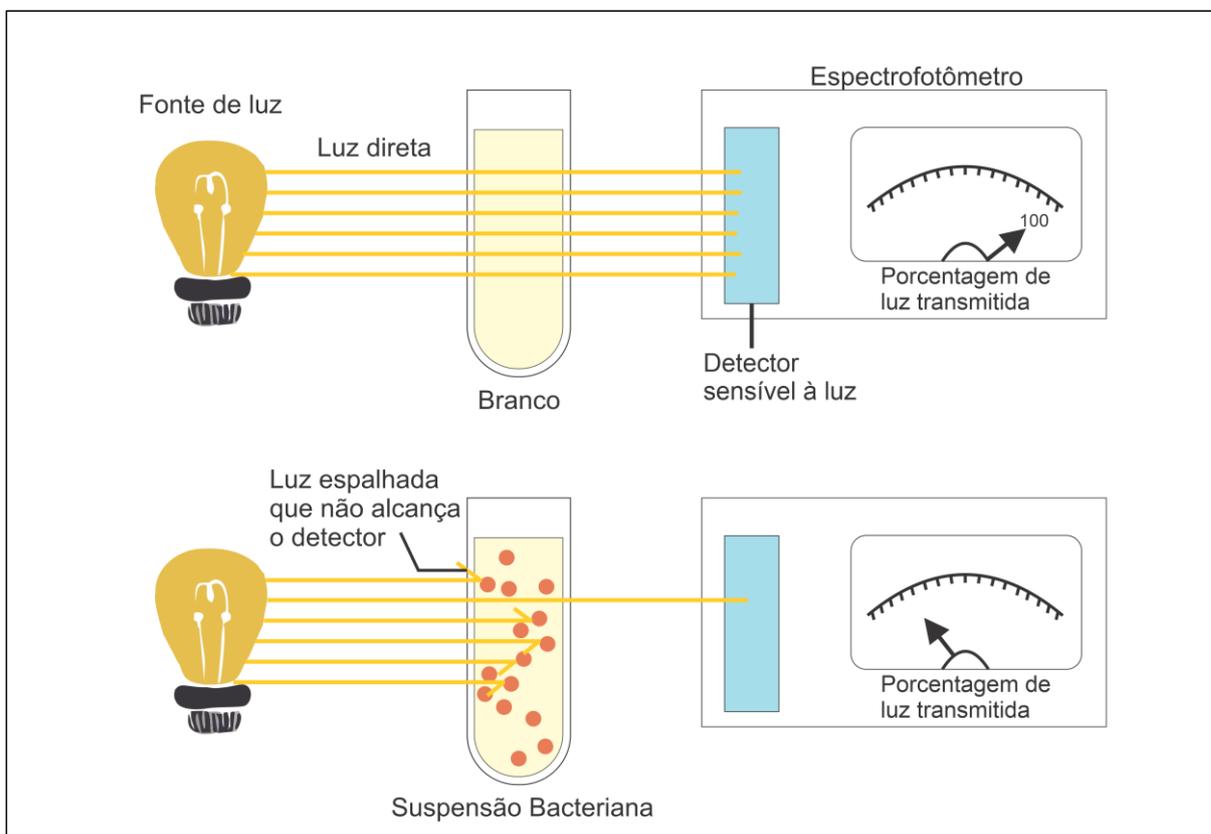
**Fonte: Adaptado de Tortora, Funke e Case (2005)**

Uma outra técnica amplamente utilizada na microbiologia para determinação do número de bactérias é o de espectrofotometria, este é classificado como um método indireto pois em alguns casos não há necessidade da contagem de células microbianas para determinação de seu número. Neste caso o espectrofotômetro transmite um feixe de luz através da suspensão bacteriana. Conforme as células presentes em um meio crescem, maior é a quantidade de luz dispersa, o que resulta em uma suspensão mais turva. A turbidez é quantificada na unidade correspondente a densidade óptica (DO) em um detector fotossensível (MADIGAN *et al.*, 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Dessa forma, é possível relacionar um crescimento microbiano com a leitura no espectrofotômetro de uma solução chamada de branco, sem cultura bacteriana, com uma solução contendo as bactérias e observar sua densidade óptica. A densidade óptica, também chamada de absorvância, é uma expressão logarítmica derivada da porcentagem de transmissão, sendo que esta porcentagem é aferida na escala do detector fotossensível do aparelho. Na Figura 4 é exemplificado o mecanismo de leituras de suspensão bacteriana, em que a quantidade de luz que atravessa o detector no espectrofotômetro é inversamente proporcional ao número de bactérias, ou seja, conforme a quantidade de luz que é transmitida é menor, a

quantidade de bactérias é maior (MADIGAN *et al.*, 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

**Figura 4 - Mecanismo de determinação do número de bactérias utilizando espectrofotometria**



**Fonte: Adaptado de Tortora, Funke e Case (2005)**

Para avaliação de atividade antibacteriana em têxteis, tanto em bactérias gram-positivas como gram-negativas, existem normas estabelecidas pela *American Association of Textile Chemists and Colorists (AATCC)* e *American Society for Testing and Materials (ASTM)* com os devidos procedimentos para as verificações. Os métodos mais empregados são o *AATCC Test Method 100-2004* e *ASTM E2149-13*, que fornecem um procedimento quantitativo para avaliação do grau de atividade antibacteriana em substratos têxteis com acabamento antibacterianos, e o *AATCC Test Method 147-2011*, que se caracteriza como um teste qualitativo em que o objetivo é detectar atividade bacteriostática nos materiais têxteis. Um teste geralmente complementa o outro para comprovação de eficácia em têxteis antimicrobianos.

Outra maneira de avaliar o crescimento microbiano é utilizando corantes indicadores em soluções microbianas. Corantes indicadores podem ser utilizados para determinação de crescimento microbianos, pois estes corantes podem detectar

mudanças de pH ou potencial redutor (ALI-VEHMAS; LOUHI; SANDHOLM, 1991; BORRA *et al.*, 2009; ELSHIKH *et al.*, 2016).

A resazurina é um dos corantes redutíveis mais utilizados para visualização de cultura bacteriana pela sua baixa toxicidade. Este corante possui coloração azul em sua forma oxidada e rosa em sua forma reduzida (resorufina). Seu mecanismo funciona da seguinte maneira: o crescimento da cultura microbiana possui propriedade redutora, em contato com a resazurina, quando há crescimento microbiano, o corante é reduzido (resorufina) e a coloração visível é o rosa fluorescente (ALI-VEHMAS; LOUHI; SANDHOLM, 1991; PATIL *et al.*, 2014).

Assim, o presente estudo relaciona os testes aplicados de acordo com as normas e métodos descritos nesse referencial e propõe um novo modelo capaz de selecionar amostras que possuam potencial de redução microbiana, reduzindo tempo de análise e custo.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Materiais

Para o presente estudo, foi utilizado como substrato têxtil tecido de malha dupla frontura, gramatura de 134 g/m<sup>2</sup>, 15 colunas e 19 carreiras, 100% poliéster. A amostra foi funcionalizada com uma estrutura metal-orgânica, contendo cobre em sua composição, sendo que esta funcionalização concede propriedade antimicrobiana ao têxtil conforme estudos científicos utilizando a estrutura (SHEN *et al.*, 2020).

