

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA

Michaela Coradi

**TÊXTEIS ANTIMICROBIANOS PRODUZIDOS PELA
MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DE TECIDOS DE ALGODÃO E
IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA PECTINOLÍTICA**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Selene M. A. Guelli Ulson de Souza

Coorientadora: Prof^a. Dr^a Débora de Oliveira

Florianópolis – SC
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Coradi, Michaela

Têxteis antimicrobianos produzidos pela modificação superficial de tecidos de algodão e imobilização de enzima pectinolítica / Michaela Coradi ; orientador, Antônio Augusto Ulson de Souza, orientador, Selene M. de A. Guelli Ulson de Souza, coorientador, Débora de Oliveira Oliveira, 2018.

115 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Têxteis antimicrobianos. 3. Enzimas antimicrobianas. 4. Imobilização enzimática. 5. Tecnologia sustentável. I. Souza, Antônio Augusto Ulson de . II. Souza, Selene M. de A. Guelli Ulson de . III. Oliveira, Débora de Oliveira. IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. V. Título.

Michaela Coradi

Têxteis antimicrobianos produzidos pela modificação superficial de tecidos de algodão e imobilização de enzima pectinolítica

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Engenharia Química, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 28 de maio de 2018.

Profa. Dra. Cíntia Soares
Coordenadora do Curso

Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza
Orientador

Prof.^a Dr.^a Selene M. de A. Guelli Ulson de Souza
Coorientadora

Prof.^a Dr.^a Débora de Oliveira
Coorientadora

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago

Profa. Dr.^a Cristiane da Costa Bresolin

Dr.^a Alessandra Valério

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores, os professores Antônio Augusto Ulson de Souza, Débora de Oliveira e Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de Souza, pela confiança em mim depositada, por não medirem esforços para a realização deste trabalho e por estarem sempre dispostos a compartilhar seus conhecimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão da bolsa e taxa de bancada.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da UFSC e ao Labsin/Labmassa, pela oportunidade e infraestrutura concedida.

Ao projeto *Electrospun Nanofibers Smart Textile Products for Industry Innovation*. Edital Chamada n. 71/2013 - MEC/MCTI/CAPES/CNPq/FAPs, Processo: 407369/2013-9, pela infraestrutura laboratorial disponibilizada para a realização do presente trabalho.

Aos pesquisadores e colegas Alexsandra Valério e Luis Antonio Lourenço, pelo suporte, sugestões na execução do trabalho e no planejamento experimental. A todos os demais colegas do grupo Labsin/Labmassa, pela amizade e por se mostrarem sempre prestativos.

A Unochapecó, pela disponibilização da infraestrutura do Laboratório de Microbiologia de Alimentos para a realização dos ensaios microbiológicos.

Às professoras Micheli Zanetti e Raquel Zeni Ternus, por suas imprescindíveis contribuições e às colegas Ana Paula Capelezzo, Laura Cassol Mohr e Mariane Coppini, pelo grande auxílio na execução destas análises.

E a todos que, embora não citados, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*Os únicos limites das nossas realizações
de amanhã são as nossas dúvidas e hesitações
de hoje.*

Franklin Roosevelt
(1882-1945)

RESUMO

Os têxteis incorporados com compostos antimicrobianos são utilizados para prevenir ou inibir o crescimento de microrganismos, podendo ser aplicados em diferentes segmentos como na área médica, roupas hospitalares, filtros, roupa íntima, entre outros, dependendo da atividade biostática ou biocida do composto antimicrobiano utilizado. O aumento da resistência dos microrganismos aos antibióticos já conhecidos tem estimulado a busca por novos compostos de origem natural, biodegradáveis e não tóxicos, tornando o uso de enzimas antimicrobianas uma alternativa promissora a ser investigada. Arelado a isto, produtos à base de celulose têm sido extensivamente estudados como suporte para enzimas devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, estabilização química e baixo risco de contaminação ao ambiente. A proposta deste trabalho é imobilizar enzima antimicrobiana em tecido de algodão quimicamente modificado, via reação com periodato, através de ligação covalente e via adsorção. Os ensaios qualitativos de difusão em ágar e quantitativos de Concentração Inibitória Mínima (CIM) demonstraram que os dois preparados enzimáticos estudados, Bioprep® 3000L e Termamyl® 2X, apresentaram atividade antimicrobiana para os microrganismos investigados, sendo que o primeiro apresenta maior atividade antimicrobiana comparativamente ao segundo, sendo classificado como muito ativo para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, e parcialmente ativo para *Pseudomonas aeruginosa*. Os substratos têxteis com enzima imobilizada por adsorção e por ligação covalente apresentaram 60% de atividade enzimática recuperada após 30 dias de armazenamento. A enzima imobilizada por adsorção apresentou atividade antimicrobiana insuficiente, isto possivelmente porque a concentração de enzima no tecido imobilizada por adsorção, após o processo de lavagem, foi inferior à CIM da enzima livre, devido à lixiviação. O produto têxtil com enzima imobilizada por ligação covalente apresentou zona de inibição, caracterizando atividade antimicrobiana para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* durante um período de 21 dias de armazenamento, podendo ser aplicado para fins biostáticos. Os resultados deste trabalho são promissores para o desenvolvimento de tecnologia sustentável para a produção de têxteis antimicrobianos, aumentando o valor agregado dos produtos e possibilitando novos nichos de mercado para os produtos têxteis.

Palavras-chave: Têxteis antimicrobianos. Enzimas antimicrobianas. Imobilização enzimática. Tecnologia sustentável.

ABSTRACT

Textiles incorporated with antimicrobial compounds are used to prevent or inactivate the microorganisms' growth and can be applied in different segments such as medical, hospital clothing, filters, underwear and others, depending on the biostatic or biocidal activity of the antimicrobial compound used. Increasing the microorganisms' resistance to known antibiotics has stimulated the search for new compounds of natural origin, biodegradable and non-toxic, making the use of antimicrobial enzymes a promising alternative to be investigated. Products made by cellulose have been extensively studied as a support for enzymes due to their biocompatibility, biodegradability, chemical stabilization and low contamination risk to the environment. The purpose of this work is to immobilize antimicrobial enzyme in chemically modified cotton fabric by periodate reaction, through covalent binding, and by adsorption. The qualitative agar diffusion and quantitative Minimum Inhibitory Concentration (MIC) assays showed that there is antimicrobial activity for the microorganisms investigated, and that the enzyme preparation Bioprep® 3000L has a higher antimicrobial activity against the enzyme preparation Termamyl® 2X, being classified as very active for *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*, and partially active for *Pseudomonas aeruginosa*. Fabrics with enzyme immobilized by adsorption and by covalent binding presented 60% of enzymatic activity recovered after 30 days of storage. The enzyme immobilized by adsorption showed insufficient antimicrobial activity, possibly because the immobilized enzyme concentration in the fabrics by adsorption after the washing process was lower than the MIC of the free enzyme due to leaching. The textile product with enzyme immobilized by covalent bonding showed zone of inhibition, characterizing antimicrobial activity for *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* during a period of 21 days of storage, being able to be applied for biostatic purposes and providing subsidies for the development of sustainable technology for the production of antimicrobial textiles. This type of treatment can increase the market value of textiles products, meet the technical requirements and extend the maintenance capacity of various textile products.

Keywords: Antimicrobial textiles. Antimicrobial enzymes. Enzyme immobilization. Sustainable technology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Comparação da estrutura das paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.	38
Figura 2 – Funcionalização da celulose através da esterificação com glicina.	47
Figura 3 – Funcionalização da celulose através da adição de grupo epóxi.	48
Figura 4 – Funcionalização da celulose através da oxidação com periodato.	49
Figura 5 – Avaliação da atividade antimicrobiana através do método de difusão em ágar.	65
Figura 6 – Resultados dos testes de difusão em ágar para o extrato amilolítico para diferentes microrganismos.	69
Figura 7 – Resultados dos testes de difusão em ágar para o extrato pectinolítico para diferentes microrganismos.	70
Figura 8 – Diâmetro médio de inibição das enzimas para diferentes microrganismos.	71
Figura 9 – Concentração inibitória mínima de extrato enzimático para diferentes microrganismos.	71
Figura 10 – Consumo de periodato de sódio durante a oxidação do tecido de algodão.	74
Figura 11 – Espectros FTIR para o substrato de algodão sem tratamento.	76
Figura 12 – Espectros FTIR comparando o substrato de algodão antes e após o tratamento com periodato.	77
Figura 13 – Curvas DSC do substrato de algodão.	78
Figura 14 – Teste de Fehling para a confirmação da funcionalização do substrato.	79
Figura 15 – Gráfico de Pareto dos parâmetros avaliados durante a imobilização por adsorção.	82
Figura 16 – Gráfico de contorno para o processo de imobilização por adsorção.	82
Figura 17 – Gráfico de Pareto dos parâmetros avaliados durante a imobilização por ligação covalente.	84
Figura 18 – Gráfico de contorno para o processo de imobilização por ligação covalente.	84
Figura 19 – Amostras dos ensaios de imobilização via ligação covalente.	85

Figura 20 – Espectro FTIR para os imobilizados.....	86
Figura 21 – Atividade enzimática do imobilizado durante o armazenamento.	87
Figura 22 – Resultados dos testes de difusão em ágar para a enzima imobilizada por adsorção.	90
Figura 23 – Resultados dos testes de difusão em ágar para a enzima imobilizada por ligação covalente.....	90
Figura 24 – Curva padrão para a determinação de proteína.....	113
Figura 25 – Curva padrão para a determinação de açúcar redutor para a α -amilase.	114
Figura 26 – Curva padrão para a determinação de açúcar redutor para a pectinase.....	114
Figura 27 – Curva padrão para a determinação de periodato.....	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais antimicrobianos utilizados pela indústria têxtil... 35	
Tabela 2 - Enzimas antimicrobianas e aplicações. 40	40
Tabela 3 – Principais características das enzimas utilizadas no trabalho.....	
..... 54	54
Tabela 4 – Concentrações de preparação enzimática avaliadas para CIM.	
..... 59	59
Tabela 5 – Codificação das variáveis utilizadas no planejamento fatorial completo 2^3 62	62
Tabela 6 – Matriz do planejamento 2^3 com variáveis codificadas. 63	63
Tabela 7 – Resultados obtidos para a caracterização das preparações enzimáticas comerciais..... 67	67
Tabela 8 – Diâmetros médios para as zonas de inibição. 69	69
Tabela 9 – ANOVA para as variáveis estudadas no processo de imobilização por adsorção..... 80	80
Tabela 10 – ANOVA para as variáveis estudadas no processo de imobilização por ligação covalente. 83	83
Tabela 11 – Zona de inibição antimicrobiana da enzima imobilizada. . 89	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABINT	Associação Brasileira das Indústrias de Não-Tecidos e Tecidos Técnicos
AATCC	<i>American Association of Textile Chemists and Colorists</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BSA	do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina de soro bovino)
CA	Acetato de celulose
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMC	Carboximetilcelulose
DNS	Ácido 3,5 dinitrossalicílico
DSC	do inglês <i>Differential Scanning Calorimetry</i> (Calorimetria Diferencial de Varredura)
ATR-FTIR	do inglês <i>Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada)
IPT	Instituto de Pesquisas Tecnológicas
PCA	do inglês <i>Plate Count Agar</i> (Agar Padrão para Contagem)
TTC	do inglês <i>Triphenyltetrazolium chloride</i> (Cloreto de trifeniltetrazólio)
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
1.1 OBJETIVOS	26
1.1.1 Objetivo geral	26
1.1.2Objetivos específicos	26
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1 TÊXTEIS TÉCNICOS	29
2.2 TÊXTEIS ANTIMICROBIANOS	30
2.2.1 Degradação das fibras têxteis por microrganismos	31
2.2.2 Importância dos têxteis antimicrobianos	32
2.2.3 Compostos antimicrobianos nos materiais têxteis	34
2.2.4 Mecanismos de ação.....	37
2.2.5 Enzimas antimicrobianas e aplicações	38
2.3 Imobilização de enzimas	43
2.3.1 Imobilização de enzimas em matriz de celulose.....	44
2.3.1.1 Método de imobilização por adsorção	45
2.3.1.2 Método de imobilização por ligação covalente.....	45
2.3.1.2.1 Introdução de grupos amina	46
2.3.1.2.2 Introdução de grupos epóxi.....	48
2.3.1.2.3 Introdução de grupos aldeído e carboxila	48
2.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE	50
3 MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1 Equipamentos.....	53
3.2 Reagentes	53
3.3 ENZIMAS	54
3.4 CEPAS DE MICRORGANISMOS	54
3.5 SUBSTRATO TÊXTIL	54
3.6 CARACTERIZAÇÃO DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS.....	55
3.6.1 Determinação da concentração de proteína no extrato enzimático.....	55
3.6.2 Determinação de açúcares redutores	55
3.6.3 Determinação da atividade enzimática	56
3.6.3.1 Atividade da α -amilase livre	56
3.6.3.2 Atividade da pectinase alcalina livre	57

3.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS	57
3.7.1 Difusão em meio sólido com orifício	57
3.7.2 Técnica de microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	58
3.7.3 Definição da preparação enzimática de trabalho	59
3.8 FUNCIONALIZAÇÃO DO SUBSTRATO DE ALGODÃO	60
3.8.1 Oxidação via periodato de sódio	60
3.8.2 Confirmação da formação de grupos aldeídos	60
3.8.2.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (ATR-FTIR)	60
3.8.2.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	61
3.8.2.3 Teste de Fehling	61
3.9 ESTUDO DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DA PECTINASE	
61	
3.10 ESTABILIDADE AO ARMAZENAMENTO	63
3.11 ATIVIDADE DA PECTINASE IMOBILIZADA	63
3.11.1 Eficiência de imobilização	64
3.11.2 Atividade recuperada	64
3.12 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA ENZIMA IMOBILIZADA	
65	
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS	67
4.1.1 Determinação da concentração de proteína	67
4.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS	68
4.3 FUNCIONALIZAÇÃO DO SUBSTRATO DE ALGODÃO	74
4.4 ESTUDO DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DA PECTINASE	
79	
4.4.1 Imobilização via adsorção	79
4.4.2 Imobilização via ligação covalente	82
4.5 ESTABILIDADE AO ARMAZENAMENTO DO PRODUTO TÊXTIL	86
4.5.1 Atividade antimicrobiana dos tecidos contendo a enzima imobilizada	88
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES	93
5.1 CONCLUSÕES	93
5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	94
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

7 APÊNDICE A – Curva padrão de calibração para a determinação da concentração de proteínas	113
8 APÊNDICE B – Curva padrão de calibração para a determinação da concentração de açúcar redutor	114
9 APÊNDICE C – Curva padrão de calibração para a determinação da concentração de periodato.....	115

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

TÊXTEIS ANTIMICROBIANOS PRODUZIDOS PELA MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DE TECIDOS DE ALGODÃO E IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA PECTINOLÍTICA

Por quê?

- Têxteis antimicrobianos são produtos funcionais utilizados em diversos segmentos como na área médica, roupas hospitalares, roupa íntima, tecidos de decoração, cama, mesa e banho, filtros, etc.;
- Os aditivos antimicrobianos comerciais são basicamente compostos sintéticos;
- Existe uma forte tendência em pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos não-tóxicos, biodegradáveis e de baixo impacto ambiental;
- O aumento da resistência dos microrganismos a antibióticos aumenta a demanda por novos compostos antimicrobianos;
- Enzimas antimicrobianas são biocompatíveis, biodegradáveis e um recurso renovável;
- Enzimas antimicrobianas já são empregadas na área de alimentos e farmacêutica, no entanto é um tema pouco explorado na área têxtil.

Quem já fez?

- Existem poucos trabalhos sobre imobilização de enzimas em têxteis com finalidades funcionais;
- Somente um estudo foi encontrado a respeito da imobilização de pectinase visando aplicação antimicrobiana;
- Não constam na literatura imobilização da enzima pectinase em suporte de celulose via oxidação com periodato.

Hipóteses

- É possível imobilizar a enzima pectinase em suporte de algodão funcionalizado por oxidação via periodato e por adsorção?
- A enzima se mantém ativa após o processo de imobilização?
- Por quanto tempo se mantém estável?
- A atividade antimicrobiana da enzima é mantida após a imobilização?

Métodos experimentais

- Investigar a atividade antimicrobiana de enzimas utilizadas no processo têxtil;
- Estudar o processo de oxidação/ativação do tecido de algodão via periodato;
- Estudar o processo de interação enzima-tecido;
- Analisar modificações na atividade enzimática;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do produto final.

Respostas

- Definir a enzima que apresenta a melhor atividade antimicrobiana;
- Avaliar as melhores condições para funcionalização do suporte (tecido de algodão);
- Determinar quais as condições experimentais proporcionam maior atividade enzimática após a imobilização;
- Determinar a atividade antimicrobiana do produto final e possíveis aplicações.

1 INTRODUÇÃO

Têxteis técnicos são produzidos visando um uso ou aplicação final específico, podendo atender a requisitos técnicos com elevado desempenho em diversos segmentos, por exemplo: questões de segurança (propriedades antichamas), construção civil (isolantes acústicos) e meio ambiente (filtros e mantas de drenagens), entre outros. Conhecidos como têxteis inteligentes, também estão relacionados a novas tecnologias, como acabamentos com função bioativa na eliminação de bactérias e capacidade de automodificação (IPT, 2018).

Dentro dos têxteis técnicos, encontra-se o grupo dos têxteis antimicrobianos. Segundo Windler, Height e Nowack (2013), os têxteis incorporados com compostos antimicrobianos estão presentes no mercado há décadas, sendo utilizados nas mais diversas aplicações, para prevenir ou inibir o crescimento de microrganismos. Os têxteis antimicrobianos podem ser utilizados tanto na melhora da conservação do substrato têxtil quanto em aplicações na área médica e farmacêutica, dependendo da atividade biostática ou biocida do composto antimicrobiano utilizado (BORYO, 2013; GUTAROWSKA; MICHALSKI, 2012; SUN; WORLEY, 2005).

Muitos compostos diferentes são usados para funcionalizar produtos têxteis, como triclosan, compostos quaternários de amônia, metais como prata e cobre, compostos naturais como quitosana, entre outros (GAO; CRANSTON, 2008). De acordo com Islam, Shahid e Mohammad (2013), existe uma forte tendência em pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos não-tóxicos, biodegradáveis e sustentáveis, baseados em produtos naturais, devido a possíveis efeitos prejudiciais de vários agentes antimicrobianos sintéticos.

Dentro deste panorama, e com aumento da resistência dos microrganismos aos antibióticos, enzimas antimicrobianas estão sob intensa investigação. As enzimas antimicrobianas, comuns na natureza, desempenham um papel fundamental na defesa de organismos vivos contra ataques bacterianos (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 2000; THALLINGER *et al.*, 2013).

Embora largamente pesquisado na área de alimentos e farmacêutica, o uso de enzimas antimicrobianas na área têxtil é um tema pouco explorado (EDWARDS *et al.*, 2011; IBRAHIM *et al.*, 2007; SEABRA; GIL, 2007; VARTAINEN; RÄTTÖ; PAULUSSEN, 2005).

Apesar de ser uma alternativa promissora, ainda há muito para ser investigado, não havendo ainda aplicação comercial.

Considerando estes aspectos, no presente trabalho se buscou investigar a atividade antimicrobiana de duas enzimas utilizadas no processamento têxtil, Termamyl® 2X e Bioprep® 3000L, selecionar uma das enzimas de estudo, com melhor atividade antimicrobiana, e avaliar a sua imobilização em tecido de algodão, a fim de, posteriormente, testar a eficácia da mesma como têxtil antimicrobiano.

Não foram encontrados na literatura trabalhos sobre a imobilização da enzima em estudo, uma pectinase alcalina, em suportes de celulose via ligação covalente, tampouco via tratamento por periodato, de forma que este trabalho pode contribuir para futuros estudos e aplicações da imobilização desta enzima.

Os resultados deste trabalho fornecerão subsídios para o desenvolvimento de tecnologia para a produção de têxtil antimicrobiano, como um recurso alternativo natural, biodegradável e não tóxico. Além do mais, este tipo de tratamento pode aumentar o valor de mercado dos produtos têxteis e atender aos requisitos técnicos específicos de determinados nichos de mercado, abrindo novas oportunidades para o setor têxtil.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Imobilizar enzima com atividade antimicrobiana em superfície têxtil de algodão.

1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as enzimas Termamyl® 2X e Bioprep® 3000L;
- Investigar a atividade antimicrobiana das enzimas Termamyl® 2X e Bioprep® 3000L;
- Imobilizar a enzima no tecido de algodão através do método de adsorção;
- Funcionalizar quimicamente a superfície de tecido de algodão via reação com periodato;
- Imobilizar a enzima no tecido de algodão funcionalizado através do método de ligação covalente;

- Determinar as melhores condições de temperatura, pH e concentração de enzima para imobilização da enzima no tecido de algodão, por adsorção e por ligação covalente;
- Avaliar a atividade enzimática e a estabilidade de armazenamento para a enzima imobilizada por adsorção e por ligação covalente;
- Avaliar a atividade antimicrobiana e a estabilidade de armazenamento do tecido antimicrobiano produzido por adsorção e por ligação covalente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresenta uma breve revisão sobre o estado da arte no qual o tema do trabalho se insere, procurando evidenciar a importância da sua investigação para a comunidade científica. Será apresentada uma pequena revisão sobre têxteis técnicos, mais especificamente têxteis antimicrobianos, focando na importância destes produtos no mercado, seu mecanismo de ação, e nos principais tipos e aplicações de têxteis antimicrobianos existentes. Também uma breve revisão a respeito de enzimas com atividade antimicrobiana e por fim, métodos para imobilização de enzimas em matrizes de celulose, direcionando o uso para fibras de algodão, será apresentada.

2.1 TÊXTEIS TÉCNICOS

Os têxteis técnicos são um setor da indústria têxtil com forte previsão de crescimento, tendo como principal característica a inovação, visando uma melhor qualidade de vida do consumidor.

Têxteis técnicos são também conceituados como materiais construídos de matérias primas na forma de fibras, fios, filamentos, etc., nos mais diferentes arranjos (flocos, fios, tecidos, não-tecidos) com aplicações que necessitem performance bem determinada, visando praticidade, segurança, economia e durabilidade definida, exceto os têxteis que são utilizados em moda, cama, mesa e banho (ABINT, 2018).

Outra definição de têxteis técnicos são materiais têxteis e produtos fabricados principalmente por suas propriedades técnicas e de desempenho, ao invés de características estéticas ou decorativas (HORROCKS; ANAND, 2000).

Estas definições deixam margens para diferentes interpretações. Nos últimos anos, um número crescente de produtos têxteis tem combinado propriedades estéticas, com propriedades funcionais, de conforto e desempenho. Em suma, são materiais fibrosos que apresentam características ou acabamentos específicos, como por exemplo resistência mecânica, térmica, elétrica e durabilidade, permitindo sua adaptação e aplicação a funções técnicas específicas, englobando diferentes setores da indústria.

De acordo com Horrocks e Anand (2000), são 12 as principais áreas de aplicação dos têxteis técnicos:

- *agrotech*: agricultura, aquicultura, horticultura e florestal;
- *buildtech*: construção e edificação civil;

- *clothtech*: componentes técnicos de sapatos e roupas;
- *geotech*: geotêxteis e engenharia civil;
- *homotech*: componentes técnicos de móveis, recobrimentos de piso;
- *indutech*: filtração, transporte, limpeza e outros usos industriais;
- *medtech*: higiene e médica;
- *mobiltech*: automóveis, transporte, ferrovias e aeroespacial;
- *oekotech*: proteção ambiental;
- *packtech*: embalagem;
- *protech*: proteção pessoal e de propriedades;
- *sporttech*: esporte e lazer.

Outras definições de têxteis técnicos são baseadas de acordo com o uso ou aplicação final do produto, e não de acordo com a composição ou estrutura do material. Eles cumprem requisitos técnicos visando conferir elevado desempenho, como têxteis incorporados a questões de segurança, construção civil e meio ambiente. A geração mais recente são os denominados materiais inteligentes, nos quais novas tecnologias como a função bioativa na eliminação de bactérias e a capacidade de automodificação dos materiais são incorporadas (IPT, 2018).

2.2 TÊXTEIS ANTIMICROBIANOS

Os têxteis com atividade antimicrobiana são um tipo de têxteis técnicos e têm como principal função a inativação ou inibição de microrganismos, principalmente bactérias e fungos que, na presença de umidade, possam vir a provocar descoloração do material, odores desagradáveis ou até mesmo infecções.

Desta forma, dependendo de sua função, os têxteis antimicrobianos podem ser classificados em duas categorias: materiais biocidas ou biostáticos. A função biostática refere-se à inibição do crescimento dos microrganismos em têxteis, prevenindo a biodegradação do material e, por definição, envolve somente a proteção do material têxtil. Já os materiais biocidas são capazes de inativar os microrganismos, esterilizando o material e possivelmente protegendo o usuário de ataques biológicos (SUN; WORLEY, 2005).

Segundo Sun e Worley (2005), o termo “antimicrobiano” é relativamente amplo e inespecífico, tendo várias reivindicações de funções e causando certa confusão em relação à sua definição. Então, de forma geral, para finalidade de proteção, a função biocida tem

proporcionado inativação rápida e eficiente de um amplo espectro de microrganismos e a função biostática se mostra insuficiente para aplicações na área médica ou para vestuários para uso em proteção profissional.

2.2.1 Degradação das fibras têxteis por microrganismos

Os tecidos, que compreendem o maior grupo de produtos têxteis, diferem uns dos outros em sua composição. Fatores como espessura do fio e do tecido e densidade linear, afetam a taxa de deterioração uma vez que determinam a área de ataque dos microrganismos. Sabe-se também que as fibras naturais e as fibras à base de matérias-primas naturais são mais fácil e rapidamente afetadas que as fibras sintéticas, dependendo da acessibilidade de nutrientes essenciais aos microrganismos no material (GUPTA; BHAUMIK, 2007; SZOSTAK-KOTOWA, 2004). A pele humana também proporciona condições de umidade, temperatura, pH, etc., ideais para a fixação e desenvolvimento de bactérias e fungos (GAO; CRANSTON, 2008).

A adesão microbiana à fibra é o passo inicial para ocorrer degradação. De acordo com Sedlarik (2013), a adesão é caracterizada por três fatores, relacionados entre si:

- Bactérias (a cepa, o crescimento microbiano, condições nutricionais, energia e carga superficial);
- Superfície do material (composição química, energia e carga superficial e tipologia);
- Ambiente circundante (pH, temperatura, presença de oxigênio e outros compostos orgânicos e inorgânicos, parâmetros hidrodinâmicos).

Os tecidos de origem vegetal tornam-se mais suscetíveis ao ataque de microrganismos do que os tecidos sintéticos devido à sua estrutura porosa hidrofílica reter água, oxigênio e nutrientes, proporcionando um ambiente ideal para a proliferação de microrganismos. Os nutrientes podem ser oriundos de produtos utilizados no acabamento têxtil, como derivados de amido, proteína, gorduras e óleos (BORYO, 2013; GUTAROWSKA; MICHALSKI, 2012; LIU; REN; LIANG, 2015). As fibras artificiais celulósicas têm um baixo grau de cristalinidade e uma elevada capacidade de retenção de água, por isso, assim como o algodão, são mais favoráveis à degradação por bactérias e fungos (GUTAROWSKA; MICHALSKI, 2012).

Existem dois mecanismos possíveis para a degradação dos têxteis, um por via química onde ocorre a produção de amônio, nitrato,

sulfureto de hidrogênio e ácidos orgânicos, e outro por via enzimática que envolve a atividade das lipases, esterases, proteases e ureases (LUCAS *et al.*, 2008).

O material é atacado quimicamente por ação de enzimas extracelulares produzidas pelos microrganismos com o objetivo de obter nutriente. Fibras de origem vegetal, como algodão, linho, juta e cânhamo são muito suscetíveis ao ataque de fungos que produzem a enzima celulase e digerem celulose (HAMLIN, 1998).

De acordo com Boryo (2013), a celulase acelera a hidrólise da ligação glicosídica da celulose, disponibilizando moléculas de glicose. Assim, os polímeros insolúveis são convertidos em açúcar solúvel, que podem então ser metabolizados no interior das células bacterianas ou fúngicas. Estes microrganismos, presentes na atmosfera, aceleram seu crescimento em condições favoráveis de nutrientes, temperatura e umidade, conduzindo à perda de propriedades funcionais dos têxteis, tais como elasticidade ou resistência à tração.

2.2.2 Importância dos têxteis antimicrobianos

Existe uma grande variedade de microrganismos no ambiente. Estima-se que o corpo humano adulto é o hospedeiro de pelo menos 100 trilhões de células microbianas (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 2000). Estes microrganismos, a maioria bactérias, fungos e protozoários, são denominados flora normal do corpo humano. A microbiota normal distribui-se pelas partes do corpo que estão em contato com o meio externo, isto é, pele e mucosas. No entanto, cada uma das regiões habitadas possui uma microbiota com características próprias (TRABULSI; SAMPAIO, 2008).

Alguns organismos da flora natural podem ser patógenos oportunistas, causando infecções se ocorrer danos teciduais em sítios corpóreos específicos ou se a resistência do corpo à infecção é diminuída (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 2000).

De acordo com Trabulsi e Sampaio (2008), a microbiota cutânea se distribui por toda a extensão da pele, sendo mais concentrada nas áreas úmidas e quentes, como axilas e virilhas. Predominam-se as bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Propionibacterium* e, em menor quantidade são encontrados *Streptococcus* e outras bactérias, sendo *Staphylococcus epidermidis* encontrada em 90% das pessoas, e *Staphylococcus aureus* em 10 a 40%. Esta última é encontrada com frequência elevada na vulva (60% das mulheres), nas fossas nasais de

indivíduos que trabalham em hospitais (50 a 70%) e em pacientes portadores de dermatoses (80%).

Ainda segundo Trabulsi e Sampaio (2008), calcula-se que a saliva contém 10^8 bactérias.mL⁻¹ e as placas dentais 10^{11} , correspondentes aos gêneros *Staphylococcus*, *Actinomyces*, *Treponema*, *Mycoplasma* e outros, tendo esta microbiota grande importância na área da odontologia e medicina. Já nas fossas nasais predominam, na flora normal, os gêneros *Staphylococcus* e *Corynebacterium*, podendo, no caso na redução da microbiota normal da região, colonizarem espécies patogênicas como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

O trato genital feminino tem uma flora normal muito complexa, variando com o ciclo menstrual. A microbiota principal residente na vagina adulta, durante o período de atividade do ovário, são os lactobacilos ácido-tolerantes, responsáveis pela produção de ácido lático e por manter o pH em cerca de 4,4 a 4,6. Entre os microrganismos capazes de se multiplicar nesse pH ácido, encontra-se os enterococos, as corinebactérias anaeróbicas, a *Candida albicans* e um grande número de bactérias anaeróbicas (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 2000).

O desequilíbrio da microbiota normal do organismo pode favorecer a proliferação de microrganismos capazes de produzir doenças ao ser humano. Nos últimos anos, os microrganismos têm se tornado especialmente importantes, devido ao aumento de incidências de infecções microbianas e ao uso prolongado de antibióticos e substâncias químicas imunossupressoras para o tratamento.

As fibras naturais encontram aplicação tanto como materiais para acabamento e isolamento na indústria automotiva e da construção civil como são particularmente adequadas para a produção de têxteis para esportes, produtos médicos não implantáveis, produtos para cuidado com higiene e saúde, roupas íntimas, forros de sapato e indústria de embalagens (AHMED *et al.*, 2014; CZAJKA, 2005; OHL *et al.*, 2012; RODRIGUEZ *et al.*, 2014; WALENTOWSKA; FOKSOWICZ-FLACZYK, 2013).

Somado a estes fatores, e tendo em vista que as fibras têxteis, principalmente as fibras naturais, são um excelente meio para a proliferação de microrganismos, houve um aumento ao longo das últimas décadas da demanda por produtos têxteis que oferecem proteção à infecções por microrganismos patogênicos, tornando a pesquisa de têxteis funcionais antimicrobianos extremamente importante e atrativa uma vez que este tipo de tratamento, além de atender a requisitos técnicos e

ampliar a capacidade de manutenção de vários produtos têxteis, pode aumentar seu valor de mercado (ISLAM; SHAHID; MOHAMMAD, 2013).

2.2.3 Compostos antimicrobianos nos materiais têxteis

Atualmente, muitas tecnologias antimicrobianas estão disponíveis na indústria têxtil, sendo usadas nas mais diferentes aplicações para prevenir o crescimento de microrganismos. Devido à atividade biológica dos compostos antimicrobianos, a avaliação da segurança destas substâncias é um assunto de constante pesquisa.

Os compostos antimicrobianos aplicados em materiais têxteis devem apresentar uma baixa toxicidade para os consumidores, serem eficientes contra um amplo espectro de microrganismos e eliminar seletivamente os microrganismos indesejados. Devem ainda cumprir a legislação, sendo necessário realizar testes de citotoxicidade antes de serem comercializados. Também devem ter um efeito durável aos processos de lavagem, secagem e engomagem, sendo este o maior desafio da indústria (GAO; CRANSTON, 2008; LIU; REN; LIANG, 2015; SUN, 2016; YE *et al.*, 2006).

Muitos compostos diferentes são utilizados para conferir funcionalidade antimicrobiana, desde compostos orgânicos sintéticos como triclosan, compostos de amônia quaternária, metais e sais metálicos como cobre, prata e zinco, dióxido de titânio e corantes sintéticos (BALAKUMARAN *et al.*, 2016; GAO; CRANSTON, 2008; IRENE *et al.*, 2016; MA *et al.*, 2014; PULIT-PROCIAK *et al.*, 2016; RADETIĆ, 2013), a antimicrobianos derivados de substâncias naturais, como quitosana, óleos essenciais e enzimas (ALONSO *et al.*, 2010; FERRERO; PERIOLATTO; FERRARIO, 2015; HROMIS *et al.*, 2015; IBRAHIM *et al.*, 2007; JEON *et al.*, 2014; NITHYA *et al.*, 2012; SARIKURKCU *et al.*, 2015).

A Tabela 1 apresenta alguns dos principais compostos antimicrobianos utilizados na indústria têxtil.

De acordo com Islam, Shahid e Mohammad (2013), existe cada vez mais uma forte tendência em pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos não-tóxicos e ecologicamente corretos, baseados em produtos naturais, devido à possíveis efeitos prejudiciais de vários agentes antimicrobianos sintéticos.

Tabela 1 - Principais antimicrobianos utilizados pela indústria têxtil.

Agente antimicrobiano	Espectro de atividade	Têxteis para aplicação	Autor, ano
Metacrilato de glicidila, β-ciclodextrina, QCAs	<i>L. plantarum</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	Polipropileno	Kim, Kim e Rhee, 2010
Prata, nanopartículas de prata e titânia	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. faecalis</i>	Algodão Lã Seda e Nylon	Dubas, Kumlangdudsana e Potiyaraj, 2006; Gorenssek e Recej, 2007; Montazer <i>et al.</i> , 2011
4-vinilpiridina	<i>E. coli</i>	Polipropileno	Tan <i>et al.</i> , 2000
N-halamina	<i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	Algodão, Filme de quitosana	Kocer <i>et al.</i> , 2011; Li <i>et al.</i> , 2013; Ma <i>et al.</i> , 2014; Ren <i>et al.</i> , 2009
Sais de amônia quaternária, Sais de fósforo	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Shigella</i> sp., <i>S. typhi</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>C. albicans</i> , <i>A. flavus</i> , <i>F. oxysporum</i>	Poliéster, Policloreto de vinila, Acetato de celulose, Polipropileno, Policaprolactona e Poliuretano	Borodkin <i>et al.</i> , 2017; Kanazawa, Ikeda, Endo, 1993; Kenawy <i>et al.</i> , 1998, 2002; Kim, Kim, Rhee, 2010

Tabela1 - Principais antimicrobianos utilizados pela indústria têxtil (continuação)

Óxido de cobre, nanopartículas de cobre	<i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>A. niger</i>	Fibra de vidro à base de fosfato degradável, Rayon de bambu, filtro de papel	Abou Neel <i>et al.</i> , 2005; Cano <i>et al.</i> , 2018; Lazary <i>et al.</i> , 2014; Teli, Sheikh, 2013
Triclosano	<i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	Ácido polilático	Goetzendorf-Grabowska, Królikowska, Gadzinowski, 2004

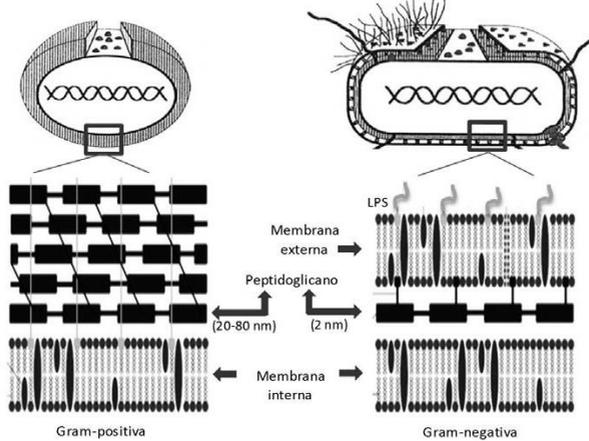
2.2.4 Mecanismos de ação

O mecanismo de ação dos antimicrobianos depende da sua natureza e da concentração da substância ativa, enquanto a sobrevivência dos microrganismos depende do tipo de microrganismo e da integridade da célula (GAO; CRANSTON, 2008). Os compostos antimicrobianos podem atuar sobre os microrganismos de várias maneiras. Os principais pontos de ação incluem: inibição da síntese do peptidoglicano da parede celular bacteriana, lesão na membrana citoplasmática e interferência na síntese de ácido nucleico e proteínas (HOLME, 2007; PELCZAR; CHAN; KRIEG, 2000).

As bactérias são envolvidas por uma parede celular que é praticamente composta por um complexo de carboidrato e proteína chamado de peptidoglicano (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). O peptidoglicano é formado por dois tipos de açúcares, o ácido N-acetilmurâmico e o N-acetilglucosamina, e alguns aminoácidos, sendo responsável pela rigidez da parede celular. Ele está presente tanto na parede celular de microrganismos Gram-positivos quanto Gram-negativos, no entanto, sua estrutura molecular varia de microrganismo para microrganismo, determinando a resistência da célula bacteriana ao antimicrobiano (FUGLSANG *et al.*, 1995; PELCZAR; CHAN; KRIEG, 2000).

As bactérias Gram-negativas possuem uma parede composta de várias camadas que diferem na sua composição química e, conseqüentemente, é mais complexa que a parede das Gram-positivas que, apesar de mais espessa, apresenta predominantemente um único tipo de macromolécula. Nas bactérias Gram-positivas, o peptidoglicano representa 90% da parede celular, enquanto que nas bactérias Gram-negativas, apenas cerca de 10%, como ilustrado na Figura 1. O conhecimento das diferenças entre as paredes das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é da mais alta relevância para o estudo dos mecanismos de ação quimioterápicos, de patogenicidade entre outros assuntos que estão diretamente relacionados à composição química e estrutural da parede bacteriana (TRABULSI; SAMPAIO, 2008).

Figura 1 – Comparação da estrutura das paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.



Fonte: adaptado de CARRILLO (2013)

2.2.5 Enzimas antimicrobianas e aplicações

A terminologia enzima teria sido cunhada por Wilhelm Friedrich Kühne em 1887 para descrever uma substância catalítica derivada de leveduras. Posteriormente, em 1926, James Batcheller Sumner purificou e cristalizou a urease, mostrando tratar-se de uma proteína pura e com atividade catalítica, deduzindo que todas as enzimas são proteínas. Logo, a definição mais simples seria a de que enzimas são proteínas que apresentam atividade catalítica (COPELAND, 2000; REHM; REED, 1995).

O crescente aumento da resistência dos microrganismos aos antibióticos já conhecidos tem tornado cada vez maior a busca por novos compostos com atividade antimicrobiana, com isto, compostos de origem natural, biodegradáveis e não tóxicos estão sendo cada vez mais pesquisados.

Segundo Thallinger *et al.* (2013), com o aumento da resistência de microrganismos aos antibióticos as enzimas antimicrobianas estão sob intensa investigação. Vários produtos à base de enzimas já foram comercializados, com aplicações na área da saúde, na indústria de alimentos e biomédica.

As enzimas antimicrobianas são comuns na natureza, onde desempenham um papel fundamental na defesa de organismos vivos contra ataques bacterianos. Pode-se citar como exemplo, compostos

bactericidas que ocorrem na pele. As glândulas sudoríparas secretam a lisozima, uma enzima encontrada em muitos fluidos e secreções corporais, como na lágrima, a qual hidrolisa o peptidoglicano tanto de bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, e as glândulas sebáceas secretam lipídeos complexos que podem ser facilmente degradados por bactérias como *Propionibacterium acnes* para produzir ácidos graxos de cadeias longas, tais como o ácido oleico, que são altamente inibitórios para outras bactérias (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 2000).

Estas enzimas apresentam habilidades para atacar diretamente microrganismos, interferir na formação ou destruir biofilmes, e catalisar reações que resultam na produção de compostos antimicrobianos (THALLINGER *et al.*, 2013). Duas classes de enzimas são conhecidamente relevantes, as hidrolases e as oxirredutases. De acordo com Fuglsang *et al.* (1995), as enzimas hidrolíticas atuam degradando componentes estruturais da parede microbiana, inativando a célula. As oxirredutases reagem com moléculas que destroem proteínas vitais na célula, exercendo efeito diretamente sobre o metabolismo do microrganismo.

Em alguns casos, as enzimas antibacterianas são uma tecnologia estabelecida. Por exemplo, formulações líquidas de enzimas antimicrobianas e anti-biofilmes são frequentemente exploradas para a limpeza de superfícies. As enzimas podem ser incorporadas ou enxertadas dentro e fora de materiais poliméricos para prevenir a colonização microbiana. As formulações podem conter uma ou mais enzimas, ou enzimas combinadas com outros agentes antimicrobianos ou anti-biofilme (AMARA *et al.*, 2016; AUGUSTIN; ALI-VEHMAS; ATROSHI, 2004; GROVER *et al.*, 2013; SAMPAIO *et al.*, 2016).

A Tabela 2 apresenta as principais enzimas antimicrobianas até então conhecidas e suas aplicações.

Tabela 2 - Enzimas antimicrobianas e aplicações.

Enzima	Aplicação	Espectro de atividade	Autor, ano
Lisozima	Indústrias farmacêuticas e de alimentos	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. plantarum</i> e <i>L. brevis</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>M. luteus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Carrillo, 2013; Jollès e Jollès, 1984; Ozer <i>et al.</i> , 2016; Thallinger <i>et al.</i> , 2013
Subtilisina	Detergente, couro e shelf life, embalagens na ind. de alimentos	<i>Pseudomonas</i> , <i>Pseudoalteromonas</i> e <i>Bacillus</i> sp. <i>L. monocytogenes</i>	Bjerga <i>et al.</i> , 2016; Catara <i>et al.</i> , 2003; Ledder <i>et al.</i> , 2009; Leroy <i>et al.</i> , 2008; Thallinger <i>et al.</i> , 2013
Lisostafina	Controle de biofilmes, biomateriais, bandagens, malhas para reparação de hérnia, revestimento de cateteres, tratamento de mastite	<i>S. aureus</i>	Belyansky <i>et al.</i> , 2011; Hoernig <i>et al.</i> , 2016; Miao <i>et al.</i> , 2011; Pangule <i>et al.</i> , 2010; Satishkumar <i>et al.</i> , 2011; Shah, Mond e Walsh, 2004
Aquazym 240L Bioprep 3000L Dn-lite IIS laccase	Têxteis antimicrobianos	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i> e <i>A. niger</i>	Ibrahim <i>et al.</i> , 2007

As proteases são enzimas que hidrolisam proteínas. Segundo Longhi *et al.* (2008), estão classificadas em dois grandes grupos, as exopeptidases e endopeptidases, e podem também ser classificadas de acordo com o seu pH ótimo como ácidas, neutras ou alcalinas. As proteases alcalinas constituem 60-65% do mercado industrial global. São amplamente utilizadas na indústria de detergentes, farmacêutica, couro, alimentos e agricultura. Também são importantes componentes de produtos biofarmacêuticos na limpeza de lentes de contato (PANT *et al.*, 2015).

As enzimas subtilisinas são amplamente utilizadas na indústria de detergente, couro e alimentícia. Estas proteases podem ser aplicadas em condições não-fisiológicas, como temperaturas elevadas, aditivo de detergentes e outros produtos químicos (BJERGA *et al.*, 2016). São produzidas por *Bacillus* sp. (THALLINGER *et al.*, 2013). As subtilisinas hidrolisam adesinas (proteínas bacterianas essenciais para a fixação em suportes sólidos e outras bactérias), impedindo assim a co-agregação de microrganismos em condição que permita que as bactérias se comunicar com outras e participar na formação de múltiplas espécies de biofilme (LEROY *et al.*, 2008). Removem com sucesso biofilmes de *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas* e *Bacillus* sp (CATARA *et al.*, 2003; LEDDER *et al.*, 2009; MARCATO-ROMAIN *et al.*, 2012) e *Listeria monocytogenes* (CATARA *et al.*, 2003; LEROY *et al.*, 2008), também previnem a co-agregação de *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus oralis*, *Porphyromonas gingivalis* (LEDDER *et al.*, 2009).

Augustin, Ali-Vehmas e Atroshi (2004) avaliaram diferentes preparações comerciais de proteases contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* e biofilmes de *Streptococcus thermophilus* e verificaram que as enzimas comerciais Pandion, Resinase A2X, Spezyme GA300 e Paradigm se mostraram eficientes nas suas remoções.

De acordo com Kumar (2008), a lisostafina apresenta ação lítica específica contra *Staphylococcus aureus* e, devido à sua única especificidade, pode ter grande potencial no tratamento de infecções por estafilococos resistentes a antibióticos. A lisostafina tem sido aplicada no controle de biofilmes em superfícies de biomateriais, incluindo bandagens de celulose (BELYANSKY *et al.*, 2011; MIAO *et al.*, 2011), malhas para reparação de hérnia (SATISHKUMAR *et al.*, 2011), revestimento de cateteres (SHAH; MOND; WALSH, 2004), conjugada com nanotubos de carbono (PANGULE *et al.*, 2010), tratamento de mastite (HOERNIG *et al.*, 2016), etc.

A lisozima foi descoberta por Alexander Fleming, em 1922, e desde então muitos trabalhos têm sido desenvolvidos para descrever as diferentes atividades biológicas desta proteína como sua atividade antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, analgésica, antitumoral e antioxidante, sendo que a sua atividade antibacteriana frente a bactérias Gram-positivas é a atividade mais largamente investigada (CARRILLO, 2013).