Para o crescimento microbiano em caldo, o *Trypticase Soy Broth* (Kasvi) foi utilizado, conforme indicação da ASTM E2149-13. Este é um meio de cultura de soja líquido nutritivo de uso geral para cultivo de microrganismos. Já para o cultivo das colônias em placas petri, o ágar MacConkey (Kasvi) foi utilizado.

Uma solução tampão fosfato-salina foi preparada para utilização nos testes com a seguinte composição: 1 mL de solução 0,25 M de Fosfato de Potássio (Synth) em 800 mL de água destilada. Também foi utilizada uma solução 5% do corante Resazurina (Êxodo Científica) nos ensaios.

#### 3.2 Métodos

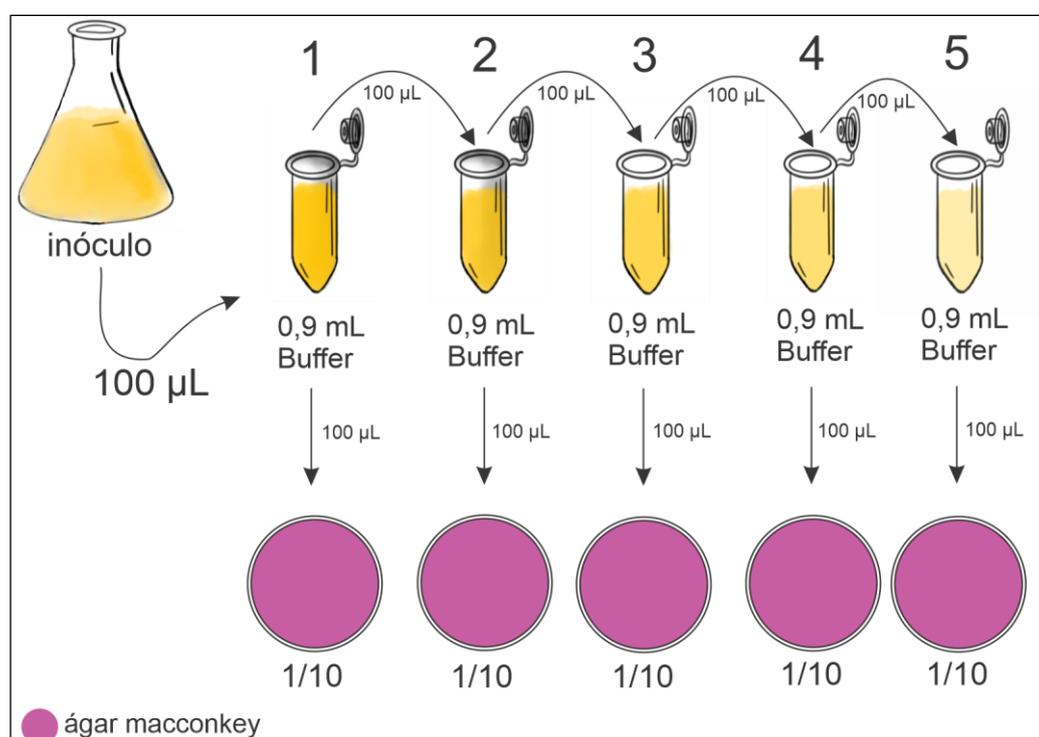
##### 3.2.2 Teste Quantitativo

O substrato funcionalizado foi avaliado mediante a utilização da bactéria *E. coli* ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>™</sup>. Para a preparação da suspensão de microrganismos na concentração correta de UFC's, foi utilizada no teste, uma adaptação da norma ASTM E2149-13. Esta norma traz uma metodologia padrão para determinação de atividade antimicrobiana de agentes antimicrobianos em condições de contato dinâmico e nela é especificado que no comprimento de onda 475 nm a absorção de  $0,28 \pm 0,02$  de uma diluição de cultura de *Escherichia coli* possui uma concentração de  $1,5 - 3,0 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>.

A amostra foi avaliada quantitativamente, para tal, o tecido funcionalizado foi inserido em *erlenmeyer* contendo 50 mL da solução tampão fosfato-salina com a suspensão de microrganismos previamente contados de acordo com a especificação da norma. Os frascos foram incubados por 1 hora em *shaker* a temperatura de 37 °C

e após esse tempo 100  $\mu$ L de cada *erlenmeyer* foi adicionado em *ependorfs* contendo 0,9 mL de solução tampão fosfato-salina e feitos 5 diluições consecutivas, de um *ependorf* ao próximo, sempre misturados em agitador de tubos após cada diluição. Em seguida 100  $\mu$ L de cada *ependorf* foi espalhado em placas petri previamente preparadas com meio *MacConkey*, sendo este seletivo para *E. coli*, e incubadas por um período de 24 horas a 37 °C. O processo é esquematizado na Figura 5.

**Figura 5 - Processo de diluição e emplacamento da solução bacteriana**



**Fonte: Autoria própria (2021)**

O ágar *MacConkey* é utilizado para o cultivo de bactérias gram negativas. Funciona como um meio indicativo, uma vez que possui combinação de sais biliares e o cristal violeta, essa combinação inibe o crescimento de microrganismos gram positivos. Utilizar o meio *MacConkey* torna testes mais fáceis de serem visualizados, uma vez que as bactérias gram-negativas produzem colônias de coloração rosa neste meio, sendo essa uma grande vantagem na sua utilização (LABORCLIN, 2019).

Os resultados expressos como unidades formadoras de colônias CFU/mL, adaptado do método de ensaio ASTM E2149-13. A redução do crescimento microbiano (R) será determinada de acordo com as seguintes equações:

$$R = \frac{(B - A)}{B} * 100 \quad (1)$$

$$\text{Log}_{10} \text{ Redução Bacteriana} = \text{Log}_{10}(B) - \text{Log}_{10}(A) \quad (2)$$

Em que indica o número de UFCs que sobreviveram após o tempo de cultivo (24h) e B o número de UFCs no contato inicial com as amostras (0h). Como resultado consideraram-se as médias de valores obtidos para as amostras de cada variável com contagem de acordo com o método de contagem de placas de agar.

### 3.2.3 Construção de curva de crescimento de *E. coli* ATCC® 25922™ por meio de avaliação indereta por espectrofotometria quantitativamente aceitável

Foi elaborada uma curva de crescimento de microrganismos *E. coli* ATCC® 25922™ separados, inoculados e previamente contados ( $1,5 - 3,0 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) conforme a norma ASTM E2149-13 indica, 50 mL da solução tampão fosfato-salina, e 50 µL de solução de corante Resazurina. A curva foi feita com avaliação por espectrofotometria, onde foram efetuadas 5 leituras com os seguintes tempos: 0, 1, 2, 4 e 6 horas entre inoculação e leitura no espectrofotômetro.