A lisozima, enzima pertencente a classe das hidrolases, é um agente antimicrobiano natural que está presente em quase todos os tecidos, secreções humanas e animais e em ovos de aves. Estas enzimas catalisam a quebra de ligações β (1-4) glicosídicas entre o ácido N-acetilurâmico e a N-acetilglicosamina (muramidase – EC 3.2.1.17), componentes do peptídeoglicano presente na parede celular bacteriana (JOLLES, 1964), e também atuam sobre a quitina, componente da parede celular fúngica, hidrolisando as ligações β (1-4) glicosídicas entre os monômeros de N-acetilglicosamina (quitinase – EC 3.2.1.14) (JOLLÈS; JOLLÈS, 1984). Suas aplicações farmacêuticas vão desde o tratamento de dores de garganta à descontaminação e prevenção da colonização microbiana em biomateriais. Na indústria de alimentos, a lisozima é utilizada para aumentar a vida de prateleira de muitos alimentos frescos, como por exemplo frutas, legumes, carne e queijo e também em embalagens de alimentos (OZER *et al.*, 2016; THALLINGER *et al.*, 2013).

Leroy *et al.* (2008) investigaram a adesão de bactérias formadoras de biofilmes marinhos perante a presença de algumas hidrolases comerciais, como proteases, glicosidases e lipases. A atividade de inibição na adesão de microrganismos foi medida em termos de prevenção da adesão bacteriana e do desprendimento de bactérias já aderidas. Verificaram que a Savinase (subtilisina) foi a hidrolase mais eficaz tanto na prevenção da adesão bacteriana e quanto na remoção de bactérias aderidas. No entanto, algumas preparações enzimáticas testadas, como Amano protease além de ineficazes, também aumentaram o número de células bacterianas aderidas. No geral, os resultados demonstraram que hidrolases podem tanto prevenir a aderência e a remoção de células bacterianas aderidas eficazmente, ou inversamente aumentar a adesão bacteriana, dependendo da concentração enzimática e do tipo de enzimas testadas.

Em sua pesquisa, Ibrahim *et al.* (2007) avaliaram a influência do tipo de tratamento da superfície de tecido de algodão na imobilização de enzimas e na sua atividade antimicrobiana. As enzimas em estudo foram α -amilase (Aquazym 240L), pectinase alcalina (Bioprep 3000L) e lacase

(Dnilito IIS laccase). O tecido foi funcionalizado por dois diferentes métodos, visando a ativação do algodão com adição de grupos carboxila e tratamento com adição de grupos básicos e de cobre quelato, e a atividade antimicrobiana foi avaliada perante *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. Ao término, observaram que todos os tratamentos apresentaram atividade antimicrobiana após 30 ciclos de lavagem, sendo os melhores resultados obtidos para a pectinase alcalina imobilizada através do tratamento com cobre.

2.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Enzimas são macromoléculas biológicas, biocompatíveis e biodegradáveis, produzidas a partir de recursos renováveis e têm sido amplamente utilizadas em pesquisas e aplicações industriais devido à baixa energia consumida, sua seletividade para substratos, condições de reação suaves, e solubilidade em água (MIN; YOO, 2014).

Apesar de todas estas vantagens, algumas desvantagens limitam seu uso, tais como a instabilidade às condições fisiológicas externas, e difícil recuperação e reuso (LEE *et al.*, 2005).

Neste contexto, a reutilização destes biocatalisadores torna-se um requisito fundamental no processo catalítico. Reutilizar enzimas necessita de separação e purificação, sendo estes processos dispendiosos, além de que podem provocar a sua contaminação e perda de atividade (CHEN; HSIEH, 2005). Tecnologias de imobilização têm sido desenvolvidas para melhorar a estabilidade das enzimas e reduzir o custo da separação e purificação das mesmas. Sua imobilização em suportes insolúveis permite não só a reutilização destas, mas também a modulação das suas propriedades catalíticas (ADRIANO *et al.*, 2008).

Uma matriz para imobilização de enzimas ideal deve ser inerte, estável, acessível, resistente à força mecânica, e biocompatível, sem comprometer a estrutura da proteína (MOCCELINI *et al.*, 2011). Em geral, existem três tipos de matrizes para suporte: inorgânicos, polímeros sintéticos e polímeros naturais (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014).

A celulose, um biomaterial renovável, tem sido extensivamente estudada através de abordagens teóricas e práticas, devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, estabilização química e baixo risco de contaminação ao ambiente (KLEMM *et al.*, 2005). A celulose é um dos biopolímeros mais abundantes, existente na madeira, algodão,

cânhamo, e outros materiais à base de plantas, auxiliando na estrutura da planta (SIRÓ; PLACKETT, 2010), também pode ser sintetizada por algas e algumas bactérias (IWAMOTO; ABE; YANO, 2008).

Por ser robusta, apresentar propriedades hidrofílica e hidrofóbica, não tóxica, e quimicamente inerte sob condições fisiológicas, este material torna-se útil para a manutenção da atividade enzimática. Além disso, os grupos hidroxila na superfície da celulose são favoráveis para reações químicas, tornando, portanto, os materiais de celulose adequados para imobilização de enzimas. A celulose também pode ser transformada em seus derivados por via química, enzimática ou métodos microbiológicos (CZAJA *et al.*, 2007).

Alguns derivados de celulose, como carboximetilcelulose (CMC), acetato de celulose (CA), e nitrato de celulose, são matérias-primas de larga escala comercial, em indústrias químicas e biológicas, porque são baratas, atóxicas, renováveis, biodegradáveis e biocompatíveis. Mais importante ainda, os derivados de celulose têm grupos funcionais capazes de se ligar à enzimas, tornando-se substratos ideais para a sua imobilização (LIU; CHEN, 2016).

2.3.1 Imobilização de enzimas em matriz de celulose

Segundo Sheldon (2007), uma diversidade de técnicas têm sido usadas para a imobilização de enzimas em matrizes de celulose e seus derivados. Estas técnicas de imobilização podem ser divididas em métodos covalentes e físicos, de acordo com as forças moleculares entre as enzimas e as matrizes.

A ligação da enzima ao suporte pode ser física (como interações hidrofóbicas e van der Waals), iônicas ou de natureza covalente. A ligação física é geralmente muito fraca para manter a enzima fixada ao suporte quando submetida às condições industriais de alta concentração de reagentes e produtos e alta força iônica. A imobilização da enzima ao suporte por ligação iônica é geralmente maior e por ligação covalente ainda mais, apresentando a vantagem de que a enzima não pode ser lixiviada da superfície. No entanto, também apresenta a desvantagem de a enzima poder ser desativada irreversivelmente e, neste caso, tanto a enzima quanto o suporte (muitas vezes caro) tornarem-se inutilizáveis (SHELDON, 2007).

2.3.1.1 Método de imobilização por adsorção

A imobilização por adsorção é um método simples, de baixo custo, não necessita de ativação do suporte, podendo este ser reutilizado em vários ciclos. A enzima é espontaneamente imobilizada em uma orientação que lhe é preferencial e energeticamente favorável (ORELMA *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2012).

Como desvantagens, tem-se a aleatoriedade da interação enzima-suporte e a possibilidade de dessorção da enzima devido a variações de temperatura, pH e força iônica (BRADY; JORDAAN, 2009; GARCIA-GALAN *et al.*, 2011; GUIDINI *et al.*, 2010).

Alguns estudos reportam a imobilização de enzimas em matrizes de celulose por adsorção. Orelma *et al.* (2012) imobilizaram avidinas em filmes de celulose regenerada e nanofibrilar através de adsorção física, obtendo ótimos resultados e uma adsorção irreversível. Wu *et al.* (2014) imobilizaram pectinase através de adsorção em esferas de celulose regenerada, para remoção de substâncias pécticas de água residuária. Neste estudo, foi observado que a enzima imobilizada apresentou maior estabilidade térmica e ao pH quando comparada sua forma livre. Kotel'nikova, Mikhailova e Vlasova (2007) avaliaram a imobilização das enzimas proteolíticas tripsina e a-quimotripsina. As enzimas foram adsorvidas reversivelmente em matrizes de celulose microcristalinas. Foi observado, através de difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura, que a adsorção das enzimas promoveu mudanças na estrutura supramolecular e morfológica da celulose.

2.3.1.2 Método de imobilização por ligação covalente

No método de imobilização covalente, as enzimas estão imobilizadas sob as matrizes através de interações químicas entre ambas. A ligação covalente entre enzima e suporte é um método de imobilização eficiente e tem se mostrado como a interação mais estável para a imobilização de moléculas de enzimas (LIU; CHEN, 2016). A grande desvantagem da ligação covalente é a redução da atividade enzimática após a fixação. Isto, no entanto, é compensado pela melhora da estabilidade térmica e ambiental durante a catálise (TRAN; BALKUS, 2011).

As matrizes de suporte para as enzimas requerem a disponibilidade de grupos funcionais específicos. Os grupos hidroxila na superfície da celulose podem apresentar uma interação fraca com uma enzima,

diretamente. Portanto, para obter uma imobilização covalente forte, etapas adicionais de funcionalização são necessárias e, grupos funcionais que possam reagir com os aminoácidos residuais das enzimas são introduzidos na superfície da celulose, mediante uma modificação química da matriz (LIU; CHEN, 2016; RISTIC' *et al.*, 2011; TRAN; BALKUS, 2011).

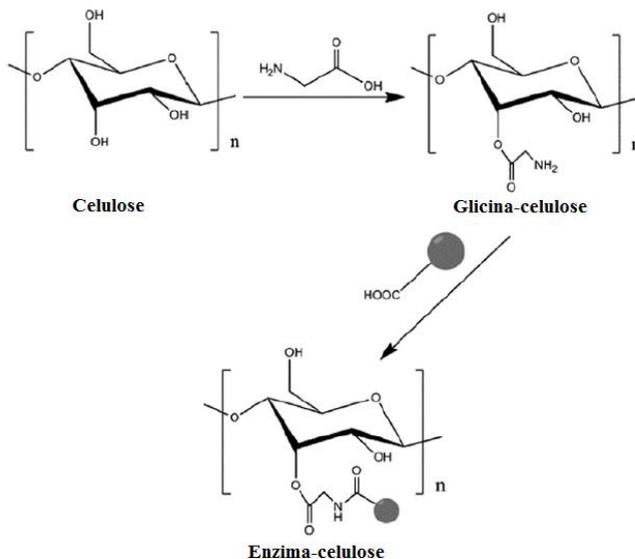
Há duas estratégias para a funcionalização de celulose. A primeira estratégia é a introdução de grupos amina na superfície da celulose para reagir com o grupo carboxila da enzima. A segunda estratégia é a introdução de um grupo aldeído (grupo carbonila), ou um grupo epóxi para reagir com o grupo amina da enzima (EDWARDS *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2012; WU; LIA; HO, 2013).

2.3.1.2.1 *Introdução de grupos amina*

A funcionalização da celulose através da adição de grupos amina permite imobilizar enzimas através da sua ligação covalente com os grupos carboxila das mesmas. Não há grupos contendo nitrogênio sobre a celulose, mas os grupos amina podem ser introduzidos através de reações químicas entre os grupos hidroxila da celulose e os grupos funcionais de compostos amino. A esterificação é um dos métodos mais fáceis e comuns para introduzir os grupos amina na superfície da celulose (CHEN; SUN; EDWARDS, 2014; EDWARDS *et al.*, 2011, 2012).

Tomando como exemplo a glicina, como mostrado na Figura 2, um grupo carboxila da glicina reage com um grupo hidroxila da celulose para introduzir um grupo amina na celulose. Então, o grupo amina é capaz de ligar com um grupo carboxila da enzima (LIU; CHEN, 2016).

Figura 2 – Funcionalização da celulose através da esterificação com glicina.



Fonte: adaptado de LIU; CHEN (2016)

Pesquisadores tem estudado a utilização da glicina para imobilizar lisozima em diferentes tipos de tecidos de algodão estéreis (sarja, tecido não-tecido, e panos de malha impressos) e fibras e filmes de celulose regenerados (CHEN; SUN; EDWARDS, 2014; EDWARDS *et al.*, 2011, 2012).

Edwards *et al.* (2012) realizaram a reação de esterificação da glicina para preparar nanocristais de algodão e imobilizar a lisozima através de uma ligação amida entre alguns resíduos de apartato e glutamato da proteína e o amino-glicina-celulose formado. Os autores avaliaram então duas estruturas cristalinas de celulose diferentes e a sua atividade antimicrobiana. As preparações nanocristalinas foram obtidas através da hidrólise ácida e ruptura mecânica das fibras de algodão a partir de um tecido de algodão previamente purgado e alvejado.

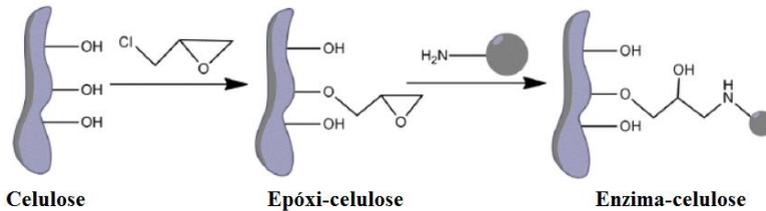
Em outro estudo, Ibrahim *et al.* (2007) funcionalizaram tecido de algodão através da adição de grupos básicos de nitrogênio ao tecido para imobilizar três enzimas comerciais, alfa-amilase, pectinase alcalina e lacase, nomeadas Aquazyme[®] 240L, Bioprep[®] 3000 e Dnilite[®] IIS, respectivamente. Para isto as amostras de tecido foram tratadas por

imersão em solução alcalina de polietilenoimina (5,5%), seguido por pós imersão em solução de glutaraldeído (2%) como agente de fixação.

2.3.1.2.2 Introdução de grupos epóxi

O grupo epóxi é capaz de reagir com os grupos amina das enzimas. Portanto, a sua introdução em matrizes de celulose é uma forma eficaz de ligar com enzimas. Normalmente, epóxidos contendo halogênio são usados para reagir com a celulose. A Figura 3 apresenta uma ilustração da estratégia de imobilização de enzimas sobre a celulose através deste método.

Figura 3 – Funcionalização da celulose através da adição de grupo epóxi.



Fonte: adaptado de LIU; CHEN (2016)

Alguns estudos têm utilizado epóxi-cloro-propano para funcionalizar celulose. Roy e Gupta (2003) avaliaram a imobilização de LactozymTM em pérolas de celulose. Da mesma forma, Luo e Zhang (2010) ativaram microcápsulas de celulose através da reação entre os grupos nucleofílicos de epóxi-cloro-propano e grupos hidroxila da celulose para imobilizar penicilina G-acilase (PGA), obtendo uma alta atividade catalítica, estabilidade térmica, e uma tolerância aumentada a variações de pH.

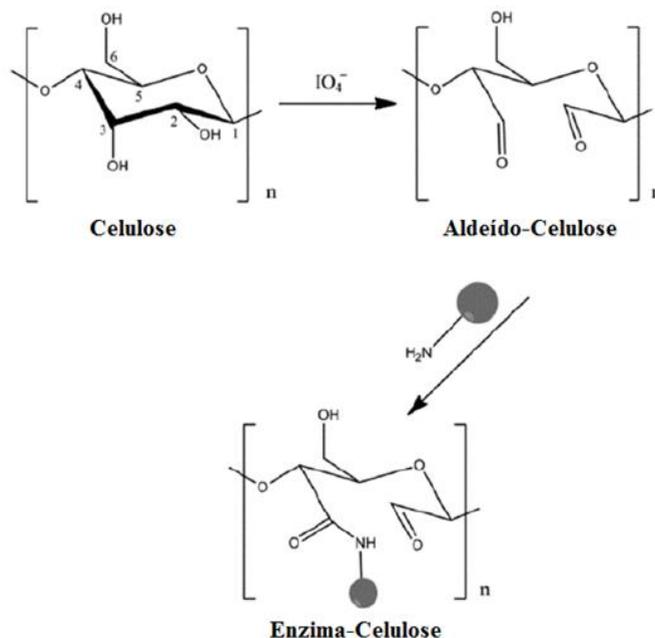
2.3.1.2.3 Introdução de grupos aldeído e carboxila

Como já mencionado anteriormente, os grupos aldeído e carboxila podem se ligar com os grupos amina das enzimas. Para obter grupos aldeído ou carboxila, os grupos hidroxila da celulose são oxidados por diferentes métodos químicos.

A oxidação com periodato é o método de oxidação mais utilizado. Como pode ser observado na Figura 4, consiste em uma reação onde os

grupos 1,2-dihidroxil (glicol) são convertidos a grupos aldeídos emparelhados nas posições C2 e C3 de uma unidade de anidroglicose, a qual pode então se ligar às enzimas. Este método não apresenta reações secundárias significativas e é amplamente utilizado na análise estrutural de carboidratos (KIM *et al.*, 2000; LIU; CHEN, 2016). De acordo com Kim *et al.* (2000), a aplicação ou o entendimento quantitativo desta reação com a celulose, entretanto, tem sido dificultada pela complexidade resultante da formação de hemiacetal do aldeído e da natureza cristalina da celulose.

Figura 4 – Funcionalização da celulose através da oxidação com periodato.



Fonte: adaptado de LIU; CHEN (2016)

Diversos estudos têm ativado materiais têxteis celulósicos para a imobilização de enzimas (NIKOLIC *et al.*, 2010, 2011; SEABRA; GIL, 2007). Girelli, Salvagni e Tarola (2012) utilizaram periodato de sódio como agente ativo para funcionalizar diferentes suportes de celulose (cotonetes, algodão para remoção de maquiagem, pó de celulose, algodão e lenços) e imobilizar lipase de *Candida rugosa*. Wang *et al.* (2008)

trataram tecido de algodão para imobilizar catalase, obtendo alta atividade enzimática como resultado. Nikolic *et al.* (2014) oxidaram fibras de viscose para posterior imobilização de tripsina, obtendo até 83,8% da atividade enzimática inicial após 60 dias de armazenamento.

2.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE

As enzimas antimicrobianas, comuns na natureza, estão sob intensa investigação como uma alternativa sustentável aos compostos antimicrobianos já existentes e, embora intensamente pesquisadas na área de alimentos e farmacêuticas, não existe ainda nenhuma aplicação comercial na área têxtil (EDWARDS *et al.*, 2011; IBRAHIM *et al.*, 2007; PELCZAR; CHAN; KRIEG, 2000; SEABRA; GIL, 2007; THALLINGER *et al.*, 2013; VARTIAINEN; RÄTTÖ; PAULUSSEN, 2005).

Existem poucos trabalhos sobre o uso de enzimas antimicrobianas com aplicação na indústria têxtil (EDWARDS *et al.*, 2011; IBRAHIM *et al.*, 2007). Ibrahim *et al.* (2007) avaliaram a influência do tipo de tratamento da superfície de tecido de algodão na imobilização das enzimas Aquazym 240L, Bioprep 3000L e Dnilite IIS laccase, na sua atividade antimicrobiana. O tecido foi funcionalizado por dois diferentes métodos, visando a ativação do algodão com adição de grupos carboxila e tratamento com adição de grupos básicos e de cobre quelato, sendo os melhores resultados obtidos para a Bioprep 3000L imobilizada através do tratamento com cobre, que já é um agente antimicrobiano consolidado (GAO; CRANSTON, 2008; LIU; REN; LIANG, 2015; SHAHIDI; GHORANNEVISS; MOAZZENCHI, 2014; SUN, 2016; WINDLER; HEIGHT; NOWACK, 2013). Edwards *et al.* (2011) avaliaram a atividade antimicrobiana da lisozima contra *Micrococcus lysodeikticus*, imobilizada em três tipos diferentes de tecido de algodão.

Enzimas podem ser imobilizadas em matrizes de celulose através de métodos de interação físicos e químicos. Os métodos físicos, como adsorção, apresentam interação fraca entre a enzima e o suporte. As enzimas requerem a disponibilidade de grupos funcionais específicos para aumentar essa interação. Os grupos hidroxila presentes na fibra de algodão apresentam uma interação fraca com enzimas, sendo necessárias etapas adicionais de funcionalização e tratamento do tecido para obter uma imobilização por ligação covalente (LIU; CHEN, 2016; RISTIC' *et al.*, 2011; TRAN; BALKUS, 2011). A funcionalização do algodão pode ocorrer através da introdução de um grupo aldeído para reagir com o

grupo amina da enzima (EDWARDS *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2012; WU; LIA; HO, 2013) através da oxidação via periodato.

Não foram encontrados trabalhos relatando a imobilização de pectinases em derivados de celulose funcionalizados com periodato. Deste modo, buscando novas alternativas de imobilização, com baixo impacto ambiental, menores custos e maiores eficiências, buscou-se estudar a imobilização da enzima pectinolítica Bioprep 3000L, sua atividade enzimática, e antimicrobiana do produto têxtil obtido, através dos métodos de imobilização por adsorção, para o tecido de algodão sem funcionalização, e ligação covalente, para o tecido funcionalizado com periodato de sódio, de forma que este trabalho possa contribuir para futuros estudos e aplicações da imobilização desta enzima em suportes derivados de celulose, funcionalizados com periodato. Além disto, pode de ser uma alternativa aos compostos antimicrobianos já conhecidos, considerando que a resistência dos microrganismos a antibióticos aumenta a busca por novos compostos antimicrobianos.

Diante do que foi exposto neste capítulo e considerando o levantamento de trabalhos relevantes sobre a busca de compostos atóxicos, biodegradáveis, renováveis e de baixo impacto ambiental para a obtenção de têxteis antimicrobianos, as enzimas antimicrobianas, mostram-se uma alternativa promissora para o desenvolvimento de tecnologia para a produção de têxteis antimicrobianos, sendo um tema ainda pouco explorado nesta área.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os equipamentos, reagentes e procedimentos experimentais utilizados neste trabalho. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Transferência de Massa (LABMASSA) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina e as análises microbiológicas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Comunitária da Região de Chapecó - Unochapecó.

3.1 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados nesse trabalho foram:

- ✓ Agitador magnético (Dist);
- ✓ Banho termostatzado (Dist);
- ✓ Balança analítica (Micronal AB204-S);
- ✓ Espectrofotômetro (Shimadzu UV mini-1240);
- ✓ pHmetro (Quimis);
- ✓ Lavadora Ultrassônica (Unique);
- ✓ Estufa bacteriológica (Quimis modelo Q316M4);
- ✓ Autoclave (Phoenix).

3.2 REAGENTES

Os principais reagentes utilizados neste trabalho foram:

- ✓ Corante comassie brilliant blue G-250 (Vetec);
- ✓ Albumina de soro bovino (Sigma);
- ✓ Álcool etílico absoluto (Nuclear);
- ✓ Ácido o-fosfórico 85% (Nuclear);
- ✓ Carbonato de sódio (Lafan);
- ✓ Pectina cítrica (Vetec);
- ✓ Cloreto de sódio (Vetec);
- ✓ Cloreto de cálcio (Vetec);
- ✓ Ácido 3,5 dinitrossalicílico (DNS) (Sigma);
- ✓ Tartarato de sódio e potássio (Synth);
- ✓ Hidróxido de sódio (Nuclear);
- ✓ Glicose (Vetec);
- ✓ Fosfato de sódio dibásico dihidratado (Vetec);

- ✓ Fosfato de potássio monobásico (Vetec);
- ✓ Periodato de sódio (Neon);
- ✓ Ágar *Plate Count Agar* (PCA) (Merck);
- ✓ Ágar Sabouraud Cloranfenicol (Kasvi);
- ✓ Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Kasvi).

3.3 ENZIMAS

Neste trabalho foram utilizadas duas enzimas da Novozymes gentilmente fornecidas pela empresa AkmeY Biotecnologia Têxtil: uma pectinase alcalina declarada como pectato liase (E.C. 4.2.2.2) e uma α -amilase (E.C. 3.2.1.1).

As enzimas são preparações enzimáticas que foram selecionadas conforme recomendação da empresa fornecedora frente ao processo que se objetiva estudar neste trabalho. Os nomes comerciais e características fornecidas pela Novozymes são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Principais características das enzimas utilizadas no trabalho.

Enzima	α-amilase	Pectinase
Nome Comercial	Termamyl® 2X	Bioprep® 3000L
Origem/Fonte	<i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i>	<i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i>
pH ótimo	6 – 7	6 – 9
Temperatura ótima (°C)	90 – 105	50 – 60

Fonte: NOVOZYMES.

3.4 CEPAS DE MICRORGANISMOS

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados com cepas de bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 18112); cepas de bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); e cepa da levedura *Candida albicans* (ATCC 24433).

3.5 SUBSTRATO TÊXTIL

O substrato têxtil utilizado foi tecido tipo sarja, 100% algodão, com gramatura de 189 g.m⁻², obtido no comércio local.

3.6 CARACTERIZAÇÃO DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS

3.6.1 Determinação da concentração de proteína no extrato enzimático

A quantidade de proteínas presente nas amostras das preparações enzimáticas utilizadas foram dosadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), baseado na ligação do corante Comassie Brilliant Blue G-250 à proteína. De acordo com Zaia, Zaia e Lichti (1998), no pH de reação, a interação entre a proteína de alta massa molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm.

Para a preparação do reagente de Bradford foram dissolvidos 50 mg de corante Comassie Brilliant Blue G-250 em 25 mL de etanol absoluto, adicionou-se 50 mL de ácido *o*-fosfórico 85%, a solução foi diluída para 500 mL de água destilada e deixada por 30 min em ultrassom. Após esse tempo a solução foi filtrada em funil de Buchner e armazenada em frasco âmbar.

A curva de calibração para a determinação da concentração de proteína, apresentada no Apêndice A, foi preparada utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão, na faixa de concentração de 0 a 1 mg.mL⁻¹.

Para a análise foram utilizados 100 µL de extrato enzimático e adicionados a 5 mL do reagente de Bradford sob agitação. Após 10 min foi medida a absorbância em 595 nm. As medidas foram realizadas em triplicata de experimentos.

3.6.2 Determinação de açúcares redutores

A quantificação de açúcares redutores totais foi realizada pelo método de Miller (MILLER, 1959) utilizando ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Neste método, o DNS sofre redução de um de seus grupos nitro ao reagir com os carboidratos redutores, formando um composto que sofre forte absorbância em 540 nm.

O reagente DNS foi preparado pesando-se 75 g de tartarato de sódio e potássio (Sal de Rochelle) e dissolvendo-o em 70 mL de água destilada. Após completa dissolução, adicionou-se 4 g de NaOH sob agitação. Então, acrescentou-se de forma lenta 2,5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico no vórtice da solução em agitação. Após completa

dissolução, o volume final foi ajustado para 250 mL em um balão volumétrico, com água destilada.

A curva padrão com solução de glicose para determinação da concentração de açúcares redutores, apresentada no Apêndice B, foi determinada nas concentrações de 0 a 5 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ para a α -amilase e 0 a 3 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ para a pectinase.

Na realização da curva, foram realizadas as adições sequenciais de solução tampão fosfato, solução estoque de glicose e solução de DNS. Os tubos foram agitados, aquecidos durante 5 min a 100 °C, e resfriados em banho de gelo para a α -amilase e aquecidos durante 10 min a 100 °C, e resfriados em banho de gelo para a pectinase. Após o resfriamento das soluções, foi realizada a leitura da absorbância a 540 nm.

3.6.3 Determinação da atividade enzimática

3.6.3.1 Atividade da α -amilase livre

A atividade da α -amilase foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados durante a hidrólise do amido (BERNFELD, 1955). As condições ótimas de operação foram estudadas por Furlan (2012) e adotadas para a caracterização da enzima deste trabalho.

Um volume de 25 μL da solução de enzima 0,2% (v/v) foi incubado em tubo de ensaio a 45 °C na presença de 475 μL de 1% (m/v) de amido, 0,5 M de NaCl em tampão fosfato 0,05 M (pH 7,5) durante 15 min. Após este tempo adicionou-se 500 μL de DNS e a solução foi fervida por 5 min e resfriada em banho de gelo. A absorbância foi lida em 540 nm. Foram feitas amostras de branco adicionando o substrato, DNS e a solução de enzima, sequencialmente, de forma que sua atividade fosse imediatamente inativada pelo DNS e qualquer residual de açúcar redutor do extrato enzimático fosse descontado da atividade final.

A atividade enzimática (U_L) foi determinada pela Equação 1, expressa em U.mL^{-1} ou $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

$$U_L = \frac{[C].V_T.D_E}{t.V_E} \quad (1)$$

Onde, [C] é a concentração de açúcar redutor ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$), V_T é o volume total da solução (mL), D_E é a diluição da solução enzimática utilizada, t é o tempo de reação (min) e V_E é o volume da solução de enzima (mL).

3.6.3.2 Atividade da pectinase alcalina livre

A cadeia da pectina apresenta regiões onde o ácido galacturônico é substituído por açúcares redutores sob a ação da pectinase. A atividade da enzima foi determinada medindo-se o aumento de açúcares redutores presentes no meio. As condições ótimas de operação foram estudadas por Silva (2013) e Pimentel (2010) e adotadas para a caracterização da enzima deste trabalho.

Um volume de 100 μL da solução de enzima 0,05% (v/v) foi incubado em tubo de ensaio a 55 °C na presença de 900 μL de 0,5% (m/v) de pectina cítrica, 20 mM de NaCl e 0,1 mM de CaCl_2 em tampão fosfato 0,05 M (pH 8,5) durante 5 min. Após este tempo adicionou-se 1 mL de DNS e a solução foi fervida por 10 min e resfriada em banho de gelo. A absorbância foi lida em 540 nm. Foram feitas amostras de branco adicionando o substrato, DNS e a solução de enzima, sequencialmente, de forma que sua atividade fosse imediatamente inativada pelo DNS e qualquer residual de açúcar redutor do extrato enzimático fosse descontado da atividade final.

De forma análoga à α -amilase, a atividade pectinolítica foi determinada pela Equação 1 e expressa em $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ou $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS

3.7.1 Difusão em meio sólido com orifício

A atividade antimicrobiana das enzimas Bioprep 3000L e Termamyl 2X foram determinadas pelo método qualitativo de difusão em meio sólido com orifício, seguindo as recomendações do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (CLSI, 2012a).

As suspensões bacterianas foram repicadas e cultivadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) durante 24 h, a 37 °C, em estufa bacteriológica. Então, foram ajustadas para uma concentração de 10^8 $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Unidades Formadoras de Colônia por mL) utilizando a escala 0,5 de McFarland, e diluídas em salina estéril (0,85%) para a concentração de 10^4 $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Verteu-se meio de cultura *Plate Count Ágar* (PCA) nas placas de petri, deixando solidificar. Os microrganismos de interesse (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) foram semeados nas placas de ágar PCA com

o auxílio de um *swab*, realizando-se a semeadura em três direções garantindo a total deposição dos mesmos sobre o meio de cultura. Em cada placa, foram feitos três orifícios equidistantes, com diâmetro de aproximadamente 6 mm, sendo depositado nestes as preparações enzimáticas Bioprep® 3000L e Termamyl® 2X puras. Incubou-se a 37 °C por 24 h e, após decorrido este tempo, mensurou-se a zona de inibição de crescimento microbiano formada, com auxílio de uma régua milimétrica.

O procedimento para a levedura *Candida albicans*, sucedeu-se de forma análoga, no entanto, para esta, a suspensão da levedura foi repicada e cultivada em caldo BHI durante 24 h, a 27 °C, e após, verteu-se o meio de cultura Ágar Sabouraud Cloranfenicol e semeou-se a concentração de 10^6 UFC.mL⁻¹ utilizando a escala 0,5 de McFarland.

Todos os testes de difusão em meio sólido foram realizados em triplicata.

3.7.2 Técnica de microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada utilizando-se a metodologia descrita na CLSI (2012b), com modificações.

O teste de microdiluição em poços foi realizado em placas com 96 micropoços, contendo 100 µL de caldo BHI para os ensaios com bactérias e 100 µL de caldo Sabouraud para os ensaios com a levedura. Os testes foram realizados em triplicata, 200 µL da solução de Bioprep® 3000L ou Termamyl® 2X foi adicionada aos poços correspondentes à linha A. Após homogeneização das amostras, alíquotas de 100 µL foram transferidas sucessivamente para novos micropoços, obtendo-se assim soluções com diferentes concentrações. Para cada concentração, apresentadas na Tabela 4, foram adicionados 5 µL de cada inóculo de bactéria ou levedura investigado, na concentração de 10^4 UFC.mL⁻¹ e 10^6 UFC.mL⁻¹ utilizando a escala 0,5 de McFarland, respectivamente. As microdiluições foram realizadas tendo como padrão inicial a concentração de proteínas de cada preparado enzimático puro.

Tabela 4 – Concentrações de preparação enzimática avaliadas para CIM.

Amostra	Concentração de proteína da Termamyl® 2X ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Concentração de proteína da Bioprep® 3000L ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
A	67000,0	37000,0
B	33500,0	18500,0
C	16750,0	9250,0
D	8375,0	4625,0
E	4187,5	2312,5
F	2093,8	1156,3
G	1046,9	578,1
H	523,4	289,1

As microplacas contendo as bactérias foram incubadas em estufa microbiológica com temperatura controlada de 37 °C durante 24 h, e a microplaca contendo a levedura a 27 °C durante 24-48 h. Para a confirmação da presença de microrganismos viáveis nas concentrações não inibitórias, utilizou-se o a solução do corante de cloreto de trifeniltetrazólio 0,5% (TTC), no volume de 20 μL , que reflete a atividade das enzimas desidrogenases, envolvidas no processo de respiração celular, tornando possível a distinção das amostras vivas, coradas em vermelho, daquelas mortas, que mantêm a cor (MOTA *et al.*, 2012).

O controle positivo corresponde a 100 μL de BHI ou caldo Sabouraud e 5 μL de microrganismo, de modo a atestar que o caldo utilizado possibilita o crescimento dos microrganismos testados. O branco corresponde somente a 100 μL meio de cultura, de modo a atestar a esterilidade deste.

3.7.3 Definição da preparação enzimática de trabalho

Através dos resultados obtidos nos ensaios 3.7.1 e 3.7.2, definiu-se o extrato enzimático pectinolítico Bioprep® 3000L como o objeto de estudo deste trabalho, baseado na melhor eficiência e propriedade antimicrobiana apresentada.

3.8 FUNCIONALIZAÇÃO DO SUBSTRATO DE ALGODÃO

3.8.1 Oxidação via periodato de sódio

A produção de grupos aldeídos à cadeia de celulose do algodão foi realizada via reação com periodato, de acordo com Seabra e Gil (2007), com modificações. Durante o processo de ativação da celulose, amostras de tecido foram imersas em solução de metaperiodato de sódio 0,1 M, em uma razão de banho 1:30, a temperatura ambiente e ausência de luz.

O tempo de oxidação foi avaliado através da quantificação da concentração de metaperiodato de sódio. A quantidade de periodato consumido foi determinada pela medida da absorbância do líquido sobrenadante a 290 nm ao longo do tempo de reação (KIM; KUGA, 2001; MAEKAWA; KOSHIJIMA, 1984). A curva padrão para determinação da concentração de periodato, apresentada no Apêndice C, foi determinada nas concentrações de 0 a 4×10^{-3} mol.L⁻¹.

O consumo de periodato foi determinado conforme a Equação 2.

$$CP = \frac{[IO_4^-]_{inicial} - [IO_4^-]}{[IO_4^-]_{inicial}} \times 100 \quad (2)$$

Onde, CP é o consumo percentual de periodato (%), $[IO_4^-]_{inicial}$ é a concentração de periodato inicial da reação (mol.L⁻¹) e $[IO_4^-]$ é a concentração de periodato ao longo do tempo de reação (mol.L⁻¹).

Após definido o tempo de reação e submetidas ao tratamento de oxidação, as amostras foram lavadas com água destilada e secas à temperatura ambiente.

3.8.2 Confirmação da formação de grupos aldeídos

3.8.2.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (ATR-FTIR)

As medidas de ATR-FTIR das amostras foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC. Os espectros foram obtidos utilizando-se um espectrômetro modelo Cary 600 Series FTIR Spectrometer (Agilent Technologies), com um acessório de refletância total atenuada horizontal (ZnSe). As amostras foram colocadas

diretamente sobre o cristal e foi realizada a medida de 20 varreduras no intervalo 4000-500 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} , para cada amostra.

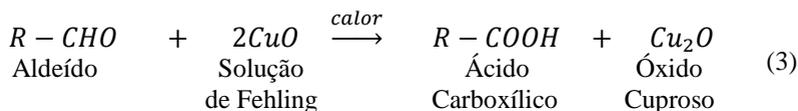
3.8.2.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A análise de DSC também foi realizada na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, em equipamento Jade-DSC – Perkin Elmer, utilizando cápsulas de alumina. A análise DSC foi realizada nas condições relatadas por Kim e Kuga (2001), com a temperatura variando de 25 à 400°C, velocidade de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ sob atmosfera de nitrogênio de 20 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.8.2.3 Teste de Fehling

A confirmação da formação de grupos aldeídos por Fehling foi realizada seguindo a metodologia descrita por Girelli, Salvagni e Tarola (2012) com algumas modificações. Reagiu-se 70 mg do tecido de algodão previamente ativado com 3 mL de Fehling reativo, obtido através da mistura de volumes iguais de Fehling A (69,27 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sulfato de cobre II penta hidratado) e Fehling B (362 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de tartarato de sódio e potássio e 100 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de hidróxido de sódio) a 100 $^{\circ}\text{C}$, durante 10 min.

O reagente de Fehling é composto pelo íon cúprico em solução básica, complexado com o ânion do ácido tartárico (MORITA; ASSUMPÇÃO, 2007). Quando o reagente de Fehling entra em contato com um aldeído, ocorre a oxidação desse aldeído em ácido carboxílico, reduzindo seu complexo azul de íon cúprico (Cu^{2+}) a íon cuproso de (Cu^{+}), que em solução básica é um precipitado marrom-avermelhado de Cu_2O , conforme apresentado na Equação 3.



3.9 ESTUDO DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DA PECTINASE

Foram realizados dois estudos para o processo de imobilização, ambos a partir de um planejamento fatorial completo 2^3 , com sua análise realizada por meio do software STATISTICA 7[®]. O primeiro estudo foi baseado no processo de imobilização via adsorção, no qual foi

considerado como matriz suporte o tecido de algodão sem funcionalização. O segundo baseou-se no processo de imobilização via ligação covalente, no qual utilizou-se como matriz suporte o tecido de algodão funcionalizado com periodato.

O planejamento experimental foi realizado com a finalidade de avaliar como as variáveis afetam o processo de imobilização enzimática, tendo como resposta a atividade da enzima imobilizada (item 3.11). Para o presente experimento foram consideradas como variáveis independentes: Temperatura (X1), Concentração da Enzima (X2) e pH (X3). Os valores de cada variável utilizada no planejamento foram definidos a partir de testes preliminares. Os valores da concentração de enzima avaliados levaram em consideração a concentração inibitória mínima encontrada no ensaio do item 3.7.2. A codificação das variáveis independentes e seus respectivos níveis são representados na Tabela 5.

Tabela 5 – Codificação das variáveis utilizadas no planejamento fatorial completo 2^3 .

Níveis	X ₁ Temperatura (°C)	X ₃ Concentração de enzima (mg.mL ⁻¹)	X ₂ pH
-1	25	10	7
(0)*	40	20	8
1	55	30	9

*ponto central

A partir da combinação entre os níveis das variáveis independentes proveniente do planejamento fatorial completo, o experimento referente aos estudos apresenta oito ensaios lineares. Para que seja possível realizar testes de curvatura e verificar o ajuste do modelo proposto, ainda foi considerado para o presente experimento, três réplicas referentes ao ponto central, como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6 – Matriz do planejamento 2³ com variáveis codificadas.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	(0)	(0)	(0)
10	(0)	(0)	(0)
11	(0)	(0)	(0)

Para a realização dos ensaios, as amostras de tecido foram imersas em soluções tampão com a enzima diluída na concentração de proteína desejada, em uma razão de banho de 1:30 (m/v), e colocadas em banho termostático durante 24 h sob agitação constante. Para o pH 7 e pH 8, utilizou-se solução tampão fosfato 0,05 M e para o pH 9, solução tampão Tris-HCl. Após a reação de imobilização, as amostras foram lavadas três vezes com água destilada, em uma relação de banho de 1:50 e então secas e armazenadas a temperatura ambiente.

Análise de variância (ANOVA), a um nível de significância de 95 %, e teste de falta de ajuste (*lack of fit*) foram realizados de modo a verificar a adequação dos dados experimentais obtidos aos modelos de regressão estatísticos.

3.10 ESTABILIDADE AO ARMAZENAMENTO

A enzima foi imobilizada via adsorção física e via ligação covalente, nas melhores condições encontradas através do estudo dos processos de imobilização, e foram armazenadas secas, à temperatura ambiente. Sua estabilidade ao armazenamento foi verificada periodicamente através da atividade enzimática do imobilizado (item 3.11) e da sua atividade antimicrobiana (item 3.12).

3.11 ATIVIDADE DA PECTINASE IMOBILIZADA

Para verificar a atividade da enzima imobilizada, reagiu-se 50 mg de tecido de algodão, contendo a enzima suportada, com 2 mL de solução

de pectina cítrica 0,5% (m/v), 20 mM de NaCl e 0,1 mM de CaCl₂, preparada em tampão fosfato 0,05 M (pH 8,5) durante 5 min, à temperatura de 55 °C, sob agitação mecânica. Após este tempo, coletou-se 1 mL do meio reacional e adicionou-se 1 mL de DNS. A solução foi fervida por 10 min e resfriada em banho de gelo. A absorbância foi lida em 540 nm. Foram feitas amostras de branco com o tecido sem enzima imobilizada.

De forma análoga à atividade da enzima livre, a atividade da enzima imobilizada (U_I) foi determinada de acordo com a Equação 4 e expressa em $U \cdot g^{-1}$ ou $\mu mol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$.

$$U_I = \frac{[C] \cdot V_T}{t \cdot m_S} \quad (4)$$

Onde, [C] é a concentração de açúcar redutor ($\mu mol \cdot mL^{-1}$), V_T é o volume total da solução (mL), t é o tempo de reação (min) e m_S é a massa de suporte (g).

3.11.1 Eficiência de imobilização

A eficiência de imobilização foi calculada através da relação entre a concentração de proteína total oferecida no início da imobilização e concentração de proteína total remanescente no sobrenadante, após a imobilização, conforme a Equação 5.

$$Y (\%) = \frac{[Proteína]_{inicial} - [Proteína]_{final}}{[Proteína]_{inicial}} \times 100 \quad (5)$$

Onde, Y é a eficiência de imobilização (%), $[Proteína]_{inicial}$ é a concentração de proteína oferecida no início da imobilização ($mg \cdot mL^{-1}$) e $[Proteína]_{final}$ é a concentração de proteína remanescente no sobrenadante ao final da imobilização ($mg \cdot mL^{-1}$).

3.11.2 Atividade recuperada

A atividade recuperada considera quanto de atividade enzimática é recuperada após o processo de imobilização em relação à quantidade de atividade enzimática oferecida inicialmente pela enzima livre, em solução. Também é considerado no cálculo da atividade recuperada, o volume de extrato enzimático utilizado na imobilização e a massa total de

imobilizado produzido, conforme a Equação 6 (SHELDON; VAN PELT, 2013).

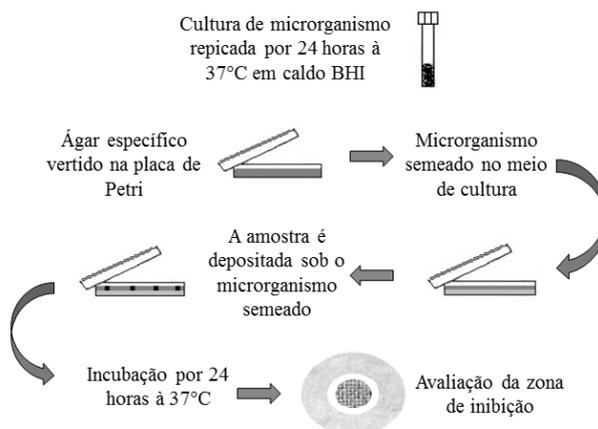
$$AR (\%) = \frac{U_I \times m_S}{U_0 \times V_E} \times 100 \quad (6)$$

Onde, AR é a atividade recuperada (%), U_I é atividade da enzima imobilizada ($U.g^{-1}$), U_0 ($U.mL^{-1}$) é a atividade do extrato pectinolítico livre oferecido para a imobilização, m_S (g) é a massa total de suporte utilizada e V_E (mL) é o volume de extrato enzimático utilizado na imobilização.

3.12 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA ENZIMA IMOBILIZADA

A atividade antimicrobiana foi avaliada através da técnica qualitativa de difusão em ágar, para uma bactéria gram-negativa (*Escherichia coli*), uma bactéria gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e uma levedura (*Candida albicans*), adaptada através da AATCC 147:2004 e da norma internacional ISO 20645:2004, esquematizada na Figura 5.

Figura 5 – Avaliação da atividade antimicrobiana através do método de difusão em ágar.



De forma análoga ao item 3.7.1, as colônias de bactérias Gram-positiva ou Gram-negativa e da levedura foram semeadas em placa de Petri contendo o meio de cultura específico para cada microrganismo. Amostras de tecidos foram colocadas sobre os microrganismos semeados e as placas foram incubadas em estufa à 37 °C por 24 h no caso das bactérias, e à 27 °C por 24 h no caso da levedura.

A zona de inibição média, em ambos os lados da amostra, foi calculada conforme a Equação 7.

$$ZI = \frac{L_Z - L_T}{2} \quad (7)$$

Onde ZI é a zona de inibição em torno da amostra (mm), L_Z é a largura da zona de inibição total (mm) e L_T é a largura do tecido (mm).

A AATCC 147:2004 determina que o tamanho da zona de inibição não pode ser interpretado como uma avaliação quantitativa de atividade antibacteriana. Os materiais tratados devem ser comparados com um material correspondente não tratado e uma amostra de material com atividade bacteriostática conhecida, sendo que o critério de aprovação do teste deve ser acordado de acordo com as partes interessadas. No entanto, para constituir uma atividade antibacteriana aceitável, não deve haver colônias de microrganismos diretamente sob a área de contato da amostra.

Já de acordo com a norma internacional ISO 20645:2004, o tecido mostra um bom efeito antibacteriano se não houver zona de inibição e nenhum crescimento de cepas Gram-negativas e Gram-positivas embaixo do têxtil antibacteriano.

Neste trabalho, zonas de inibição maiores ou iguais a 1 mm serão classificadas como satisfatórias e se a amostra é totalmente coberta pelas colônias de microrganismos, a propriedade antimicrobiana é classificada como insuficiente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos através da metodologia apresentada no Capítulo 3.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS

As enzimas α -amilase e pectinase foram avaliadas quanto à quantidade de proteína total e atividade enzimática. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 7.

4.1.1 Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína das preparações enzimáticas utilizadas foi determinada segundo o método de Bradford, descrito no item 3.6.1. Os resultados obtidos nos ensaios são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultados obtidos para a caracterização das preparações enzimáticas comerciais.