O teste foi realizado em espectrofotômetro UV-VIS para identificar a absorção. A faixa de leitura de 400 a 700 nm e a solução ficou sob agitação e a 37°C entre as leituras em incubação. Então, uma curva relacionando a absorção em cada tempo foi construída e com essa curva, foi determinada uma equação relacionando os diferentes tempos e absorções ao comprimento de onda 572 nm (pico da cor rosa, que relaciona o corante resazurina ao crescimento de bactérias).

Em cada ponto de leitura foram efetuados a incubação em placas de petri contendo meio ágar *MacConkey* e feitas as diluições de acordo com o método quantitativo (Figura 5) para a contagem posterior de unidades formadoras de colônias. Essas placas ficaram em incubação a 37 °C por 24 horas e após as contagens de UFC's foram realizadas. Esse teste foi feito em triplicata. Então, uma última relação entre os diferentes tempos, valor de absorção obtidos no espectrofotômetro e quantidade de colônias nas placas foi efetuada.

### 3.2.3 Utilização e validação da curva de crescimento de crescimento de *E. coli* ATCC® 25922TM por meio de avaliação indireta por espectrofotometria utilizando tecido funcionalizado com estrutura metal-orgânica

Para o teste com o tecido funcionalizado, a mesma metodologia foi empregada, porém com a adição do tecido funcionalizado de medidas 2,5 x 2,5 cm no frasco contendo a suspensão de microrganismos *E. coli* na concentração de  $1,5 - 3,0 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, em 50 mL da solução tampão fosfato-salina e 50 µL de solução de corante Resazurina. As leituras nos seguintes tempos: 0, 1, 2 e 4 horas entre inoculação e leitura no espectrofotômetro. Faixa de leitura também de 400 a 700 nm, porém somente leituras no tempo 0 e 1 hora foram emplacadas no ágar *MacConkey*.

Esses tempos de emplacamento foram escolhidos para a comparação com o teste quantitativo da seção 3.2.1 que foram feitos nesses tempos, de acordo com a norma. Após o emplacamento, também foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Então os valores de absorção obtidos e o número de colônias observados após as 24 horas de incubação, foram comparados aos números da curva de *E. coli* construída anteriormente.

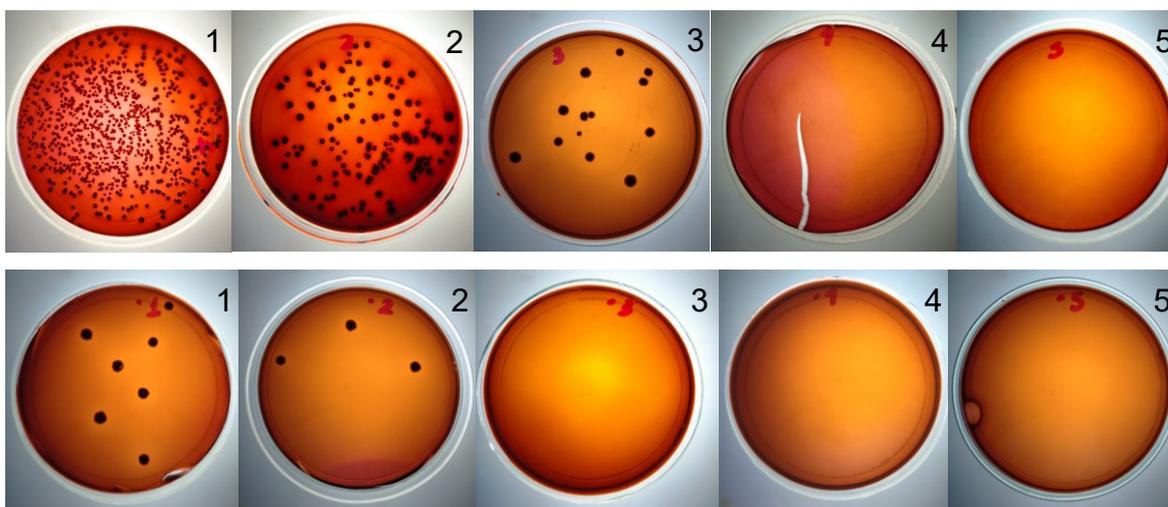
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Avaliação microbiológica dos substratos têxteis

#### 4.1.1 Teste Quantitativo

Na Figura 6 é apresentado os resultados após as 24 horas de incubação das placas onde é possível observar a maior quantidade de unidades formadoras de colônias nas primeiras placas. As placas acima (Figura 6) são referentes ao controle, onde não foi inserido ao sistema o tecido funcionalizado com estrutura metal-orgânica contendo cobre em sua composição e abaixo são referentes ao processo em que houve a inserção do substrato funcionalizado.

**Figura 6 - Crescimento de colônias de *E. coli* do teste quantitativo em ágar *MacConkey*. Acima placas do controle e abaixo são referentes ao tecido funcionalizado**



Fonte: Autoria própria (2021)

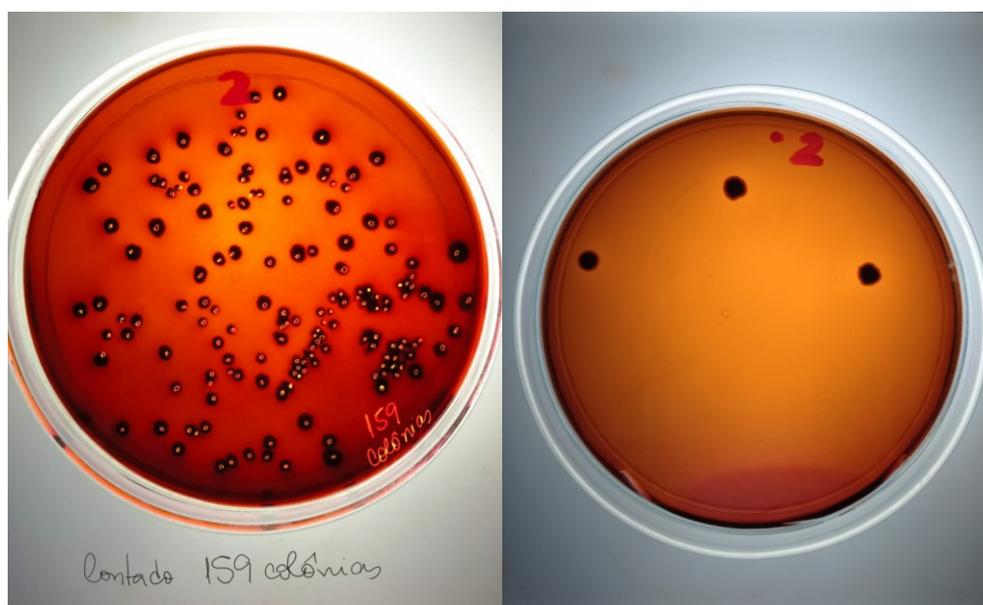
Para ser feita a quantificação de redução de colônias, é necessário escolher uma placa onde seja possível a contagem tanto da placa controle, como na placa que teve o contato com o tecido funcionalizado. De acordo com a imagem acima, estabeleceu-se a placa de diluição número 2 para a contagem.