Enzima	Proteína total (mg.mL ⁻¹)	Atividade enzimática (U.mL ⁻¹)	Atividade enzimática específica (U.mg ⁻¹)
Termamyl® 2X	67,0	4532,2	67,7
Bioprep® 3000L	37,0	14162,1	390,6

A determinação da concentração de proteína é importante para a determinação e discussão da atividade enzimática específica. Apesar disto, avaliando-se a quantidade de proteínas isoladamente, não se pode afirmar que uma alta concentração proteica esteja relacionada a uma alta atividade enzimática, tendo em vista que se trata de um preparado enzimático e a enzima declarada do caldo pode não ser o único componente de natureza proteica presente, além da possibilidade de haver enzimas desnaturadas no meio, que não apresentam atividade.

Uma das formas de promover a comparação da atividade enzimática entre diferentes estudos, porém em mesmas condições operacionais, é através da atividade específica, a qual é expressa pela razão entre a atividade enzimática encontrada e a quantidade de proteína. As preparações enzimáticas comerciais foram caracterizadas para a atividade amilolítica e pectinolítica, respectivamente.

A empresa Novozymes declara que a Termamyl® 2X® possui atividade amilolítica de 240 KNU-T/g e a BioPrep® 3000L possui atividade pectinolítica de 3000 APSU-CA/g, entretanto, os valores de atividade fornecidos pela empresa não podem ser comparados com os obtidos neste trabalho, devido ao fato de as metodologias utilizadas serem diferentes.

Em estudo avaliando a atividade da enzima Termamyl® 2X, Costa (2014) obteve uma atividade de $824,56 \pm 6,93 \text{ U.mL}^{-1}$, trabalhando em solução de enzima 10% (v/v), concentração de amido de 0,7% (m/v), 10 min de reação, a 60 °C. Na caracterização da enzima comercial Bioprep® 3000L, Silva (2013) encontrou uma atividade enzimática de $578,97 \pm 11,13 \text{ U.mL}^{-1}$ e atividade específica de $16,08 \text{ U.mg}^{-1}$, em pH 8, 55 °C, 5 min de reação e concentração de 0,25% (m/v) de pectina cítrica, enquanto Pimentel (2010) encontrou uma atividade enzimática de 2553 U.mL^{-1} , em pH 8,5, 55 °C, 5 min de reação e concentração de 0,25% (m/v) de pectina cítrica.

Além da metodologia utilizada, o resultado da determinação da atividade enzimática é função das condições operacionais em que esta é determinada, como pH, temperatura, substrato e tempo de reação. Aliado a isto, é importante ressaltar que a quantificação da atividade enzimática adotada nestes estudos, expressa em U.mL^{-1} , calculada através da Equação 1, também depende da diluição de enzima usada na reação. Todos estes fatores atrelados dificultam a comparação de resultados.

4.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS

As enzimas α -amilase e pectinase foram avaliadas quanto à formação de zonas de inibição e à sua Concentração Inibitória Mínima (CIM). As preparações enzimáticas comerciais foram caracterizadas quanto à atividade antimicrobiana conforme descrito nos itens 3.7.1 e 3.7.2.

Os resultados obtidos para as preparações enzimáticas puras no teste de difusão em ágar com orifício podem ser visualizados nas Figuras 6 e 7 são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Diâmetros médios para as zonas de inibição.

Microorganismo	Diâmetro de inibição (mm)	
	Termamyl® 2X	Bioprep® 3000L
<i>Staphylococcus aureus</i>	20,7 ± 0,6	30,0 ± 1,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	22,3 ± 0,6	29,7 ± 0,6
<i>Escherichia coli</i>	0	21,3 ± 0,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	11,7 ± 0,6
<i>Candida albicans</i>	0	21,7 ± 0,6

Figura 6 – Resultados dos testes de difusão em ágar para o extrato amilolítico para diferentes microrganismos.

(a) *Staphylococcus aureus*, (b) *Staphylococcus epidermidis*, (c) *Escherichia coli*, (d) *Pseudomonas aeruginosa*, (e) *Candida albicans*.

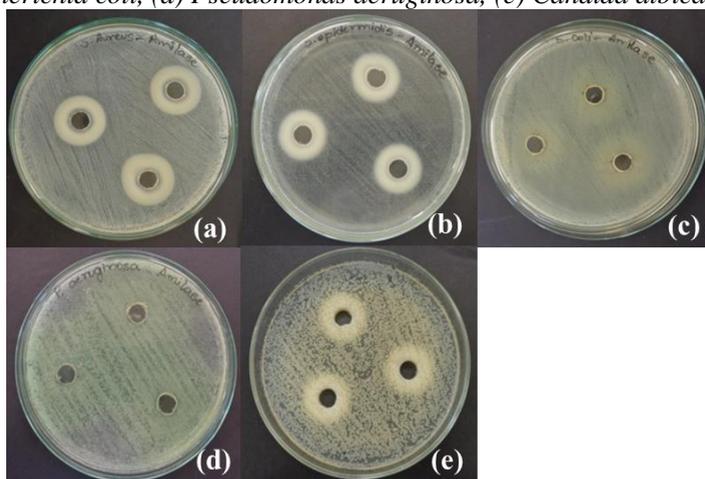
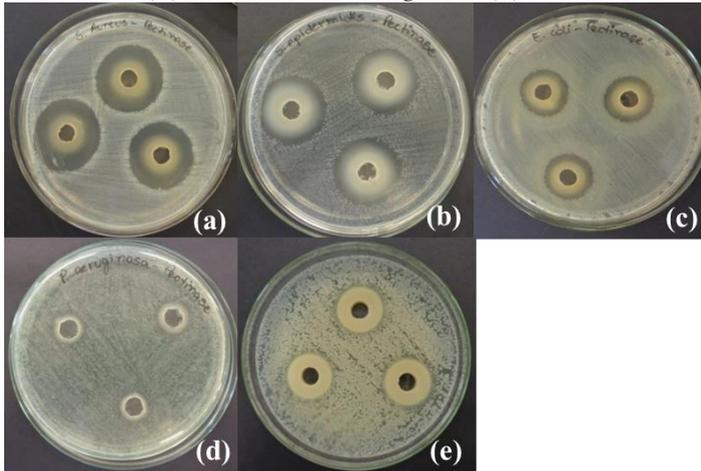


Figura 7 – Resultados dos testes de difusão em ágar para o extrato pectinolítico para diferentes microrganismos.

(a) *Staphylococcus aureus*, (b) *Staphylococcus epidermidis*, (c) *Escherichia coli*, (d) *Pseudomonas aeruginosa*, (e) *Candida albicans*.



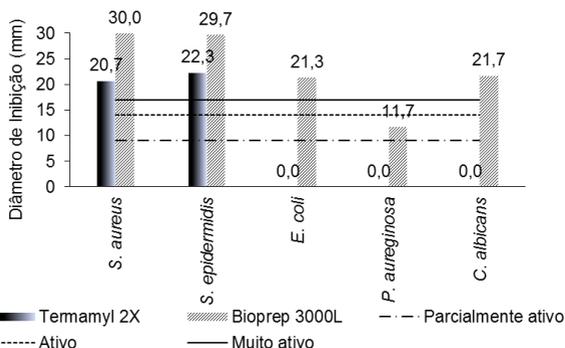
O teste de difusão em meio de cultura sólido é um método qualitativo de fácil execução, boa reprodutibilidade e baixo custo, utilizado para verificar a sensibilidade de microrganismos à agentes antimicrobianos. Os critérios estabelecidos pela norma M02-A11 do *Clinical and Laboratory Standards Institute Standards* (CLSI, 2012a), empregados em estudos clínicos de antibióticos, classificam os agentes antimicrobianos em sensível, intermediário ou resistente, de acordo com o diâmetro dos halos de inibição formados, o agente antimicrobiano clínico utilizado e o microrganismo testado.

Alguns estudos, como o de Ponce *et al.* (2003) e Zanetti *et al.* (2015), onde a atividade antimicrobiana de óleos essenciais foram avaliadas, classificaram as zonas de inibição como não ativo para diâmetro menor que 8 mm, parcialmente ativo para diâmetro entre 9 e 14 mm, microbiologicamente ativo para diâmetro entre 14 e 17 mm e muito ativo para diâmetros maiores que 17 mm.

Desta forma, a análise qualitativa dos compostos em estudo sugere que houve atividade antimicrobiana para os microrganismos investigados, e que o preparado enzimático Bioprep® 3000L apresenta maior atividade antimicrobiana frente ao preparado enzimático Termamyl® 2X. Tendo como base os resultados obtidos no teste qualitativo e os estudos existentes na área, o extrato pectinolítico

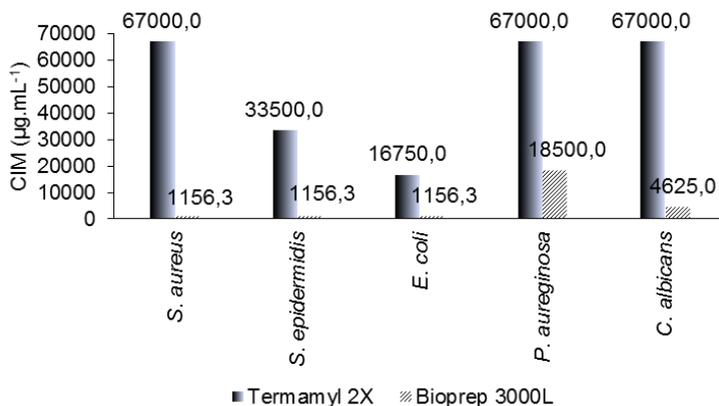
apresentou-se como uma alternativa altamente viável para aplicação em têxteis antimicrobianos, sendo classificado, segundo a metodologia de Ponce *et al.* (2003) e Zanetti *et al.* (2015), como muito ativo para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *C. albicans*, conforme representado na Figura 8.

Figura 8 – Diâmetro médio de inibição das enzimas para diferentes microrganismos.



Uma análise quantitativa mais aprofundada das preparações enzimáticas é apresentada através da avaliação das CIM das preparações enzimáticas no teste de microdiluição em caldo, na Figura 9.

Figura 9 – Concentração inibitória mínima de extrato enzimático para diferentes microrganismos.



A norma M07-A9 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012b) estabelece que as soluções padrão de agente antimicrobiano devem ser preparadas em concentrações de, pelo menos, $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ou dez vezes a concentração mais alta a ser testada, das duas a maior. As microdiluições foram realizadas tendo como padrão inicial a concentração de proteínas de cada preparado enzimático puro. Entretanto, assim como no teste de difusão em meio sólido, a interpretação da CIM ideal depende do tipo de antibiótico aplicado e da aplicação.

A partir da Figura 9 observa-se que, assim como no teste qualitativo de difusão em meio sólido, o extrato pectinolítico Bioprep® 3000L apresentou melhor atividade antimicrobiana comparado ao extrato amilolítico Termamyl® 2X, inibindo o crescimento das bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*, principais microrganismos investigados, em concentrações acima de $1156,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o que equivale a aproximadamente 3% (v/v) do extrato pectinolítico puro. Também apresentou inibição em concentrações acima de $18500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (50% v/v) e $4625 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (12,5% v/v) para *P. aeruginosa* e *C. albicans*, respectivamente.

Ambos os testes qualitativo e quantitativo foram realizados em meio de cultura com pH próximo ao neutro de forma que esta variável não influencie ou favoreça uma das atividades enzimáticas dos extratos estudados.

Ponce *et al.* (2003) avaliaram 12 tipos de óleos essenciais e encontraram que os óleos essenciais de *Eucalyptus globules* (eucalipto), *Melaleuca alternifolia* (árvore-do-chá, em inglês *tea tree*) e *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia) tem potencial tecnológico para aplicação como agentes sanitizantes, sendo ativos contra uma cultura mista composta de bactérias mesofílicas aeróbias, *Enterobacteriaceae*, bactérias psicrotólicas, bactérias lácticas e bolores e leveduras, com halos de diâmetros médios 16, 17 e 22 mm, e CIM de $0,1-0,15 \text{ mL.100mL}^{-1}$, $0,05-0,08 \text{ mL.100mL}^{-1}$ e $0,04-0,05 \text{ mL.100mL}^{-1}$, respectivamente.

Zanetti *et al.* (2015) avaliaram a sensibilidade antimicrobiana do geraniol e ácido cinâmico contra *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*. Neste estudo, o geraniol apresentou maior atividade antimicrobiana, com diâmetro médio de inibição de $35,3 \pm 0,08$ mm e CIM de $5000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contra *Staphylococcus aureus*, $25,5 \pm 0,05$ mm e CIM de $2500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contra *Escherichia coli*, $17,6 \pm 0,15$ mm e CIM de $5000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contra *Salmonella enterica* e $15,8 \pm 0,04$ mm e CIM de $2500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contra *Listeria monocytogenes*, sendo classificado como muito ativo para

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* e como microbiologicamente ativo para *Listeria monocytogenes*.

Nanopartículas de ZnO, um dos antimicrobianos utilizados no setor têxtil, por exemplo, apresentaram diâmetro médio de 27 nm e 22 nm para *S. aureus* resistente à meticilina e *E. coli*, respectivamente (ANITHA *et al.*, 2013). Bhadra *et al.* (2011) encontraram zonas de inibição para *E. coli* de aproximadamente 21 mm utilizando quitosana e 24 mm para quitosana recoberta com nanopartículas de ZnO, comparado a 22 mm para o antibiótico clínico amoxicilina. Nanopartículas de cobre, outro exemplo utilizado no setor têxtil, no estudo de Chidurala, Kalagadda e Tambur (2016) apresentaram zonas de inibição de aproximadamente 15 mm, 29 mm e 23 mm contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*, respectivamente, enquanto o antibiótico cotrimoxazol apresentou halos de 26 mm, 29 mm e 43 mm.

O mecanismo de ação antimicrobiano do extrato pectinolítico ainda é um fator desconhecido. De acordo com Thallinger *et al.* (2013) algumas enzimas apresentam habilidades para atacar diretamente microrganismos, interferir na formação ou destruir biofilmes e catalisar reações que resultam na produção de compostos antimicrobianos. Estudos envolvendo lisozima, uma hidrolase, sugerem que esta destrói a parede celular de bactérias Gram-positivas através da ruptura da ligação β (1-4) entre o ácido N-acetilurâmico e N-acetilglicosamina do peptidoglicano, resultando na entrada de água na célula, causando a lise celular. Esta propriedade de hidrolisar o peptidoglicano é conhecida como atividade de neuraminidase ou muramidase (CARRILLO, 2013; IBRAHIM; MATSUZAKI; AOKI, 2001). É importante ressaltar que nas bactérias Gram-positivas, o peptidoglicano representa cerca de 90% da parede celular, enquanto que nas bactérias Gram-negativas, apenas cerca de 10%. Isto explica a dificuldade de inativar bactérias Gram-negativas, uma vez que a maioria dos antimicrobianos atua sob o peptidoglicano. Além disso, as hidrolases também atuam sobre a quitina, componente da parede celular fúngica (JOLLÈS; JOLLÈS, 1984).

A Bioprep® 3000L é uma pectato liase. As liases rompem ligações glicosídicas resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 do final não redutor do ácido galacturônico formado (UENOJO; PASTORE, 2007). Desta forma, acredita-se que esta enzima atue de forma semelhante à lisozima, rompendo a parede celular microbiana e causando a lise da célula.

Estes resultados mostram que o preparado Bioprep® 3000L é um agente antimicrobiano promissor, com longo espectro de aplicação tendo

em vista que os microrganismos investigados são ubiqüitários e estão relacionados a casos que vão desde intoxicações alimentares à infecções e problemas hospitalares, podendo assim ser utilizado como agente biostático para controle da proliferação do crescimento microbiano.

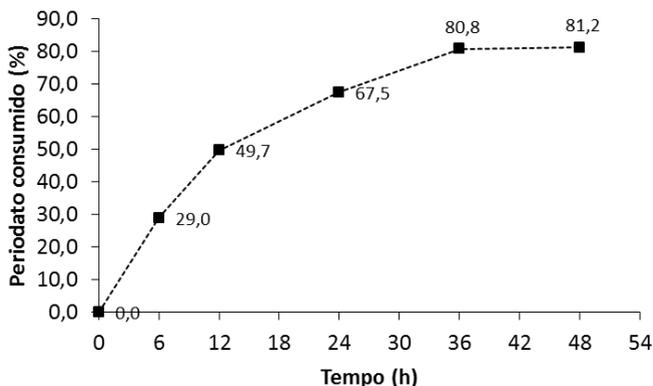
Desta forma, através dos melhores resultados de atividade antimicrobiana apresentados, o extrato enzimático Bioprep® 3000L foi definido como objeto de estudo para imobilização no substrato de algodão e obtenção do têxtil antimicrobiano.

4.3 FUNCIONALIZAÇÃO DO SUBSTRATO DE ALGODÃO

Para criar grupos funcionais aldeído que possam se ligar covalentemente com a enzima em estudo, o substrato de algodão foi tratado quimicamente via oxidação com periodato de sódio, como descrito no item 3.8.1.

O consumo percentual de periodato ao longo da reação é apresentado na Figura 10.

Figura 10 – Consumo de periodato de sódio durante a oxidação do tecido de algodão.



Através da Figura 10 observa-se que o consumo máximo de periodato, de aproximadamente 80%, e conseqüentemente o maior grau de oxidação alcançado, ocorreu após 36 h de reação. No entanto, durante este estudo, observou-se perda de massa e uma alteração visual na resistência do tecido, apresentando este uma textura mais rígida quando submetido a um tempo de reação maior que 24 h. Desta forma, optou-se por trabalhar com um menor grau de oxidação, porém uma melhor qualidade do tecido facilitando sua posterior aplicação. Em seus estudos,

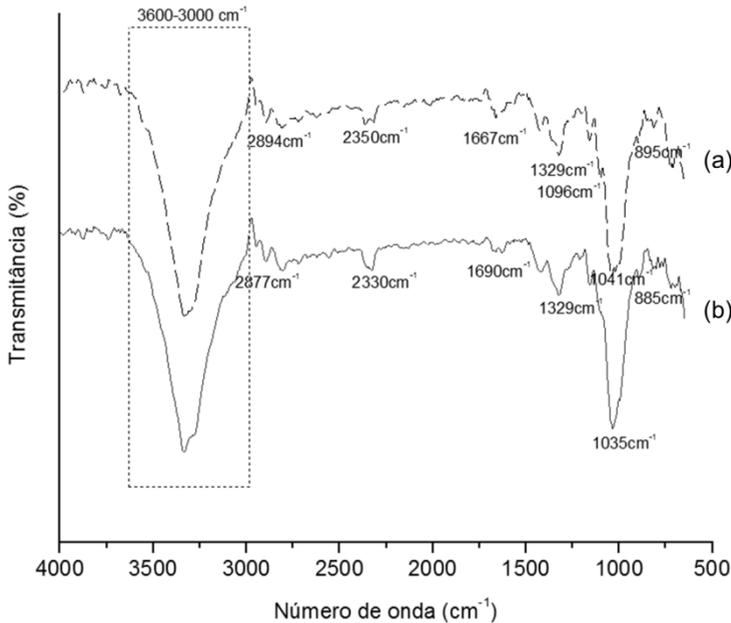
Princi *et al.* (2004) e Wu *et al.* (2013) também observaram que as fibras oxidadas tornaram-se rígidas e frágeis quando oxidadas por um longo período, além da perda de peso e formação de fragmentos solúveis. Wu *et al.* (2013) observaram uma diferença desproporcional entre a quantidade de periodato consumido e a quantidade de aldeído formado, sendo que esta diferença se tornou maior para maiores concentrações de periodato de sódio, e atribuíram esta diferença ao fato de que muito periodato foi consumido pela degradação da celulose em fragmentos. Para quantificar esta interferência do tratamento de funcionalização na qualidade do tecido, seria interessante futuramente realizar as análises de resistência do tecido ao rasgo e à tração e alongamento, em função do tempo de oxidação com periodato de sódio.

Segundo Calvini *et al.* (2006), pelo menos três reações ocorrem simultaneamente durante a oxidação da celulose. Um ataque rápido, porém limitado, de periodato ocorre na região amorfa da celulose, causando a diminuição do grau de polimerização. Uma segunda reação lenta, atribuída à oxidação na superfície de cristalitos e uma reação muito lenta, possivelmente devido à oxidação dos núcleos cristalinos. Foi observado que, à medida que a oxidação prosseguia, a quantidade de região amorfa não oxidada diminuía levando à queda da taxa de oxidação.

A Figura 11 apresenta os espectros de FTIR do substrato algodão antes do tratamento com periodato, realizada no lado direito e no lado avesso do tecido.

O algodão é a fibra mais importante e mais consumida na indústria têxtil brasileira. Segundo Erhardt (1975), o algodão é a forma mais pura de celulose encontrada na natureza e caracteriza-se por ser uma fibra unicelular de origem vegetal, a qual cresce nas sementes de diversos gêneros *gossypium* (algodoeiro). A fibra de algodão crua, após a limpeza mecânica, possui uma composição química de aproximadamente 95% de celulose e algumas impurezas não celulósicas, tais como proteínas, aminoácidos, outros componentes nitrogenados, ceras, substâncias pécnicas, ácidos orgânicos, açúcares, sais inorgânicos e uma pequena quantidade de pigmentos (WAKELYN *et al.*, 2007).

Figura 11 – Espectros FTIR para o substrato de algodão sem tratamento.
 (a) Lado direito do tecido, (b) Lado avesso do tecido.



Através da análise da Figura 11, observa-se espectros característicos da celulose, como a existência de bandas atribuídas aos grupos hidroxílicos (estiramento O-H celulósico) na região de 3600-3000 cm^{-1} , alongamento C-H alifáticos na região de 2900 cm^{-1} , deformação angular dos grupos C-H em 1329 cm^{-1} , deformação angular de ligações C-O de álcoois primários em 1096 cm^{-1} , banda de absorção das ligações C-O-C, que representa a vibração do anel de piranose em 1041 cm^{-1} e 1035 cm^{-1} e ligações β -glicosídicas entre unidades de glicana em 895 e 885 cm^{-1} , características de celulose (DA SILVA, 2014; OH *et al.*, 2005; PRABHU; VAIDEKI; ANITHA, 2017; SCHWANNINGER *et al.*, 2004). A banda na região de 2300 cm^{-1} pode ser associado à grupos nitrila presentes em corantes reativos e branqueadores ópticos contendo triazina, por exemplo (GUARATINI; VALNICE; ZANONI, 2000; YUEN *et al.*, 2005).

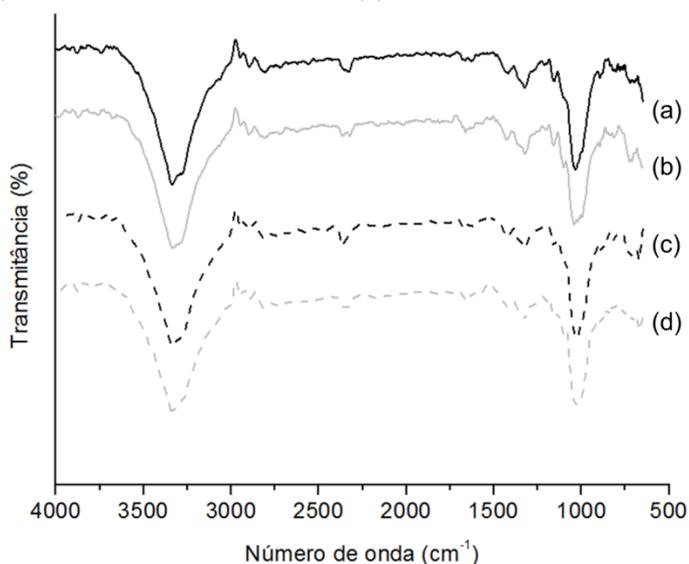
A Figura 12 apresenta a comparação de FTIR do substrato algodão antes do tratamento e após o tratamento com periodato, realizada nos lados direito e avesso do tecido.