O teste partiu da suspensão de microrganismos *E. coli* separados, inoculados e previamente na concentração de  $1,5 - 3,0 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, 0,5 mc farland inseridos em 50 mL de solução tampão fosfato-salina. A concentração inicial desta solução

parte de 1,5 – 3,0 . Para a placa número 1, a diluição é de 1:10 (um para dez), já a número 2, 1:100 (um para cem).

Na Figura 7, podemos observar a placa de diluição número 2, onde foram contadas 159 unidades formadoras de colônia para a placa controle e 3 UFC's para a placa do tecido funcionalizado com estrutura metal-orgânica contendo cobre em sua composição. Isso representa uma concentração inicial de microrganismos de  $1,59 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>, enquanto que a amostra testada, após o contato dinâmico com essa quantidade de bactérias apresentou uma concentração de microrganismos de  $0,3 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>.

**Figura 7 – Comparação entre petris de diluição número 2 do teste quantitativo. À esquerda controle e à direita em relação ao tecido funcionalizado com agente antimicrobiano**



**Fonte: Autoria própria (2021)**

A redução em porcentagem, de acordo com a equação (1), foi de 98,11%, e a redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) de acordo com a equação (2) foi de 1,72, que remete a uma redução entre 90 e 99% (ENDUROCID, 2017; ALTAPURE, 2021). Os autores Heliopoulos *et al.* (2013) estudaram o efeito antimicrobiano de um tecido de lã funcionalizado com cobre e obtiveram 91,3% de redução de *E. coli* em 1 hora de contato e 100% após 24 horas.

Outro estudo (RADETIĆ, MARKOVIĆ, 2019), envolvendo têxteis funcionalizados com cobre, obtiveram 99,9% de redução de colônias em contato com *E. coli*. Ou ainda têxteis com estruturas metal-orgânica processados em síntese direta

com tecido de poliéster (EMAM; DARWESH; ABDELHAMEED, 2018), tecido de lã (LIS *et al.*, 2019) e de algodão (RUBIN; NEUFELD; REYNOLDS, 2018), utilizando o cobre como metal, obtiveram atividades antimicrobianas comprovadas. Dessa forma, é evidente que a funcionalização de diferentes tipos de fibras com estruturas metal-orgânica utilizando o cobre, agrega e garante comportamento antimicrobiano aos substratos.

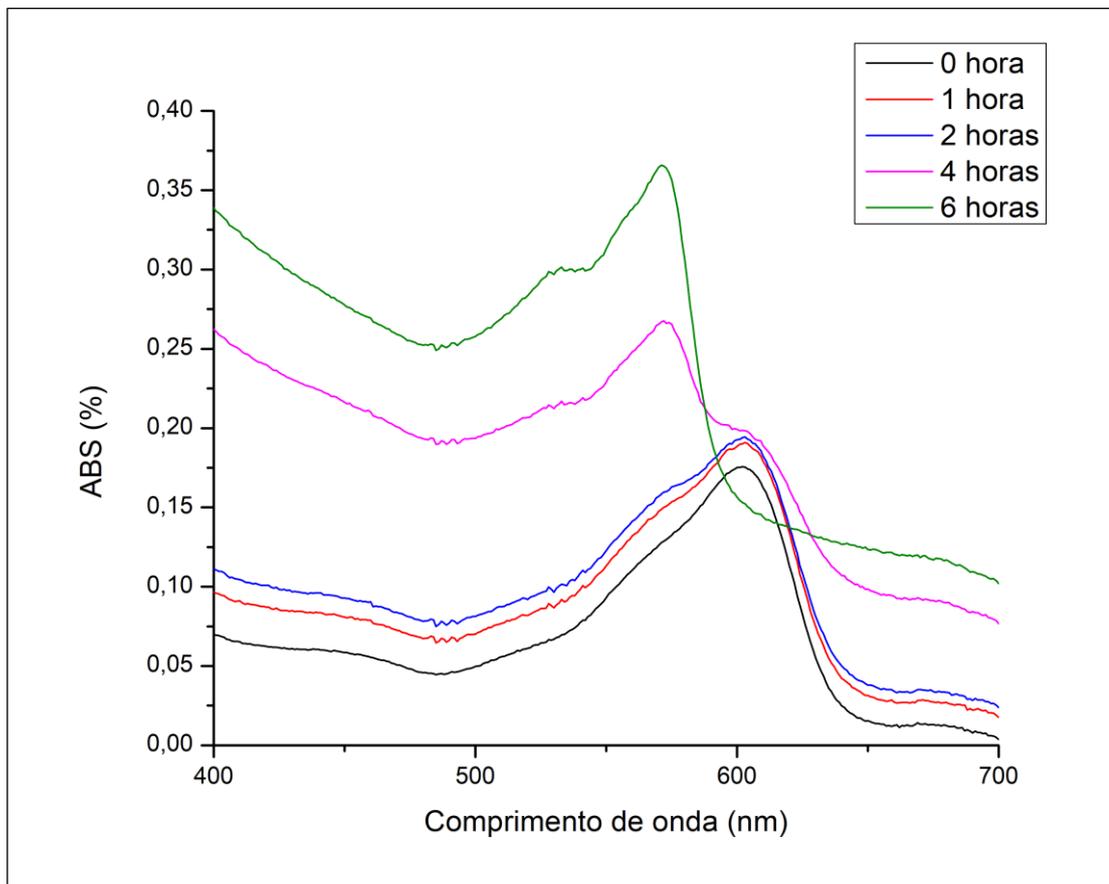
#### 4.1.2 Construção de curva de crescimento de *E. coli* ATCC® 25922™ por meio de avaliação indireta por espectrofotometria quantitativamente aceitável

Na Figura 8 é apresentada as 7 leituras no espectrofotômetro da solução com os seguintes tempos: 0, 1, 2, 4 e 6 horas entre inoculação e leitura. Neste gráfico podemos observar que houve um deslocamento do pico de cor das leituras, no decorrer do tempo. Isto ocorre, pois, o corante indicador utilizado para cultura de microrganismos, muda sua coloração conforme células vão crescendo.

Assim, devido a propriedade redutora que o crescimento de microrganismos possui, a resazurina (corante em sua forma oxidada) passa a ser resorufina, sua forma reduzida (O'BRIEN, 2000). Essa mudança pode ser vista na Figura 9, em que é apresentada a solução no tempo zero a esquerda, e a direita, no tempo 6 horas. Nota se que a solução modificou da cor azul para cor rosa e isto foi comprovado na varredura de 400 a 700 nm, como mostra a Figura 8 (BORRA *et al.*, 2009; ELSHIKH *et al.*, 2016).