Aldeídos e cetonas mostram uma banda forte, proeminente, em torno de 1740 cm^{-1} . Esta banda é devido à ligação altamente polar $\text{C}=\text{O}$. Devido aos aldeídos também conter uma ligação $\text{C}-\text{H}$ do carbono sp^2 da ligação $\text{C}=\text{O}$, eles também mostram um par de bandas de resistência média posicionado na faixa de $2700\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$. Estas bandas estão ausentes no espectro de uma cetona porque o carbono sp^2 da cetona não tem a ligação $\text{C}-\text{H}$ (KIM *et al.*, 2000; MIAO *et al.*, 2011; NIKOLIC *et al.*, 2014; SCHWANNINGER *et al.*, 2004).

Através dos resultados apresentados na Figura 12, observa-se um leve estiramento na região de $1750\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$, indicando uma possível alteração na estrutura química da amostra e uma suposta formação de grupos aldeídos.

Figura 12 – Espectros FTIR comparando o substrato de algodão antes e após o tratamento com periodato.

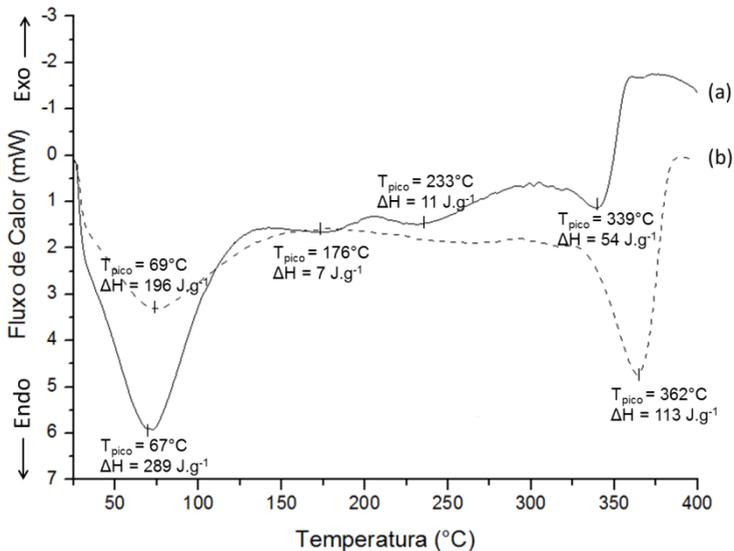
- (a) Lado avesso sem tratamento, (b) Lado direito sem tratamento,
(c) Lado avesso com tratamento, (d) Lado direito com tratamento



Segundo Kim e Kuga (2001) e Vicini *et al.* (2004), o aumento do grau de oxidação da celulose diminui a intensidade dos picos cristalinos aumentando a fase amorfa e reduzindo a temperatura da decomposição. Desta forma, a Figura 13 apresenta as curvas DSC a fim de avaliar o comportamento do processo de oxidação do tecido com periodato.

Figura 13 – Curvas DSC do substrato de algodão.

(a) Tratamento com periodato, (b) Sem tratamento com periodato

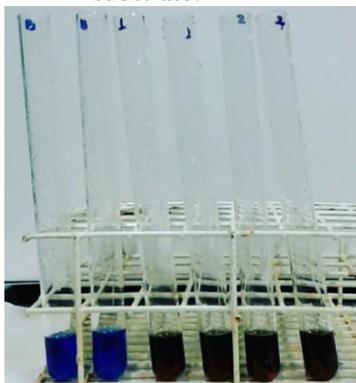


A partir da Figura 13, observou-se que o pico endotérmico e a temperatura de decomposição diminuíram após o tratamento com metaperiodato de sódio de 362 °C a 339 °C, sugerindo o processo de oxidação e a formação do grupo aldeído no algodão tratado. Dois outros picos endotérmicos foram observados na região de 176 °C e 233 °C após o tratamento. De acordo com Vicini *et al.* (2004), essas mudanças podem estar associadas à cisão térmica facilitada de ligações covalentes levando à geração de substância volátil.

A formação de aldeídos também é confirmada através do teste de Fehling. O reagente de Fehling, descoberto pelo químico alemão Hermann Von Fehling (1812 - 1885), é um reagente usado para promover a oxidação seletiva dos aldeídos e para a oxidação de carboidratos.

A Figura 14 apresenta o resultado do teste de Fehling, comparando o substrato sem e com tratamento. Na imagem, os dois primeiros tubos de ensaio contendo amostras correspondem à duplicata do substrato de algodão sem tratamento. Os demais tubos de ensaio correspondem a amostras de substratos submetidas ao tratamento com periodato.

Figura 14 – Teste de Fehling para a confirmação da funcionalização do substrato.



O teste qualitativo de Fehling confirmou a formação de grupos aldeído ao substrato após o tratamento com periodato uma vez que foi observado a variação de cor nas soluções correspondentes às amostras funcionalizadas, de azul para marrom-avermelhado, devido à redução do íon cúprico a íon cuproso, após a oxidação do grupo funcional aldeído à ácido carboxílico, conforme descrito anteriormente pela Equação 3, no item 3.8.2.3 (MORITA; ASSUMPÇÃO, 2007).

4.4 ESTUDO DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DA PECTINASE

4.4.1 Imobilização via adsorção

Dependendo da natureza das forças envolvidas, a imobilização por adsorção pode ser classificada quanto a sua intensidade em adsorção física e adsorção química. No caso de adsorção física, ou fisissorção, a ligação da enzima à superfície do adsorvente envolve uma interação relativamente fraca que pode ser atribuída às forças de Van der Waals, que são similares às forças de coesão molecular. A adsorção química, ou quimissorção, envolve a troca ou partilha de elétrons entre as moléculas da enzima e a superfície do adsorvente, resultando em uma ligação química e, portanto, bem mais forte que no caso da fisissorção (NASCIMENTO *et al.*, 2014). Estes dois mecanismos de adsorção não são completamente independentes. A distinção quanto à espécie ser física ou quimicamente adsorvida não é muito clara, pois, muitas vezes, ambos

os processos podem ser descritos em termos dos princípios da adsorção física (ADAMSON; GAST, 1997; NASCIMENTO *et al.*, 2014).

Buscando melhores respostas de atividade para a enzima imobilizada, avaliou-se a influência das variáveis Temperatura (X1, °C), concentração da enzima (X2, mg_{proteína}.mL⁻¹) e pH (X3) para o extrato pectinolítico imobilizado em tecido 100% algodão através do processo de adsorção, conforme descrito no item 3.9. A Tabela 9 apresenta a análise de variância (ANOVA) do planejamento proposto.

Tabela 9 – ANOVA para as variáveis estudadas no processo de imobilização por adsorção.

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	P
Curvatura	27,5157	1	27,5157	52,2987	0,0186*
Temperatura (1)	15,9988	1	15,9988	30,4088	0,0313*
Concentração de enzima (2)	0,1864	1	0,1864	0,3543	0,6121
pH (3)	21,9412	1	21,9412	41,7035	0,0231*
1 by 2	0,9716	1	0,9716	1,8468	0,3071
1 by 3	10,4594	1	10,4594	19,8800	0,0468*
2 by 3	5,5427	1	5,5427	10,5349	0,0832
Falta de ajuste (<i>Lack of fit</i>)	0,1726	1	0,1726	0,3281	0,6246

*Significativo a 5%

Apesar da significância resultante das variáveis independentes temperatura, pH e interação entre estas ($p < 0,05$), o modelo linear proposto não se apresentou adequado para descrever o fenômeno estudado, uma vez que se observa valores significativos referentes à curvatura.

As Figuras 15 e 16 apresentam o gráfico de Pareto e o gráfico de contorno, respectivamente, referentes ao estudo de imobilização via adsorção, onde observa-se que, embora pequeno, a variável pH apresenta efeito significativo positivo e a temperatura apresenta efeito significativo negativo sobre a resposta, refletindo em um aumento de aproximadamente 3 vezes no valor da atividade do imobilizado, em relação à menor resposta de atividade enzimática obtida. A Figura 16 também evidencia o efeito significativo da interação entre o pH e a temperatura na resposta da atividade do imobilizado.

O fenômeno de imobilização por adsorção é resultado de uma combinação entre os tipos de forças envolvidas na adsorção física e química. Desta forma, são vários os fatores que influenciam o processo de adsorção, como a área superficial, as propriedades do adsorvente e do adsorbato, a temperatura do sistema, natureza do solvente e o pH do meio (NASCIMENTO *et al.*, 2014)

O pH do meio de imobilização modifica as interações entre grupos de carga elétrica, ou dipolo, da enzima e do suporte, o que influencia na afinidade entre os mesmos (GELUK *et al.*, 1992). O estudo experimental da influência do pH torna-se necessário para entender a sua influência no processo de imobilização, uma vez que a predição teórica da sua influência na atividade catalítica de uma enzima requer o conhecimento das características do sítio ativo e de sua estrutura química, que são muito difíceis de serem obtidas (LIU, 2013).

Observou-se melhores respostas de atividade para os ensaios de imobilização na menor temperatura, de 25 °C. Sabe-se que quanto maior a temperatura, maior a agitação das moléculas e maior a tendência das mesmas de se dessorverem, tendo em vista que a adsorção é um processo exotérmico e, de acordo com princípio de Le Chatelier, o aumento da temperatura desloca o equilíbrio da reação e favorece o processo inverso da mesma, ou seja, a dessorção da enzima.

Com base nesta resposta, e considerando que a concentração de enzima não se mostrou significativa, definiu-se o pH 9, a temperatura de 25°C e a concentração de enzima de 10 mg.mL⁻¹ como condições de trabalho para a imobilização por adsorção, visando também os menores custos energéticos do processo.

Figura 15 – Gráfico de Pareto dos parâmetros avaliados durante a imobilização por adsorção.

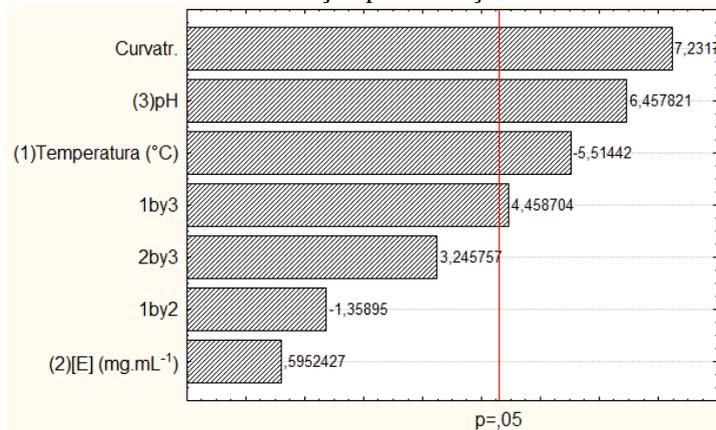
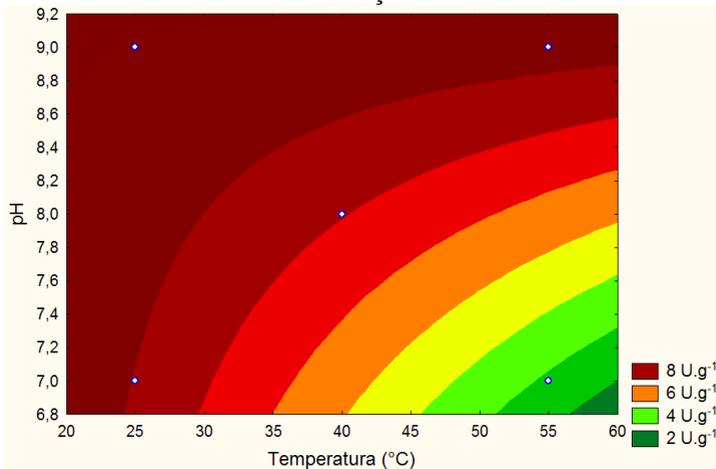


Figura 16 – Gráfico de contorno para o processo de imobilização por adsorção.



4.4.2 Imobilização via ligação covalente

De forma análoga à imobilização por adsorção, avaliou-se a influência das variáveis Temperatura (X1, °C), concentração da enzima (X2, mg_{proteína}.mL⁻¹) e pH (X3) na atividade enzimática do extrato pectinolítico imobilizado em tecido 100% algodão funcionalizado com

metaperiodato de sódio através do processo de ligação covalente, conforme descrito no item 3.9.

A Tabela 10 apresenta a análise de variância (ANOVA) do planejamento proposto para o processo de imobilização por ligação covalente.

Tabela 10 – ANOVA para as variáveis estudadas no processo de imobilização por ligação covalente.

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	P
Temperatura (1)	349,7177	1	349,7177	2276,690	0,0004*
Concentração de enzima (2)	0,1171	1	0,1171	0,762	0,4747
pH (3)	75,1856	1	75,1856	489,465	0,0020*
1 by 2	13,8720	1	13,8720	90,308	0,0109*
1 by 3	21,1997	1	21,1997	138,012	0,0072*
2 by 3	35,9094	1	35,9094	233,773	0,0042*
Falta de ajuste (<i>Lack of fit</i>)	5,2959	2	2,6479	17,238	0,0548

*Significativo a 1%

Através da Tabela 10 observa-se o modelo linear mostrou-se adequado para descrever o processo em estudo a um nível de confiança de 99%, assim como a temperatura, o pH e todas as demais interações.

As Figuras 17 e 18 apresentam o gráfico de Pareto e o gráfico de contorno, respectivamente, referentes ao estudo de imobilização via ligação covalente.

Os resultados apresentados pelo gráfico de Pareto (Figura 17) e pela curva de contorno (Figura 18) estão de acordo com a análise de variância. Observou-se que as variáveis que apresentaram maior efeito significativo na resposta são a temperatura e o pH. A temperatura apresenta um efeito negativo e o pH efeito positivo sobre a resposta. Estes resultados evidenciaram melhores atividades enzimáticas em valores de pH 9 e temperatura de 25 °C, onde observou-se um aumento de 10 vezes na atividade do imobilizado, em relação à menor atividade obtida. Assim como no ensaio de imobilização via adsorção, a concentração de enzima não se mostrou estatisticamente significativa, optando-se desta forma por trabalhar com a menor concentração avaliada, de 10 mg.mL⁻¹.

Figura 17 – Gráfico de Pareto dos parâmetros avaliados durante a imobilização por ligação covalente.

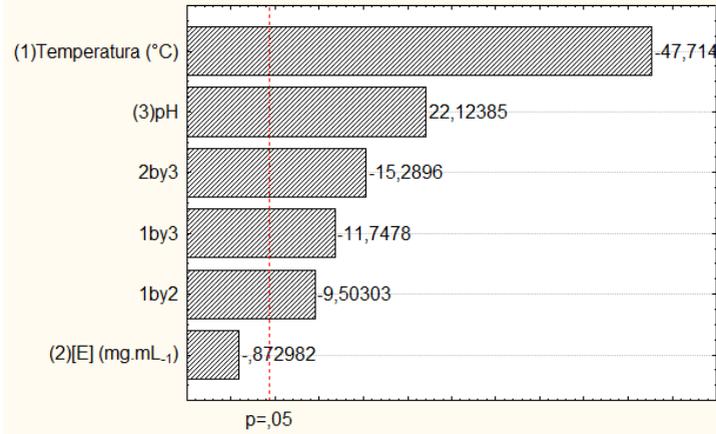
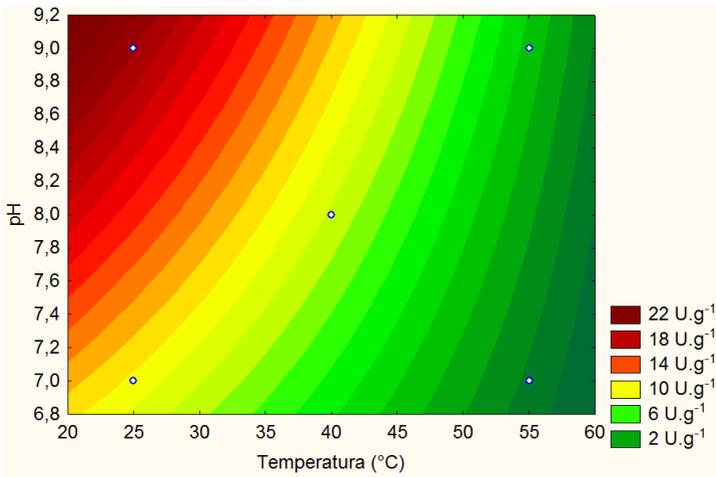


Figura 18 – Gráfico de contorno para o processo de imobilização por ligação covalente.

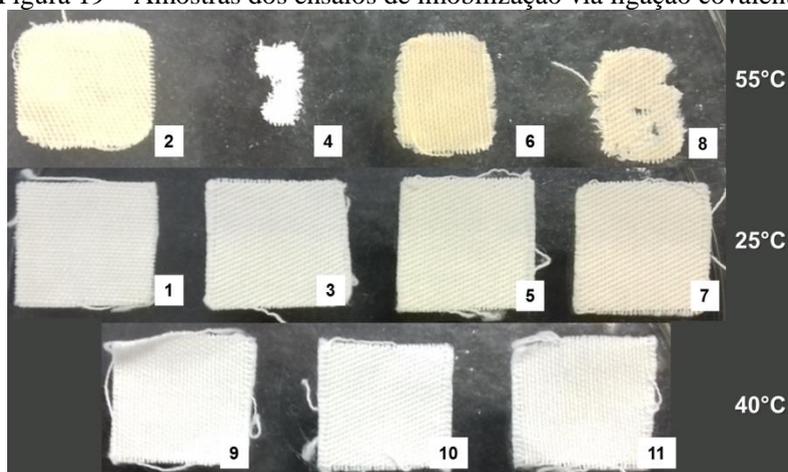


Fazendo uma comparação entre os gráficos de contorno correspondentes aos métodos de imobilização por adsorção e por ligação covalente, apresentados nas Figuras 16 e 18, respectivamente, observou-se que o método de imobilização por ligação covalente apresentou melhores respostas de atividade para a enzima imobilizada, nas mesmas

condições de pH, concentração de enzima e temperatura de imobilização. De acordo Sheldon (2007), provavelmente, a menor resposta de atividade para a imobilização por adsorção ocorreu devido à lixiviação durante o processo de lavagem, após a etapa de imobilização, devido à sua ligação física, que geralmente é muito fraca para manter a enzima fixada ao suporte. Já a atividade na imobilização da enzima ao suporte por ligação covalente é maior devido à vantagem de que a enzima não pode ser lixiviada da superfície.

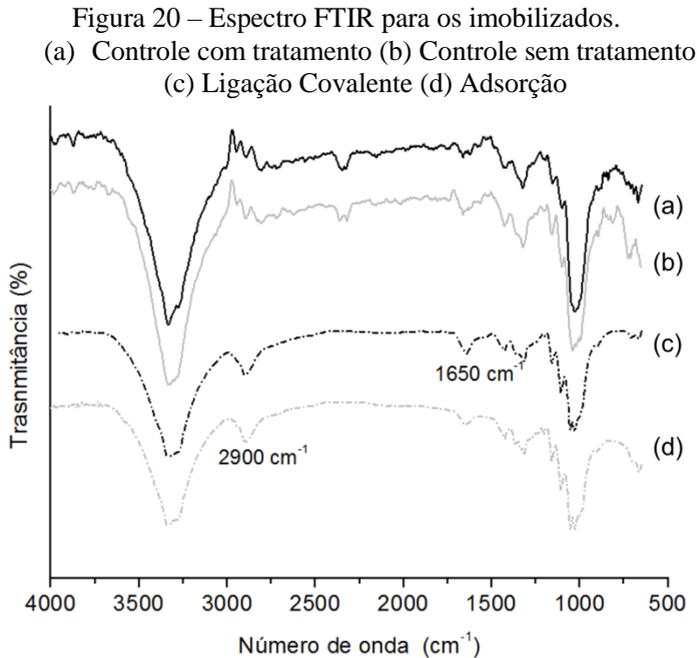
Além disto, durante os ensaios experimentais de imobilização, observou-se a degradação do tecido quando submetidos à temperatura de 55 °C. Esta degradação pode ser visualizada na Figura 19, onde as numerações em cada amostra de tecido correspondem às condições de temperatura, concentração de enzima e pH de cada ensaio descrito anteriormente na Tabela 6. De acordo com Silva *et al.* (2017), preparações enzimáticas podem apresentar atividades secundárias dependendo do substrato empregado e, o extrato Bioprep 3000 L[®], apresenta atividade secundária de natureza celulolítica, mesmo sendo muito menor comparado à atividade pectinolítica. Desta forma, é possível que o processo de oxidação a que o tecido foi submetido e a temperatura de imobilização de 55°C (que é a temperatura ótima da enzima celulase) tenham favorecido a atividade celulolítica do extrato e a consequente degradação do tecido de algodão.

Figura 19 – Amostras dos ensaios de imobilização via ligação covalente.



4.5 ESTABILIDADE AO ARMAZENAMENTO DO PRODUTO TÊXTIL

A enzima foi imobilizada por adsorção e por ligação covalente, nas melhores condições de temperatura, concentração de enzima e pH anteriormente estabelecidas no estudo do processo de imobilização. Então, as amostras do imobilizado foram armazenadas secas, à temperatura ambiente e a sua estabilidade de armazenamento foi acompanhada periodicamente através da atividade enzimática e da atividade antimicrobiana do produto têxtil. A Figura 20 apresenta o espectro FTIR do produto após as imobilizações da enzima.

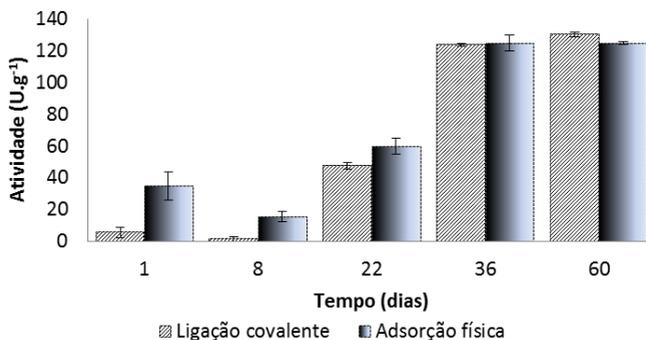


Os resultados apresentados na Figura 20 evidenciam a imobilização da enzima aos suportes. A absorção em 2900 cm⁻¹ pode ser atribuída a grupos amino primários, mostrando a presença de grupos amino na enzima livres. O leve decaimento observado no comprimento de onda de 1650 cm⁻¹ deve-se às vibrações de estiramento C = N imino e confirma a formação de bases de Schiff (BANDEKAR, 1992; JENISHA;

DAVID; PRIYADHARSINI, 2015; MORHARDT *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2013).

A atividade enzimática foi acompanhada durante um período de 60 dias e a atividade recuperada foi determinada. Os resultados de atividade dos imobilizados são apresentados na Figura 21.

Figura 21 – Atividade enzimática do imobilizado durante o armazenamento.



A atividade enzimática total da enzima livre oferecida no início dos processos de imobilização foi de $7,2 \text{ U.mL}^{-1}$ para uma concentração de proteína total de 10 mg.mL^{-1} .