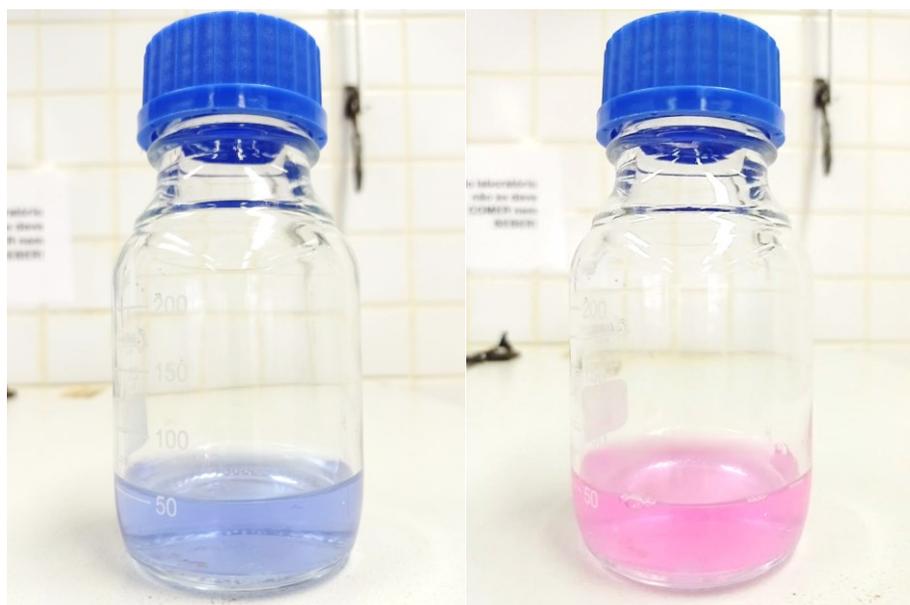
Ainda de acordo com o gráfico obtido, optou-se por escolher o pico da curva 6 horas (572 nm), onde o rosa é mais evidente e isso nos indica um maior crescimento microbiano (ALI-VEHMAS, LOUHI, SANDHOLM, 1991; PATIL *et al.*, 2014), para relacionar o valor da absorção com o comprimento de onda de 572 nm e construir uma equação com todos os pontos de leitura.

**Figura 8 – Leitura de absorção da solução bacteriana nos diferentes tempos em espectrofotômetro**



Fonte: Autoria própria (2021)

**Figura 9 – Diferença entre o tempo zero (esquerda) e 6 horas (direita) na solução bacteriana com resazurina**



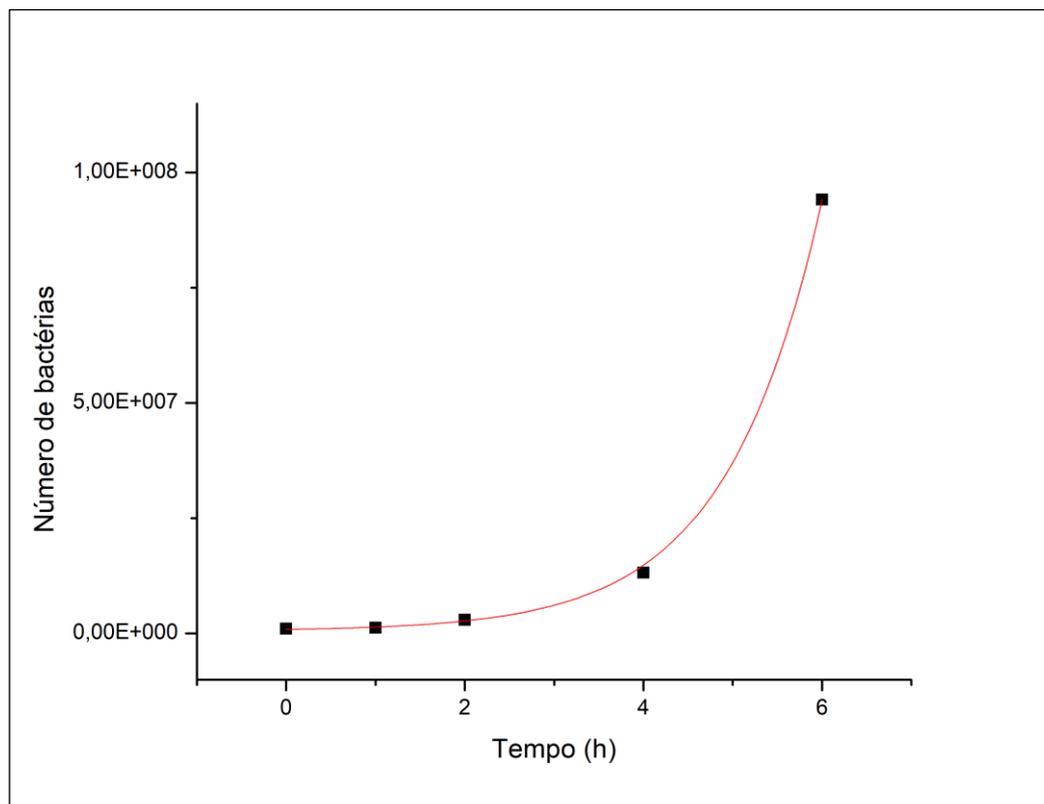
Fonte: Autoria própria (2021)

Na Tabela 1 é apresentada a quantidade de bactérias a partir das contagens de colônias das placas incubadas nos tempos: 0, 1, 2, 4 e 6 horas. Na Figura 10 é apresentada o comportamento de crescimento das bactérias em relação ao tempo utilizando os valores médios. Esses valores eram esperados pois, o crescimento de *E. coli* ATCC® 25922™ nas primeiras horas, pode ser descrito como exponencial, mas depois de algumas horas, as células entram em fase estacionária, devido aos limitantes do meio em que estão inseridas, e após, fase de morte (BOLLENCAH, 2018; COOPER, 2006)

**Tabela 1 - Quantidade de bactérias em relação ao tempo**

<b>Tempo (h)</b>	<b>1º teste (nº bactérias)</b>	<b>2º teste (nº bactérias)</b>	<b>3º teste (nº bactérias)</b>	<b>Média (nº bactérias)</b>	<b>Erro experimental</b>
0	$1,00 \times 10^5$	$1,84 \times 10^6$	$1,19 \times 10^6$	$1,04 \times 10^6$	$5,08 \times 10^5$
1	$6,40 \times 10^5$	$1,65 \times 10^6$	$1,57 \times 10^6$	$1,29 \times 10^6$	$3,24 \times 10^5$
2	$1,75 \times 10^6$	$3,53 \times 10^6$	$3,53 \times 10^6$	$2,94 \times 10^6$	$5,93 \times 10^5$
4	$2,47 \times 10^7$	$8,00 \times 10^6$	$7,00 \times 10^6$	$1,32 \times 10^7$	$5,74 \times 10^6$
6	$9,20 \times 10^7$	$9,83 \times 10^7$	$9,21 \times 10^7$	$9,41 \times 10^7$	$2,08 \times 10^6$

**Fonte: Autoria própria (2021)**

**Figura 10 - Comportamento de crescimento das bactérias em relação ao tempo**

**Fonte: Autoria própria (2021)**

Como podemos observar na figura 10, o ajuste do crescimento foi exponencial, uma vez que o método foi até a hora 6 de leitura, não estudando completamente a fase estacionária e de morte de comportamento bacteriano. Os autores Ramírez *et al.* (2005) apresentam em seus estudos que entre 4 e 5 horas o crescimento de *E. coli* ATCC® 25922™ começa sua fase estacionária pois os nutrientes do meio começam a se esgotar. Não foi possível relacionar totalmente com os autores pois aqui não foi explorado totalmente a fase estacionária e de morte.

Com os valores do crescimento do número de bactérias em relação ao tempo, foi possível relacionar esses valores com a absorbância colhida em cada horário no espectrofotômetro. Os valores são apresentados na Tabela 2 com os erros experimentais, uma vez que o teste foi feito em triplicata.

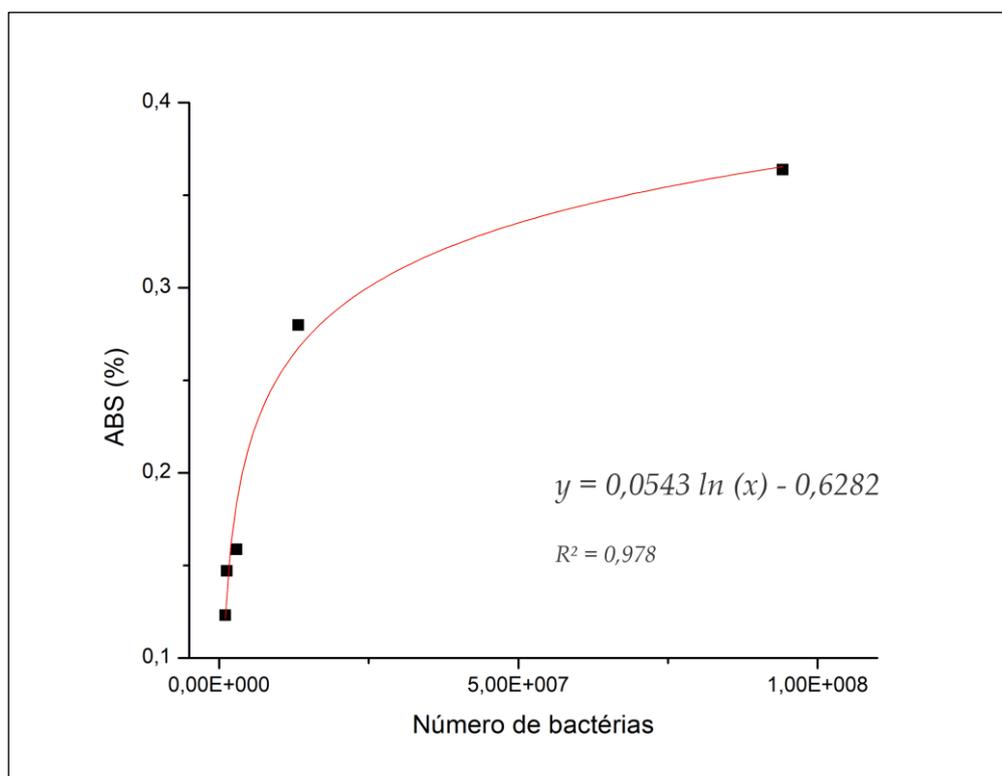
Tabela 2 - Relação entre número médio de bactérias e média de absorvância

Tempo (h)	Méd. abs (%)	Erro exp. abs	Méd. nº bac.
0	0,12308	0,00551	1,04 x 10 <sup>6</sup>
1	0,14704	0,00304	1,29 x 10 <sup>6</sup>
2	0,15868	0,00103	2,94 x 10 <sup>6</sup>
4	0,27973	0,01201	13,2 x 10 <sup>6</sup>
6	0,36369	0,00160	94,1 x 10 <sup>6</sup>

Fonte: Autoria própria (2021)

Agora, com os valores de absorvância e número de bactérias relacionados, é possível a construção de um gráfico ajustado relacionando esses valores, os quais são apresentados na Figura 11. Com a utilização da função que descreve o comportamento ABS x nº de bactérias, é possível aproximar a quantidade de bactérias de uma solução de inóculo nas condições estabelecidas com esse método utilizando o valor de absorvância no comprimento de onda de 572 nm.

Figura 11 – Comportamento de crescimento do número de bactérias em relação a absorvância



Fonte: Autoria própria (2021)

Este é classificado como método de leitura indireta, sendo desenvolvido para a determinação de um ponto ótimo qualitativamente confiável a partir de comparação com métodos quantitativos para amostras funcionalizadas. O objetivo aqui alcançado foi a proposição desse método intermediário para testes quantitativos na seleção de amostras que se mostrem viáveis, reduzindo tempo e custos de análise antimicrobiana quantitativa.

#### 4.1.2 Utilização e validação da curva de crescimento de crescimento de *E. coli* ATCC® 25922™ por meio de avaliação indireta por espectrofotometria utilizando tecido funcionalizado com estrutura metal-orgânica

Na Tabela 3 é apresentado os valores de absorvância e o erro experimental, uma vez que o teste foi feito em duplicata, colhidas para o tecido funcionalizado com estrutura metal-orgânica contendo cobre em sua composição, imerso em solução microbiana de acordo com o método. De acordo com os autores Yang *et al.* (2018) e Guo *et al.* (2012), essas estruturas contendo metais de transição em sua composição, tais como prata, cobre e zinco, são capazes de inibir ou matar microorganismos e podem ser denominados como materiais antibacterianos químicos.

**Tabela 3 – Média de absorvância da solução contendo tecido funcionalizado com agente antimicrobiano em relação ao tempo**

Tempo (h)	Méd. abs (%)	Erro exp. abs
0	0,13934	0,00907
1	0,16366	0,00348
2	0,16685	0,00264
4	0,15394	0,00115

**Fonte: Autoria própria (2021)**

Com a utilização da equação da Figura 11 ( $y = 0,0543 \ln(x) - 0,6282$ ), em que y é o valor da absorvância e x o número aproximado de bactérias, é possível estimar a quantidade de bactérias na solução com o valor de cada absorção colhida e os valores são apresentados na Tabela 4. Ainda, é apresentado o percentual de redução

obtido, de acordo com a equação 1 em relação a média do número de bactérias da tabela 2 no horário 4 horas, uma vez que para os horários anteriores, de acordo com o método aproximado, não obteve-se redução. Isso pode ter ocorrido em razão do erro do método para as primeiras horas, que deve ser melhor explorado.

**Tabela 4 - Valor aproximado de bactérias pelo método e % de redução indicado pelo método**

Tempo (h)	Valor aproximado do nº de bactérias	Redução (%)
0	$3,7 \times 10^6$	-
1	$5,8 \times 10^6$	-
2	$6,1 \times 10^6$	-
4	$4,8 \times 10^6$	63,63

**Fonte: Autoria própria (2021)**

Já os dados do teste de contagem de colônias em placas nos tempos 0 hora e 1 hora estão dispostos na tabela 5. Esses tempos de emplacamento foram escolhidos para a comparação com o teste quantitativo da seção 4.1.1 que foram feitos nesses tempos, de acordo com a norma.