A eficiência de imobilização é uma medida indireta, normalmente utilizada para representar a quantidade de enzima imobilizada ao final do processo, tendo em vista que não é possível quantificar diretamente a sua concentração no suporte. Apesar de mensurar a concentração de proteína livre que foi transferida da solução para o suporte, a medida da eficiência não garante a manutenção da atividade da enzima após a imobilização, tampouco considera a concentração de enzima que possa ter sido lixiviada no processo de lavagem a que o imobilizado é submetido no final do processo. Por estes motivos, outras análises, como atividade enzimática do imobilizado e a atividade recuperada são consideradas, para que em conjunto, contribuam com uma melhor compreensão do processo de imobilização. Neste estudo, a eficiência de imobilização obtida pelo método de adsorção foi de 29 % e pelo método de ligação covalente de 34 %. Os valores de eficiência e atividade recuperada, encontrados para estes métodos de imobilização, foram relativamente baixos. Para melhores resultados e relação custo-benefício, seria interessante que futuramente novos métodos de imobilização, como por aprisionamento, sejam investigados.

No presente trabalho, ambos os métodos de imobilização estudados (Figura 21), adsorção e ligação covalente, apresentaram um comportamento semelhante quanto à estabilidade da atividade da enzima imobilizada. Observou-se um aumento da atividade durante o armazenamento, a qual estabilizou após um período de 36 dias de armazenamento, proporcionando uma atividade recuperada de aproximadamente 60%, para ambos os processos de imobilização. É importante entender o processo de imobilização, suas limitações difusionais e como a enzima responde a um determinado material. De acordo com Sheldon e Van Pelt (2013), este aumento da atividade enzimática pode ser justificado pelo favorecimento da ligação do substrato com a enzima, devido mudanças conformacionais causadas pela ligação da enzima ao suporte, como também pode ocorrer o aumento da estabilidade da enzima na solução do meio reacional.

Como relatado na literatura, normalmente, obtém-se uma atividade enzimática menor para enzimas imobilizadas por ligação covalente, em relação a métodos físicos, como adsorção. As interações químicas entre enzima e matriz, no método de ligação covalente resultam em uma diminuição da atividade catalítica porque a ligação química estável formada altera a estrutura da enzima. Estas mudanças conformacionais não ocorrem no método de adsorção, porém a ausência de interações químicas fortes entre as enzimas imobilizadas e a matriz suporte torna as mesmas suscetíveis à lixiviação durante a lavagem, proporcionando uma durabilidade menor (LIU; CHEN, 2016; SHELDON, 2007; SHELDON; VAN PELT, 2013).

Embora ambos os métodos de imobilização tenham apresentado comportamento semelhante quanto ao valor da atividade enzimática, acredita-se que a enzima imobilizada por adsorção tenha uma atividade específica maior que a enzima imobilizada por ligação covalente, ou seja, apresenta uma maior atividade para uma menor concentração de enzima imobilizada, tendo como base os resultados de atividade antimicrobiana, discutidos na sequência.

4.5.1 Atividade antimicrobiana dos tecidos contendo a enzima imobilizada

Os resultados para a atividade antimicrobiana do tecido com enzima imobilizada são apresentados na Tabela 11 e nas Figuras 22 e 23.

Tabela 11 – Zona de inibição antimicrobiana da enzima imobilizada.

Dia	<i>E. coli</i> (mm)	<i>S. aureus</i> (mm)	<i>C. albicans</i> (mm)
Adsorção			
Controle	0	0	0
1	0	0	0
7	0	0	0
21	0	0	0
30	0	0	0
Ligação Covalente			
Controle	0	0	0
1	1,0 ± 0,0	1,2 ± 0,5	3,0 ± 1,1
7	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,0
21	1,0 ± 0,0	1,8 ± 0,4	1,8 ± 0,4
30	0	0	0

A atividade antimicrobiana correspondente à enzima imobilizada por adsorção foi insuficiente tendo em vista que não houve formação de zonas de inibição, como apresentado na Tabela 11 e Figura 22. Acredita-se que isto ocorreu possivelmente porque a concentração de enzima imobilizada remanescente, após a etapa de lavagem, embora não possa ser medida diretamente, foi inferior à CIM encontrada para a enzima livre ($1156,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Já as amostras correspondentes à enzima imobilizada por ligação covalente apresentaram zona de inibição para os microrganismos estudados em até 21 dias de armazenamento, conforme apresentado na Tabela 11, sendo sua atividade antimicrobiana considerada satisfatória. Este halo formado em volta da amostra (Figura 23) significa que o tratamento foi eficaz, pois houve repelência do microrganismo pela superfície e, conseqüentemente, houve inibição do seu crescimento, podendo ser aplicado para fins bacteriostáticos.

Os resultados de atividade antimicrobiana mostraram-se satisfatórios comparados a outros compostos comumente utilizados. Para esta mesma enzima, imobilizada por outros métodos de tratamento, Ibrahim *et al.* (2007) obtiveram zonas de inibição de 6,3 e 16 mm para *S. aureus*, 4,5 e 10 mm para *E. coli* e 5,5 e 8 mm para *C. albicans*. Outros estudos com aplicações em têxteis, como Bera *et al.* (2015), utilizando nanopartículas de prata, encontraram zonas de inibição de 2,5 mm para *C. albicans* e 1 mm para *S. aureus* e Balakumaran *et al.* (2016) encontraram zonas de inibição de 16,97 mm para *S. aureus* e 13,73 mm para *E. coli*.

Figura 22 – Resultados dos testes de difusão em ágar para a enzima imobilizada por adsorção.

- (a) Controle, (b) *Staphylococcus aureus*, (c) *Escherichia coli*,
(d) *Candida albicans*.

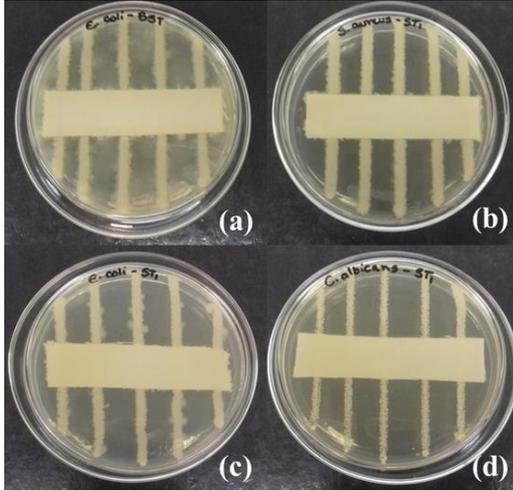
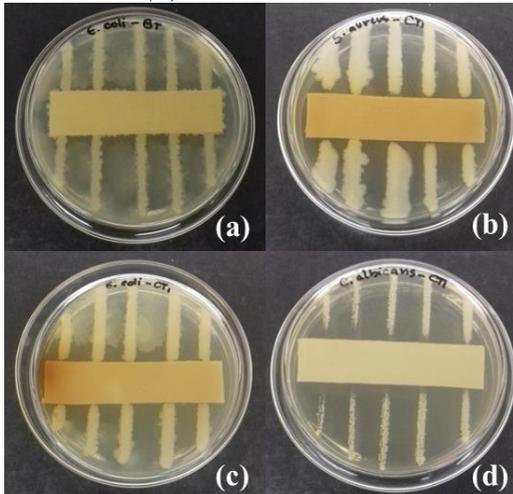


Figura 23 – Resultados dos testes de difusão em ágar para a enzima imobilizada por ligação covalente.

- (a) Controle, (b) *Staphylococcus aureus*, (c) *Escherichia coli*,
(d) *Candida albicans*.



Os resultados de estabilidade ao armazenamento para a atividade antimicrobiana não foram proporcionais aos da atividade enzimática, tendo em vista que a primeira apresentou atividade até 21 dias de armazenamento e a atividade enzimática se manteve por 60 dias. O mecanismo de ação do têxtil antimicrobiano obtido ainda é desconhecido, mas estes resultados sugerem que a atividade enzimática e a atividade pectinolítica, que é a atividade enzimática predominante do extrato Bioprep® 3000L, não estão relacionadas. Além disto, o método qualitativo de análise antimicrobiana utilizado é baseado na difusão do agente antimicrobiano no meio de cultura, e uma vez que a enzima se encontra imobilizada por ligação covalente, não é possível que a mesma difunda no meio e cause a inibição do crescimento microbiano, e consequente formação da zona de inibição.

Segundo Thallinger *et al.* (2013), algumas enzimas podem apresentar habilidades para atacar diretamente microrganismos, interferir na formação ou destruir biofilmes, ou catalisar reações que resultam na produção de compostos antimicrobianos. Com base nestes resultados, acredita-se que a formação de zonas de inibição na análise difusão possa estar relacionada a algum composto produzido pelo extrato enzimático imobilizado. Entretanto, para uma melhor compreensão da ação e funcionamento do produto obtido, uma análise mais criteriosa e aprofundada do mecanismo de ação sobre os microrganismos investigados precisa ser estudada.

Por fim, baseado nos resultados obtidos neste estudo, como sugestão de aplicação, o substrato têxtil produzido, poderia ser utilizado na prevenção da proliferação microbiana, em aplicações técnicas como produtos descartáveis tais como forros para macas e camas de hospitais, máscaras e toucas cirúrgicas etc. Para aplicações com finalidade bactericida como, por exemplo, em casos clínicos como curativos, ataduras, bandagens etc., onde ocorre a inativação do microrganismo, seria necessário a avaliação da atividade antimicrobiana através de métodos de análise quantitativos mais complexos, como a AATCC 100:2004, além da realização de testes alergênicos. E também, para aplicação em têxteis convencionais e de vestuário, seria interessante futuramente investigar a resistência da atividade antimicrobiana a ciclos de lavagens.

Por fim, este tipo de tratamento pode aumentar o valor de mercado dos produtos têxteis e atender aos requisitos técnicos de novos nichos de mercado. Também fornece subsídios para o desenvolvimento de tecnologia sustentável e proporciona abertura para novos estudos, mais

detalhados e aprofundados, e investigações na área, para a produção de têxteis antimicrobianos.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 CONCLUSÕES

Os extratos enzimáticos, Termamyl® 2X e Bioprep® 3000L, foram caracterizados quanto ao teor de proteína e de atividade enzimática apresentando os valores de 66,97 mg.mL⁻¹ e 4532,2 U.mL⁻¹ e 37,03 mg.mL⁻¹ e 14462,12 U.mL⁻¹, respectivamente. Ambos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana, sendo que o extrato enzimático Bioprep® 3000L foi mais efetivo para os microrganismos estudados.

O extrato enzimático Bioprep® 3000L apresentou zonas de inibição de 30 mm e CIM de 1156,3 µg.mL⁻¹ para *S. aureus*, 29,7 mm e 1156,3 µg.mL⁻¹ para *S. epidermidis*, 21,3 mm e 1156,3 µg.mL⁻¹ para *E. coli*, 11,7 mm e 18500 µg.mL⁻¹ para *P. aeruginosa* e 21,7 mm e 4625 µg.mL⁻¹ para *C. albicans*, sendo classificado como muito ativo. Estes resultados mostram que o extrato Bioprep® 3000L é um agente antimicrobiano promissor, com longo espectro de aplicação, considerando que os microrganismos investigados são ubiqüitários e estão relacionados a casos que variam desde intoxicações alimentares até infecções e problemas hospitalares, podendo ser utilizados como agente bioestático para o controle da proliferação do crescimento microbiano.

As respostas aos testes de FTIR, DSC e Fehling evidenciaram a formação de grupos aldeídos, tornando a oxidação do tecido de algodão via reação de periodato uma boa alternativa à funcionalização e imobilização da enzima estudada através de ligação covalente. É difícil comparar os valores de atividade enzimática obtidos neste estudo com outros estudos, devido à dependência da metodologia utilizada e das condições operacionais em que são determinados, como pH, temperatura, substrato e tempo de reação.

Fatores como temperatura, concentração de enzima e pH influenciam fortemente em reações enzimáticas, porém neste estudo, em ambos processos de imobilização investigados, apenas a temperatura, o pH e suas interações apresentaram efeito significativo sobre a atividade do imobilizado.

Os métodos de imobilização por adsorção e por ligação covalente se mostraram como boas alternativas para imobilização da enzima, apresentando uma atividade enzimática recuperada de 60% após 30 dias de armazenamento.

O método de imobilização por adsorção apresentou atividade antimicrobiana insuficiente, porém o tecido de algodão oxidado via

reação com periodato se mostrou como uma boa alternativa para funcionalização e imobilização da enzima estudada. O produto têxtil obtido por este método apresentou atividade antimicrobiana satisfatória para os microrganismos estudados durante um período de 21 dias de armazenamento, podendo ser aplicado para fins biostáticos e fornecendo subsídios para o desenvolvimento de tecnologia sustentável para a produção de têxteis antimicrobianos. Este tipo de tratamento pode aumentar o valor de mercado dos produtos têxteis e atender aos requisitos técnicos de novos nichos de mercado.

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Analisar a resistência ao rasgo e à tração e alongamento do substrato têxtil em função do tempo de reação com metaperiodato de sódio;
- Avaliar a imobilização da enzima por métodos de aprisionamento, como encapsulação;
- Estudar o tempo de reação da imobilização;
- Avaliar a atividade antimicrobiana para vários ciclos de lavagens;
- Quantificar a atividade antimicrobiana do produto têxtil;
- Estudar o mecanismo de ação antimicrobiana;
- Avaliar o efeito alergênico do produto obtido.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AATCC, 147:2004. Antibacterial Activity Assessment of Textile Materials: Parallel Streak Method 2004.

ABINT. **O que são os Têxteis Técnicos**. 2018. Disponível em: <<http://www.abint.org.br/tecidostecnicos.html>>. Acesso em: 13 fev. 2018.

ABOU NEEL, E. A. *et al.* Characterisation of antibacterial copper releasing degradable phosphate glass fibres. **Biomaterials**, [s. l.], v. 26, n. 15, p. 2247–2254, 2005.

ADAMSON, Arthur W.; GAST, Alice P. **Physical Chemistry of Surfaces**. New York: Wiley, 1997. Disponível em: <<http://jes.ecsdl.org/cgi/doi/10.1149/1.2133374>>

ADRIANO, Wellington S. *et al.* Improving the properties of chitosan as support for the covalent multipoint immobilization of chymotrypsin. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 2170–2179, 2008.

AHMED, Farooq *et al.* Developments in health care and medical textiles - A mini review-1. **Pakistan Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 780–783, 2014.

ALONSO, Diana *et al.* Chitosan-based microcapsules containing grapefruit seed extract grafted onto cellulose fibers by a non-toxic procedure. **Carbohydrate Research**, [s. l.], v. 345, n. 6, p. 854–859, 2010.

AMARA, Chedia Ben *et al.* Properties of lysozyme/sodium alginate complexes for the development of antimicrobial films. **Food Research International**, [s. l.], v. 89, p. 272–280, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.015>>

ANITHA, S. *et al.* Optical, bactericidal and water repellent properties of electrospun nano-composite membranes of cellulose acetate and ZnO. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 97, n. 2, p. 856–863, 2013.

AUGUSTIN, Mona; ALI-VEHMAS, Terhi; ATROSHI, Faik. Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms.

Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 55–64, 2004.

BALAKUMARAN, M. D. *et al.* In vitro biological properties and characterization of nanosilver coated cotton fabrics - An application for antimicrobial textile finishing. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [s. l.], v. 107, p. 48–55, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.11.011>>

BANDEKAR, Jagdeesh. Amide modes and protein conformation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular**, [s. l.], v. 1120, n. 2, p. 123–143, 1992.

BELYANSKY, Igor *et al.* The addition of lysostaphin dramatically improves survival, protects porcine biomes from infection, and improves graft tensile shear strength. **Journal of Surgical Research**, [s. l.], v. 171, n. 2, p. 409–415, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2011.04.014>>

BERA, Anuradha *et al.* Gamma radiation synthesis of colloidal AgNPs for its potential application in antimicrobial fabrics. **Radiation Physics and Chemistry**, [s. l.], v. 115, p. 62–67, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2015.05.041>>

BERNFELD, Peter. Amylase A and B Methods. **Enzymology**, [s. l.], v. 1, p. 149–158, 1955.

BHADRA, P. *et al.* Interaction of chitosan capped ZnO nanorods with Escherichia coli. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 929–937, 2011.

BJERGA, Gro Elin Kjæreng *et al.* A rapid solubility-optimized screening procedure for recombinant subtilisins in E. coli. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 222, n. February 2007, p. 38–46, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.02.009>>

BORODKIN, S. A. *et al.* Synthesis, characterization and antimicrobial activity of β -aminovinylphosphonium salts derived from aromatic amino acids. **Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements**, [s. l.], v. 192, n. 10, 2017.

BORYO, D. E. A. The Effect of Microbes on Textile Material : A Review on

the Way-Out So Far. **International Journal Of Engineering And Science**, [s. l.], v. 2, n. 8, p. 9–13, 2013.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRADY, Dean; JORDAAN, Justin. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 31, n. 11, p. 1639–1650, 2009.

CALVINI, Paolo *et al.* Viscometric determination of dialdehyde content in periodate oxycellulose Part II. Topochemistry of oxidation. **Cellulose**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 571–579, 2006.

CANO, Angelica P. *et al.* Copper sulfate-embedded and copper oxide-embedded filter paper and their antimicrobial properties. **Materials Chemistry and Physics**, [s. l.], v. 207, p. 147–153, 2018. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254058417309987>>

CARRILLO, William. Lysozyme: antibacterial activity and allergenicity. **Actualizaciones en Nutrición**, [s. l.], v. 14, p. 314–326, 2013. Disponível em: <http://www.revistasan.org.ar/pdf_files/trabajos/vol_14/num_4/RSAN_14_4_314.pdf>

CATARA, G. *et al.* A novel extracellular subtilisin-like protease from the hyperthermophile *Aeropyrum pernix* K1: Biochemical properties, cloning, and expression. **Extremophiles**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 391–399, 2003.

CHEN, Hong; HSIEH, You Lo. Enzyme immobilization on ultrafine cellulose fibers via poly(acrylic acid) electrolyte grafts. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 90, n. 4, p. 405–413, 2005.

CHEN, Jonathan Y.; SUN, Liangfeng; EDWARDS, Vincent J. Bioceramics Development and Applications Regenerated Cellulose Fiber and Film Immobilized with Lysozyme. **Bioceramics Development and Applications and Applications**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1–5, 2014.

CHIDURALA, Shilpa Chakra; KALAGADDA, Venkateswara Rao; TAMBUR, Pavani. Antimicrobial activity of pure Cu nano particles synthesized by surfactant varied chemical reduction method. **Environmental**

Nanotechnology, Monitoring and Management, [s. l.], v. 6, p. 88–94, 2016.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012a.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012b.

COPELAND, Robert. **Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis**. 2. ed. New York: Wiley-VCH, 2000.

COSTA, Flavia Nunes. **Valorização de Landoltia Punctata proveniente de tratamento de esgoto doméstico através de hidrólise enzimática visando a produção de etanol**. 2014. Universidade Federal de Santa Catarina, [s. l.], 2014.

CZAJA, Wojciech K. *et al.* The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–12, 2007.

CZAJKA, Robert. Development of medical textile market. **Fibres and Textiles in Eastern Europe**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 13–15, 2005.

DA SILVA, Valdic Luiz. **Aproveitamento sustentável do bagaço de cana de açúcar para obtenção do acetato de celulose**. 2014. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências Exatas e da Terra. Programa de Pós-graduação em Química. Universidade Federal no Rio Grande do Norte, [s. l.], 2014.

DUBAS, Stephan T.; KUMLANGDUDSANA, Panittamat; POTIYARAJ, Pranut. Layer-by-layer deposition of antimicrobial silver nanoparticles on textile fibers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 289, n. 1–3, p. 105–109, 2006.

EDWARDS, J. Vincent *et al.* Immobilization of lysozyme on cotton fabrics: Synthesis, characterization, and activity. **AATCC Review**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 73–79, 2011.

EDWARDS, J. Vincent *et al.* Immobilization of lysozyme-cellulose amide-

linked conjugates on cellulose I and II cotton nanocrystalline preparations. **Cellulose**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 495–506, 2012.

ERHARDT, Theodor. **Curso técnico têxtil: física e química aplicada, fibras têxteis, tecnologia**. v. 3 ed. São Paulo: EPU, 1975.

FERRERO, Franco; PERIOLATTO, Monica; FERRARIO, Stefano. Sustainable antimicrobial finishing of cotton fabrics by chitosan UV-grafting: From laboratory experiments to semi industrial scale-up. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 96, p. 244–252, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.12.044>>

FUGLSANG, Claus Crone *et al.* Antimicrobial enzymes: Applications and future potential in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 6, n. 12, p. 390–396, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224400892171>>

FURLAN, Franciele Regina. **Caracterização e aplicação de enzimas de forma combinada na biopreparação de tecidos felpudos de algodão**. 2012. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, [s. l.], 2012.

GAO, Yuan; CRANSTON, Robin. Recent Advances in Antimicrobial Treatments of Textiles. **Textile Research Journal**, [s. l.], v. 78, n. 1, p. 60–72, 2008.

GARCIA-GALAN, Cristina *et al.* Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, [s. l.], v. 353, n. 16, p. 2885–2904, 2011.

GELUK, M. A. *et al.* Adsorption of lipase from *Candida rugosa* on cellulose and its influence on lipolytic activity. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 14, n. 9, p. 748–754, 1992.

GIRELLI, A. M.; SALVAGNI, L.; TAROLA, A. M. Use of lipase immobilized on cellulose support for cleaning aged oil layers. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 585–592, 2012.

GOETZENDORF-GRABOWSKA, Bogna; KRÓLIKOWSKA, Halina; GADZINOWSKI, Mariusz. Polymer microspheres as carriers of antibacterial

properties of textiles: A preliminary study. **Fibres and Textiles in Eastern Europe**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 62–64, 2004.

GORENSEK, Marija; RECELJ, Petra. Nanosilver Functionalized Cotton Fabric. **Textile Research Journal**, [s. l.], v. 77, n. 3, p. 138–141, 2007. Disponível em: <<http://trj.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0040517507076329>>

GROVER, Navdeep *et al.* Enzyme-based formulations for decontamination: Current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 97, n. 8, p. 3293–3300, 2013.

GUARATINI, Cláudia C. I.; VALNICE, Maria; ZANONI, B. Corantes Têxteis. **Química Nova**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 71–78, 2000. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/25901/S0100-40422000000100013.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>

GUIDINI, Carla Zanella *et al.* Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 52, n. 2–3, p. 137–143, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2010.07.013>>

GUPTA, Deepti; BHAUMIK, Somes. Antimicrobial treatments for textiles. **Indian Journal of Fibre and Textile Research**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 254–263, 2007.

GUTAROWSKA, Beata; MICHALSKI, Andrzej. Microbial Degradation of Woven Fabrics and Protection Against Biodegradation. In: JEON, Han-Yong (Ed.). **Woven Fabrics**. [s.l.] : InTech, 2012.

HAMLIN, Paul F. **Talking rot... and mildew**. 1998. Disponível em: <<http://fungus.org.uk/nwfg/rot.htm>>. Acesso em: 26 jul. 2016.

HOERNIG, K. J. *et al.* Evaluation of a lysostaphin-fusion protein as a dry-cow therapy for *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 99, n. 6, p. 4638–4646, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030216301187>>

HOLME, Ian. Innovative technologies for high performance textiles. **Coloration Technology**, [s. l.], v. 123, n. 2, p. 59–73, 2007.

HORROCKS, A. R.; ANAND, S. C. **Handbook of technical textiles**. Cambridge England: Textile Institute. Woodhead Publishing Limited, 2000.

HROMIS, Nevena M. *et al.* Optimization of chitosan biofilm properties by addition of caraway essential oil and beeswax. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 158, p. 86–93, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.01.001>>

IBRAHIM, Hisham R.; MATSUZAKI, Tetsuji; AOKI, Takayoshi. Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 506, n. 1, p. 27–32, 2001.

IBRAHIM, N. A. *et al.* Antimicrobial Activity of Cotton Fabrics Containing Immobilized Enzymes. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 104, p. 1754–1761, 2007.

IPT. **Caracterização e desempenho de têxteis técnicos**. 2018. Disponível em: <http://www.ipt.br/solucoes/120-caracterizacao_e_desempenho_de_texteis_tecnicos.htm>. Acesso em: 13 fev. 2018.

IRENE, Galani *et al.* Copper-coated textiles: armor against MDR nosocomial pathogens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [s. l.], v. 85, n. 2, p. 205–209, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889316300281>>

ISLAM, Shahid-Ul; SHAHID, Mohammad; MOHAMMAD, Faqeer. Perspectives for natural product based agents derived from industrial plants in textile applications - A review. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 57, p. 2–18, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.06.004>>

ISO, 20645:2004. Textile fabrics -- Determination of antibacterial activity -- Agar diffusion plate test.2004.

IWAMOTO, Shinichiro; ABE, Kentaro; YANO, Hiroyuki. The effect of hemicelluloses on wood pulp nanofibrillation and nanofiber network characteristics. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 1022–1026, 2008.

JENISHA; DAVID, S.Theodore; PRIYADHARSINI, P. Schiff base ligand its complexes and their FT-IR spectroscopy studies. **International Journal**

on **Applied Bioengineering**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–4, 2015.

JEON, Soo Jin *et al.* Underlying Mechanism of Antimicrobial Activity of Chitosan Microparticles and Implications for the Treatment of Infectious Diseases. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. e92723, 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0092723>>

JESIONOWSKI, Teofil; ZDARTA, Jakub; KRAJEWSKA, Barbara. Enzyme immobilization by adsorption: A review. **Adsorption**, [s. l.], v. 20, n. 5–6, p. 801–821, 2014.

JOLLES, P. Recent Developments in the Study of Lysozymes. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 28–36, 1964.

JOLLÈS, Pierre; JOLLÈS, Jacqueline. What's new in lysozyme research? - Always a model system, today as yesterday. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 63, n. 2, p. 165–189, 1984.

KANAZAWA, Akihiko; IKEDA, Tomiki; ENDO, Takeshi. Polymeric phosphonium salts as a novel class of cationic biocides. **Journal of Polymer Science**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 1467–1472, 1993.

KENAWY, El Refaie *et al.* Biologically active polymers: Synthesis and antimicrobial activity of modified glycidyl methacrylate polymers having a quaternary ammonium and phosphonium groups. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 50, n. 1–3, p. 145–152, 1998.

KENAWY, El Refaie *et al.* Biologically active polymers. V. Synthesis and antimicrobial activity of modified poly(glycidyl methacrylate-co-2-hydroxyethyl methacrylate) derivatives with quaternary ammonium and phosphonium salts. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, [s. l.], v. 40, n. 14, p. 2384–2393, 2002.

KIM, Hyung Woo; KIM, Bo Ra; RHEE, Young Ha. Imparting durable antimicrobial properties to cotton fabrics using alginate-quaternary ammonium complex nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 79, n. 4, p. 1057–1062, 2010.

KIM, Ung-Jin *et al.* Periodate oxidation of crystalline cellulose. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 488–492, 2000.

KIM, Ung Jin; KUGA, Shigenori. Thermal decomposition of dialdehyde cellulose and its nitrogen-containing derivatives. **Thermochimica Acta**, [s. l.], v. 369, n. 1–2, p. 79–85, 2001.

KLEMM, Dieter *et al.* Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie - International Edition**, [s. l.], v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005.

KOCER, Hasan B. *et al.* A novel N-halamine acrylamide monomer and its copolymers for antimicrobial coatings. **Reactive and Functional Polymers**, [s. l.], v. 71, n. 5, p. 561–568, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2011.02.002>>

KOTEL'NIKOVA, N. E.; MIKHAILOVA, S. a.; VLASOVA, E. N. Immobilization of proteolytic enzymes trypsin and α -chymotrypsin to cellulose matrix. **Russian Journal of Applied Chemistry**, [s. l.], v. 80, n. 2, p. 322–329, 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1134/S1070427207020309>>

KUMAR, Jaspal K. Lysostaphin: An antistaphylococcal agent. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 80, n. 4, p. 555–561, 2008.

LAZARY, A. *et al.* Reduction of healthcare-associated infections in a long-term care brain injury ward by replacing regular linens with biocidal copper oxide impregnated linens. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 24, p. 23–29, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2014.01.022>>

LEDDER, Ruth G. *et al.* An in vitro evaluation of hydrolytic enzymes as dental plaque control agents. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 482–491, 2009.

LEE, Ki Hoon *et al.* Application of electrospun silk fibroin nanofibers as an immobilization support of enzyme. **Fibers and Polymers**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 181–185, 2005.

LEROY, C. *et al.* Effects of commercial enzymes on the adhesion of a marine biofilm-forming bacterium. **Biofouling**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 11–22, 2008.

LI, Rong *et al.* Antimicrobial N-halamine modified chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 92, n. 1, p. 534–539, 2013. Disponível em:

em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.115>>

LIU, Shijie. **Bioprocess Engineering: Kinetics, Biosystems, Sustainability, and Reactor Design**. 2. ed. [s.l.] : Elsevier, 2013.

LIU, Y.; CHEN, J. Y. Enzyme immobilization on cellulose matrixes. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, [s. l.], 2016. Disponível em: <<http://jbc.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0883911516637377>>

LIU, Ying; REN, Xuehong; LIANG, Jie. Antibacterial Modification of Cellulosic Materials - Review. **BioResources**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1964–1985, 2015.

LIU, Zhen *et al.* Biocompatible magnetic cellulose–chitosan hybrid gel microspheres reconstituted from ionic liquids for enzyme immobilization. **Journal of Materials Chemistry**, [s. l.], v. 22, n. 30, p. 15085, 2012.

LONGHI, Catia *et al.* Protease treatment affects both invasion ability and biofilm formation in *Listeria monocytogenes*. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 45–52, 2008.

LUCAS, Nathalie *et al.* Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques - A review. **Chemosphere**, [s. l.], v. 73, n. 4, p. 429–442, 2008.

LUO, Xiaogang; ZHANG, Lina. Immobilization of Penicillin G acylase in epoxy-activated magnetic cellulose microspheres for improvement of biocatalytic stability and activities. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 2896–2903, 2010.

MA, Kaikai *et al.* Cytocompatible and regenerable antimicrobial cellulose modified by N-halamine triazine ring. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 131, n. 16, p. 2–7, 2014.

MAEKAWA, Eiichi; KOSHIJIMA, Tetsuo. Properties of 2,3-dicarboxy cellulose combined with various metallic ions. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 29, n. 7, p. 2289–2297, 1984.

MARCATO-ROMAIN, C. E. *et al.* Removal of microbial multi-species biofilms from the paper industry by enzymatic treatments. **Biofouling**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 305–14, 2012.

MIAO, Jianjun *et al.* Lysostaphin-functionalized cellulose fibers with antistaphylococcal activity for wound healing applications. **Biomaterials**, [s. l.], v. 32, n. 36, p. 9557–9567, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.080>>

MILLER, Gail Lorenz. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MIN, Kyoungseon; YOO, Young Je. Recent progress in nanobiocatalysis for enzyme immobilization and its application. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 553–567, 2014.

MOCCELINI, Sally K. *et al.* A novel support for laccase immobilization: Cellulose acetate modified with ionic liquid and application in biosensor for methyl dopa detection. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 26, n. 8, p. 3549–3554, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2011.01.043>>

MONTAZER, Majid *et al.* Photo induced silver on nano titanium dioxide as an enhanced antimicrobial agent for wool. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], v. 103, n. 3, p. 207–214, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.03.009>>

MORHARDT, Christian *et al.* Direct quantification of immobilized enzymes by means of FTIR ATR spectroscopy - A process analytics tool for biotransformations applying non-porous magnetic enzyme carriers. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 107, p. 55–63, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.05.018>>

MORITA, Tokio; ASSUMPÇÃO, Rosely M. V. **Manual de Soluções, Reagentes e Solventes: padronização, preparação, purificação, indicadores de segurança, descarte de produtos químicos**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2007.

MOTA, Ana Carolina Loureiro Gama *et al.* Atividade antifúngica do ácido maléico sobre *Candida* spp envolvidas com infecções da cavidade bucal. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 357–361, 2012.

NASCIMENTO, Ronaldo Ferreira *et al.* **Adsorção: Aspectos teóricos e**

aplicações ambientais. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2014.

NIKOLIC, Tanja *et al.* Sodium periodate oxidized cotton yarn as carrier for immobilization of trypsin. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 82, n. 3, p. 976–981, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.06.028>>

NIKOLIC, Tanja *et al.* Sorption properties of periodate oxidized cotton. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 367–374, 2011. Disponível em: <<http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=1451-93721100023N>>

NIKOLIC, Tanja *et al.* Preparation of cellulosic fibers with biological activity by immobilization of trypsin on periodate oxidized viscose fibers. **Cellulose**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 1369–1380, 2014.

NITHYA, E. *et al.* Enhancement of the antimicrobial property of cotton fabric using plasma and enzyme pre-treatments. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 88, n. 3, p. 986–991, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.049>>

OH, Sang Youn *et al.* FTIR analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide. **Carbohydrate Research**, [s. l.], v. 340, n. 3, p. 417–428, 2005.

OHL, Michael *et al.* Hospital privacy curtains are frequently and rapidly contaminated with potentially pathogenic bacteria. **American Journal of Infection Control**, [s. l.], v. 40, n. 10, p. 904–906, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2011.12.017>>

ORELMA, Hannes *et al.* Generic method for attaching biomolecules via avidin-biotin complexes immobilized on films of regenerated and nanofibrillar cellulose. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 2802–2810, 2012.

OZER, Bahar Basak Peksen *et al.* Development of a novel strategy for controlled release of lysozyme from whey protein isolate based active food packaging films. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 61, p. 877–886, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X16302892>>

PANGULE, Ravindra C. *et al.* Antistaphylococcal nanocomposite films based on enzyme - Nanotube conjugates. **ACS Nano**, [s. l.], v. 4, n. 7, p. 3993–4000, 2010.

PANT, Gaurav *et al.* Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. **Journal of Taibah University for Science**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 50–55, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1658365514000697>>

PELCZAR, Michael J.Jr.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, Noel R. **Microbiology**. 5. ed. New York: Tata-McGraw Hill, 2000.

PIMENTEL, Aline. **Caracterização de uma pectinase comercial e sua utilização no processo de purga na indústria têxtil**. 2010. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, [s. l.], 2010.

PONCE, A. G. *et al.* Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 36, n. 7, p. 679–684, 2003.

PRABHU, S.; VAIDEKI, K.; ANITHA, S. Effect of microwave argon plasma on the glycosidic and hydrogen bonding system of cotton cellulose. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 156, p. 34–44, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861716309997>>

PRINCI, Elisabetta *et al.* Physical and chemical characterization of cellulose based textiles modified by periodate oxidation. **Macromolecular Symposia**, [s. l.], v. 218, p. 343–352, 2004.

PULIT-PROCIAK, Jolanta *et al.* Functionalization of textiles with silver and zinc oxide nanoparticles. **Applied Surface Science**, [s. l.], v. 385, p. 543–553, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.05.167>>

RADETIĆ, Maja. Functionalization of textile materials with TiO₂ nanoparticles. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, [s. l.], v. 16, p. 62–76, 2013.

REHM, Hans-Jurgen; REED, Gerald. **Biotechnology**. 2. ed. Weinheim: VCH, 1995.

REN, Xuehong *et al.* N-Halamine-coated cotton for antimicrobial and detoxification applications. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 220–226, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.03.029>>

RISTIC', Tijana *et al.* Antimicrobial efficiency of functionalized cellulose fibres as potential medical textiles. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. [s.l.] : Formatex, 2011. p. 36–51.

RODRIGUEZ, C. *et al.* Antibacterial effects of photocatalytic textiles for footwear application. **Catalysis Today**, [s. l.], v. 230, p. 41–46, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2013.12.023>>

ROY, Ipsita; GUPTA, Munishwar N. Lactose hydrolysis by Lactozym ??? immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 325–332, 2003.

SAMPAIO, Liliana M. P. *et al.* Laccase immobilization on bacterial nanocellulose membranes: Antimicrobial, kinetic and stability properties. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 145, p. 1–12, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.009>>

SARIKURKCU, Cengiz *et al.* Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 70, p. 178–184, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.030>>

SATISHKUMAR, Rohan *et al.* Evaluation of the antimicrobial activity of lysostaphin-coated hernia repair meshes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 55, n. 9, p. 4379–4385, 2011.

SCHWANNINGER, M. *et al.* Effects of short-time vibratory ball milling on the shape of FT-IR spectra of wood and cellulose. **Vibrational Spectroscopy**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 23–40, 2004.

SEABRA, Inês José; GIL, Maria Helena. Cotton gauze bandage: a support for protease immobilization for use in biomedical applications. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 535–542, 2007.

SEDLARIK, Vladimir. Antimicrobial Modifications of Polymers. In: CHAMY, Rolando; ROSENKRANZ, Francisca (Eds.). **Biodegradation - Life of Science**. Rijeka, Croatia: InTech, 2013.

SHAH, Anjali; MOND, James; WALSH, Scott. Lysostaphin-coated catheters eradicate *Staphylococcus aureus* challenge and block surface colonization. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 48, n. 7, p. 2704–2707, 2004.

SHAHIDI, Sheila; GHORANNEVISS, Mahmood; MOAZZENCHI, Bahareh. New advances in plasma technology for textile. **Journal of Fusion Energy**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 97–102, 2014.

SHELDON, Roger A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, [s. l.], v. 349, n. 8–9, p. 1289–1307, 2007.

SHELDON, Roger A.; VAN PELT, Sander. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, [s. l.], v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C3CS60075K>>

SILVA, Laís Graziela de Melo Da. **Biopurga de malha de algodão utilizando processo enzimático com associação de enzimas**. 2013. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, [s. l.], 2013.

SILVA, Laís Graziela de Melo Da *et al.* Study and application of an enzymatic pool in bioscouring of cotton knit fabric. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 95, n. 7, p. 1253–1260, 2017.

SIRÓ, István; PLACKETT, David. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: A review. **Cellulose**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 459–494, 2010.

SUN, Gang. **Antimicrobial Textiles**. [s.l.] : Woodhead Publishing in association with The Textile Institute, 2016.

SUN, Gang; WORLEY, S.Dave. Chemistry of Durable and Regenerable Biocidal Textiles. **Journal of Chemical Education**, [s. l.], v. 82, n. 1, p. 60,

2005. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed082p60>>

SZOSTAK-KOTOWA, Jadwiga. Biodeterioration of textiles. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [s. l.], v. 53, n. 3, p. 165–170, 2004.

TAN, Shaozao *et al.* Study of modified polypropylene nonwoven cloth. II. Antibacterial activity of modified polypropylene nonwoven cloths. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 77, n. 9, p. 1869–1876, 2000.

TELI, M. D.; SHEIKH, Javed. Modified bamboo rayon-copper nanoparticle composites as antibacterial textiles. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 61, p. 302–307, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.07.015>>

THALLINGER, Barbara *et al.* Antimicrobial enzymes: An emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. **Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 97–109, 2013.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiology: an introduction**. 10. ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2012.

TRABULSI, Luiz Rachid; SAMPAIO, Magda Carneiro. Microbiota normal do corpo humano. In: TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flavio (Eds.). **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 103–110.

TRAN, Daniel N.; BALKUS, Kenneth J. Perspective of recent progress in immobilization of enzymes. **ACS Catalysis**, [s. l.], v. 1, n. 8, p. 956–968, 2011.

UENOJO, Mariana; PASTORE, Gláucia Maria. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 388–394, 2007.

VARTIAINEN, By Jari; RÄTTÖ, Marjaana; PAULUSSEN, Sabine. Antimicrobial Activity of Glucose Polypropylene Films and Science. **Packaging Technology and Science**, [s. l.], v. 18, n. June, p. 243–251, 2005.

VICINI, Silvia *et al.* Thermal analysis and characterisation of cellulose oxidised with sodium methaperiodate. **Thermochimica Acta**, [s. l.], v. 418, n. 1–2, p. 123–130, 2004.

WAKELYN, Philip J. *et al.* Cotton Fibers. In: LEWIN, Menachem (Ed.). **Handbook of Fiber Chemistry**. 3. ed. New York: CRC Taylor & Francis, 2007. p. 521–666.

WALENTOWSKA, Judyta; FOKSOWICZ-FLACZYK, Joanna. Thyme essential oil for antimicrobial protection of natural textiles. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [s. l.], v. 84, p. 407–411, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.06.028>>

WANG, Qiang *et al.* Immobilization of catalase on cotton fabric oxidized by sodium periodate. **Biocatalysis and Biotransformation**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 437–443, 2008. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-54049115510&partnerID=tZOtx3y1>>

WINDLER, Lena; HEIGHT, Murray; NOWACK, Bernd. Comparative evaluation of antimicrobials for textile applications. **Environment International**, [s. l.], v. 53, p. 62–73, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2012.12.010>>

WU, Rina *et al.* Immobilization of pectinase on oxidized pulp fiber and its application in whitewater treatment. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 97, n. 2, p. 523–529, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.019>>

WU, Rina *et al.* Preparation of immobilized pectinase on regenerated cellulose beads for removing anionic trash in whitewater from papermaking. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [s. l.], v. 89, n. 7, p. 1103–1109, 2014.

WU, Sheng-chi; LIA, Ying-ke; HO, Chia-yen. Glucoamylase immobilization on bacterial cellulose using periodate oxidation method. **International Journal of Science and Engineering**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 1–4, 2013.

YE, Weijun *et al.* Durable antibacterial finish on cotton fabric by using chitosan-based polymeric core-shell particles. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 102, n. 2, p. 1787–1793, 2006.

YUEN, C. W. M. *et al.* Determining Functional Groups of Commercially Available Ink-Jet Printing Reactive Dyes Using Infrared Spectroscopy. **RJTA**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 26–38, 2005.

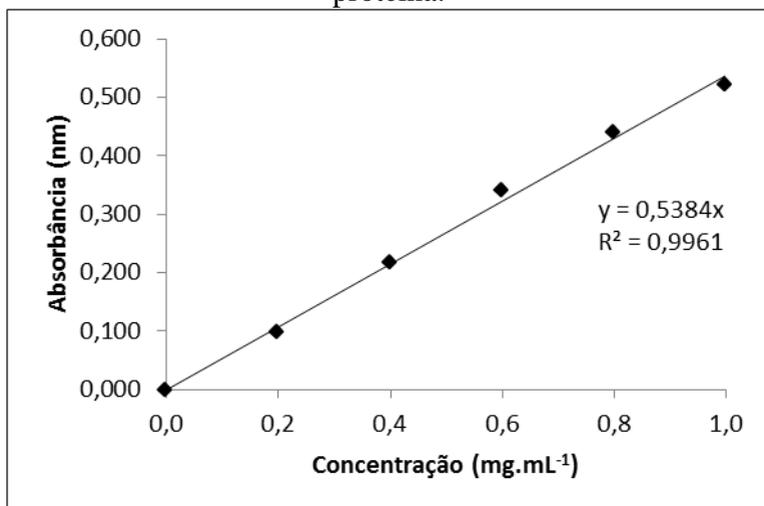
ZAIA, Dimas A. M.; ZAIA, Cássia Thaís B. V; LICHTIG, Jaim. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 787–793, 1998.

ZANETTI, M. *et al.* Microbiological Characterization of Pure Geraniol and Comparison with Bactericidal Activity of the Cinnamic Acid in Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 186–193, 2015. Disponível em: <<http://www.omicsonline.org/open-access/microbiological-characterization-of-pure-geraniol-and-comparison-with-bactericidal-activity-of-the-cinnamic-acid-in-grampositive-and-gramnegative-bacteria-1948-5948-1000203.php?aid=58962>>

ZHOU, Zhou *et al.* Improved activity and stability of lipase immobilized in cage-like large pore mesoporous organosilicas. **Microporous and Mesoporous Materials**, [s. l.], v. 154, p. 133–141, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2012.01.003>>

7 APÊNDICE A – Curva padrão de calibração para a determinação da concentração de proteínas

Figura 24 – Curva padrão para a determinação de proteína.



8 APÊNDICE B – Curva padrão de calibração para a determinação da concentração de açúcar redutor

Figura 25 – Curva padrão para a determinação de açúcar redutor para a α -amilase.

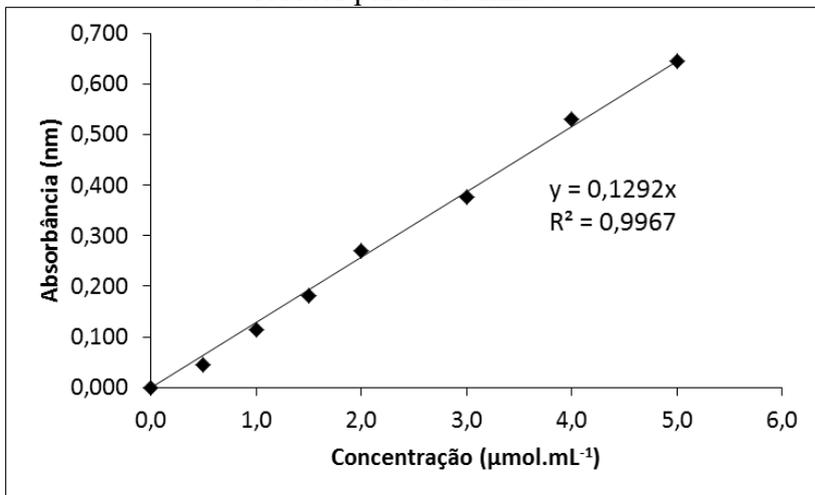
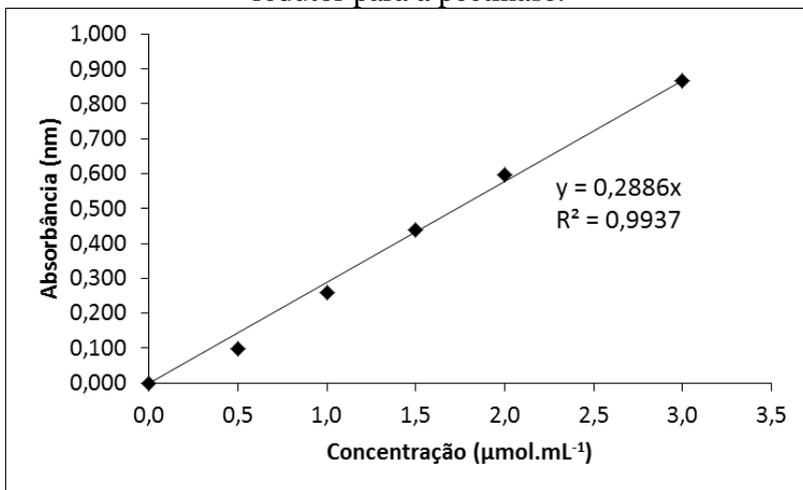


Figura 26 – Curva padrão para a determinação de açúcar redutor para a pectinase.



9 APÊNDICE C – Curva padrão de calibração para a determinação da concentração de periodato

Figura 27 – Curva padrão para a determinação de periodato.