**Tabela 5 - Média do número de bactérias por contagem em placa nos horários 0 e 1 hora**

Tempo (h)	Méd nº bac	Erro exp
0	$1,76 \times 10^6$	$2,45 \times 10^1$
1	$9,45 \times 10^4$	$6,68 \times 10^1$

**Fonte: Autoria própria (2021)**

Utilizando a equação 1 novamente com os valores da Tabela 5, chegamos em uma redução de 94,63 % de atividade bacteriana e a redução logarítmica de acordo com a equação (2) foi de 1,27, que remete a uma redução acima de 90%. Como vimos na seção 4.1.1, no teste quantitativo adaptado da norma, a redução foi de 98,11 %. Os valores de contagem de placa ficaram bem próximos, todavia pelo método indireto de espectrofotometria só foi possível obter um indicativo de redução após 4 horas do tecido imerso em solução bacteriana com *E. coli*.

Este método então nos indica que pode ser utilizado para seleção de amostras viáveis de forma qualitativamente aceitável, uma vez que com a utilização do corante resazurina na solução, após 4 horas já fica evidente a olho nu se a amostra possui alguma atividade antimicrobiana devido ao efeito redutor que as bactérias causam em seu crescimento nesse corante indicador. Ainda com esse método, uma leitura da solução em espectrofotômetro no comprimento de onda 572 nm, após 4 horas, fornece uma estimativa quantitativa de percentual de redução microbiana.

## 5 CONCLUSÕES

Os têxteis em geral são reconhecidos por serem suscetíveis ao ataque de microrganismos, podendo trazer inúmeros malefícios aos seres humanos. Dessa forma faz-se necessário a indústria têxtil o desenvolvimento de artigos com propriedades antimicrobianas no intuito de diminuir esses diversos problemas.

Para avaliação e determinação se um tecido possui tal atividade, fazem necessárias algumas análises microbiológicas de acordo com normas preestabelecidas. Estes testes costumam utilizar diversos recursos e tempo para avaliação de uma única amostra, tornando essas análises com custos elevados.

Dessa maneira, o presente trabalho teve o objetivo na possível simplificação desses testes para seleção de amostras viáveis que já se demonstram antibacterianas de forma mais rápida com menos recursos.

O desenvolvimento do método se baseou nas normas já existentes e utilização do corante resazurina (que possui coloração azul) para criação de uma relação entre cor e quantidade aproximada de microrganismos em uma solução, uma vez que o crescimento bacteriano causam redução neste corante, que passa a ser resorufina, de coloração rosa.

Com o desenvolvimento do método ficou evidente a mudança de coloração nas soluções contendo o corante com a utilização de *E. coli* ATCC® 25922™. Ainda uma relação de intensidade da absorbância e o número de bactérias em solução foi feita confrontando dados de contagem em placas e valor da absorbância em 572 nm (pico da cor rosa).

Foi possível obter um novo método na avaliação e seleção de amostras têxteis com potenciais antimicrobianos. Por exemplo, quando há muitas amostras para se avaliar, devido a um planejamento experimental, é demandado muito tempo e recurso para essas análises de acordo com as normas atuais e este novo método proposto pode ajudar nessas análises diminuindo consideravelmente a quantidade de ensaios, uma vez que é possível visualizar quais amostras possuem efeito antimicrobiano e ainda estimar uma redução prévia. Com a utilização desse método, após 4 horas de contato, foi possível obter uma estimativa de 63,63% de redução microbiana.

Para trabalhos futuros é necessário ajustar a acuracidade do método, aumentando o número de análises, tempos avaliados e diferentes tipos de tecidos com acabamentos antimicrobianos, bem como estudar melhor o comportamento de

crescimento de *E. coli* ATCC® 25922™ em tempos maiores, investigando assim sua fase estacionária e de morte.

## REFERÊNCIAS

ABIT, Associação Brasileira da Industria Têxtil -. **Perfil do Setor**. 2020. Disponível em: <<https://www.abit.org.br/cont/perfil-do-setor>>. Acesso em: 12 de janeiro de 2021.

ALI-VEHMAS, T., LOUHI, M. SANDHOLM, M. (1991), Automation of the Resazurin Reduction Test using Fluorometry of Microtitration Trays. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 38: 358-372. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1991.tb00883.x>

ALTAPURE. **Log Reduction & Log Kill**. Disponível em: <https://altapure.com/log-reduction/>. Acesso em: 12 jan. 2021.

ASTM E2149-13a, Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2013, [www.astm.org](http://www.astm.org)

BAUER, A. W. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **American Journal Of Clinical Pathology**. [s. L.], p. 493-496. abr. 1966.

BERTRAND, J. C. *et al.* Prokaryote/Eukaryote Dichotomy and Bacteria/Archaea/Eukarya Domains: Two Inseparable Concepts. In: BERTRAND, Jean-claude *et al.* **Prokaryotes and Evolution**. Cham: Springer Nature Switzerland Ag, 2018. Cap. 1. p. 1-21.

BOLLENBACH, T.. Exponential growth and bacterial growth laws. **University Of Cologne**. Colônia (Alemanha), p. 1-10. 9 ago. 2018. Disponível em: [https://apcmbp.uni-koeln.de/sites/biophyspraktikum/exp\\_growth\\_cell\\_size.pdf](https://apcmbp.uni-koeln.de/sites/biophyspraktikum/exp_growth_cell_size.pdf). Acesso em: 01 mar. 2021.

BOLSOVER, S. R. *et al.* **Cell Biology: A short Course**. 2. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Ltd, 2004. 535 p.

BORRA, R. C. *et al.* A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. **Brazilian Oral Research**, [S.L.], v. 23, n. 3, p. 255-262, set. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1806-83242009000300006>.

BROOKS, G. F. *et al.* **Medical Microbiology**. 26. ed. New York: Mcgraw-hill Companies, 2013. 874 p.

COOPER S. Distinguishing between linear and exponential cell growth during the division cycle: single-cell studies, cell-culture studies, and the object of cell-cycle research. *Theor Biol Med Model*. 2006;3:10. Published 2006 Feb 23. doi:10.1186/1742-4682-3-10

ELSHIKH, M. *et al.* Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnology Letters**, [S.L.], v. 38, n. 6, p. 1015-1019, 11 mar. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-016-2079-2>.

EMAM, H. E.; DARWESH, O. M.; ABDELHAMEED, R. M. In-growth metal organic framework/synthetic hybrids as antimicrobial fabrics and its toxicity. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [S.L.], v. 165, p. 219-228, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.02.028>.

ENDUROCID. **Log Reductions – a Beginner’s Guide**: what are ‘log reductions’ and why are they important. What are ‘Log Reductions’ and why are they important.. 2017. Disponível em: <https://www.endurocide.com/knowledge-base/blogs/log-reductions-a-beginners-guide-2/>. Acesso em: 12 jan. 2021.

ESTEVEZ, D. F. **Aperfeiçoamento das técnicas de avaliação da actividade antimicrobiana em materiais têxteis**. 2009. 121 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Têxtil, Universidade da Beira Interior, Covilha, 2009.

GAO, Y; CRANSTON, R. Recent Advances in Antimicrobial Treatments of Textiles. **Textile Research Journal**. Los Angeles, p. 60-72. jan. 2008.

GUO, Y. F.; FANG, W. J. J.; FU, R. Facile synthesis of Ag@ZIF-8 core-shell heterostructure nanowires for improved antibacterial activities. **Appl. Surf. Sci.** ed. 435, p.149–155, 2018.

JUNG, S. *et al.* Copper-Coated Polypropylene Filter Face Mask with SARS-CoV-2 Antiviral Ability. **Polymers**, [S.L.], v. 13, n. 9, p. 1367, 22 abr. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/polym13091367>.

KAYSER, F. H.; BIENZ, K. A.; ECKERT, J. **Medical Microbiology**. Leipzig: Thieme, 2005. 698 p.

LABORCLIN. **Ágar MacConkey**. 2019. Disponível em: <https://www.laborclin.com.br/agar-macconkey-o-mais-antigo-e-eficiente-meio-de-cultura-para-bacterias/>. Acesso em: 01 mar. 2021.

LAYNE, S. P. *et al.* New coronavirus outbreak: framing questions for pandemic prevention. **Science Translational Medicine**, [S.L.], v. 12, n. 534, p. 1-2, 11 mar. 2020. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.abb1469>.

LIS, M. J. *et al.* In-Situ Direct Synthesis of HKUST-1 in Wool Fabric for the Improvement of Antibacterial Properties. **Polymers**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 713, 19 abr. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/polym11040713>.

MADIGAN, M. T. *et al.* **MICROBIOLOGIA DE BROCK**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 987 p.

MAO, N. Textile Materials for Protective Textiles. In: PAUL, Roshan. **High Performance Technical Textiles**. [s. L.]: John Wiley & Sons, 2019. Cap. 5. p. 107-157.

MATOS, J. F. V. **Desenvolvimento de materiais têxteis com propriedades antimicrobianas para revestimento de calçado**. 2014. 105 f. Dissertação

(Mestrado) - Curso de Design e Marketing, Universidade do Minho, Guimarães, 2014.

MONTICELLO, R. A.; WHITE, W. C.; VANDENDAELE, P. A Comparison of Antimicrobials for the Textile Industry. **International Nonwovens Journal: A Science and Technology Publication**. Atlanta, p. 38-43. mar. 2002.

HELIOPOULOS, N. *et al.* Effect of copper and copper alginate treatment on wool fabric. Study of textile and antibacterial properties. **Surface And Coatings Technology**, [S.L.], v. 235, p. 24-31, nov. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.surfcoat.2013.07.009>.

O'BRIEN, J. *et al.* Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal Of Biochemistry**, [S.L.], v. 267, n. 17, p. 5421-5426, set. 2000. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>.

PATIL, S. *et al.* Resazurin tube method: rapid, simple, and inexpensive method for detection of drug resistance in the clinical isolates of mycobacterium tuberculosis. **Journal Of Global Infectious Diseases**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 151, 2014. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0974-777x.145239>.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiology**. 5. ed. New Delhi: McGraw-hill Education, 1993. 918 p.

PRATHER, K. A.; WANG, C. C.; SCHOOLEY, R. T. Reducing transmission of SARS-CoV-2. **Science**, [S.L.], v. 368, n. 6498, p. 1422-1424, 27 maio 2020. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.abc6197>.

PURWAR, R.; JOSHI, M. Recent Developments in Antimicrobial Finishing of Textiles – A Review. **AATCC**. [s. L.], p. 22-26. fev. 2004

PURWAR, Roli. Antimicrobial textiles. In: SHAHID-UL-ISLAM; BUTOLA, B.s. **The Impact and Prospects of Green Chemistry for Textile Technology**. [s. L.]: Elsevier, 2019. Cap. 10. p. 281-306.

QIN, Y. Antimicrobial textile dressings to manage wound infection. In: RAJENDRAN, S. **Advanced Textiles for Wound Care**. 2. ed. [s. L.]: Elsevier, 2019. Cap. 7. p. 193-210.

RADETIĆ, M., MARKOVIĆ, D. Nano-finishing of cellulose textile materials with copper and copper oxide nanoparticles. **Cellulose** **26**, 8971–8991 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02714-4>

RELVA, A. S. P. **Determinação da capacidade antibacteriana de extratos de plantas encapsulados em substratos têxteis**. 2012. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Departamento de Engenharia Química e Biológica, Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, Coimbra, 2012.

RISTIĆ, T. *et al.* Antimicrobial efficiency of functionalized cellulose fibres as potential medical textiles. In: MÉNDEZ-VILAS, A. **Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances.** [s. L.]: Badajoz: Formatex Research Center, 2011. p. 36-51.

RUBIN, H. N.; NEUFELD, B. H.; REYNOLDS, M. M. Surface-Anchored Metal–Organic Framework–Cotton Material for Tunable Antibacterial Copper Delivery. **ACS Applied Materials & Interfaces**, [S.L.], v. 10, n. 17, p. 15189-15199, 11 abr. 2018. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsami.7b19455>.

SANTOS, J. R.; FERRAT, G. C.; EICHELMANN, M. C. G. La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. **Rev. Latinoam. Microbiol**, v. 47, n. 3-4, p. 92-101, 2005.

SEJAS, L. M. *et al.* Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, p. 27-35. jan. 2003.

SEZGIN, E. *et al.* The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. London, p. 361-374. jun. 2017.

SHEN, M. *et al.* “Antibacterial Applications of Metal–Organic Frameworks and Their Composites”. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, vol. 19, nº 4, julho de 2020, p. 1397–419. DOI.org (Crossref), doi:10.1111/1541-4337.12515.

TEUFEL, L. *et al.* Material-dependent growth of human skin bacteria on textiles investigated using challenge tests and DNA genotyping. **Journal Of Applied Microbiology**. [s. L.], p. 450-461. fev. 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894 p.

UDDIN, F. Environmental Concerns in Antimicrobial Finishing of Textiles. **International Journal Of Textile Science**. [s. L.], p. 15-20. jan. 2014.

UFJF, Universidade Federal de Juiz de Fora -. **SCIH - Serviço de Controle de Infecção Hospitalar**. 2019. Disponível em: <<http://www2.ebserh.gov.br/web/hu-ufjf/servico-de-controle-de-infeccao-hospitalar>>. Acesso em: 10 maio 2019.  
VERMELHO, A. B. *et al.* **PRÁTICAS DE MICROBIOLOGIA**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 256 p.

YANG, Z. *et al.* Facile synthesis of Cu-BDC/Poly(N-methylol acrylamide) HIPE monoliths via CO<sub>2</sub>-in-water Emulsion stabilized by metal-organic framework. **Polymer**, [s.l.], v. 153, p.17-23, set. 2018. Elsevier BV.