

Universidade do Minho
Escola de Ciências

Andreia Coelho Cardoso

Potencial de própolis no desenvolvimento
de têxteis com propriedades funcionais



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Andreia Coelho Cardoso

Potencial de própolis no desenvolvimento de têxteis com propriedades funcionais

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Bioquímica Aplicada

Ramo de Biotecnologia

Trabalho efetuado sob a orientação da:

**Professora Doutora Cristina Alexandra de Almeida
Aguar**

e da

Mestre Diana Isabel Azevedo de Sousa

Direitos de autor e condições de utilização do trabalho por terceiros

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

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

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

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações
CC BY-NC-ND

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

“O querer e o trabalho transformam o sonho em realidade”

(Anónimo)

Agradecimentos

Com a finalização da dissertação de mestrado não posso deixar de agradecer a algumas pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta caminhada tão importante da minha vida pessoal e profissional se concretizasse.

Em primeiro lugar quero agradecer à professora Cristina Aguiar, por toda a sua incansável ajuda, tempo, paciência e amizade durante este ano, e por me ter proporcionado a oportunidade de trabalhar com ela.

Agradeço também às Mestres Diana Sousa e Alice Ribeiro por tão amavelmente me receberem no CeNTI e pela orientação e dedicação que demonstraram ao longo deste caminho.

Um especial agradecimento à amável Ana Sofia por toda a paciência, apoio, ajuda e transmissão de conhecimento ao longo desta etapa. E a todas as pessoas presentes no laboratório que sempre se mostraram muito disponíveis para ajudar, em especial à Leonor e à Liliana pela paciência e suporte.

Agradeço também a todo o pessoal técnico que trabalha no Departamento de Biologia, por toda a ajuda, que tornou este trabalho mais fácil de realizar, em especial ao Senhor Luís.

Um obrigado ao pessoal do CeNTI pela ajuda e cedências de material para a realização dos ensaios.

Não seria possível estar aqui se não fossem os meus pais por sempre acreditarem em mim, por nunca me deixarem desistir, por me darem a oportunidade de sonhar e todas as bases para o concretizar, o meu mais profundo obrigada.

Por último, mas não menos importante, um enorme obrigada às minhas grandes amigas que estiveram sempre presentes, que me apoiaram, me fizeram rir, foram um ombro amigo e que nunca deixaram de acreditar em mim.

Declaração de integridade

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

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

Resumo

O aumento da atividade industrial, especificamente no setor têxtil, exige cada vez mais a implementação de processos tecnologicamente inovadores e mais sustentáveis. O processo de tingimento convencional utiliza corantes sintéticos e envolve o consumo de muitos recursos, nomeadamente água e energia, para além de ser altamente prejudicial para organismos vivos. A consciencialização do impacto ambiental e toxicidade inerentes a este processo, assim como o aumento da procura de têxteis técnicos, tem conduzido a um crescente interesse no desenvolvimento de corantes mais ecológicos e, em paralelo, ao desenvolvimento de agentes funcionais mais sustentáveis. Neste contexto, o presente projeto teve como objetivo avaliar o potencial do própolis, enquanto agente funcional, no tratamento de malhas 100 % algodão. Para além de propriedades corantes, este produto natural produzido pelas abelhas e depositado nas colmeias, possui propriedades antioxidantes e antibacterianas de grande interesse, criando assim uma alternativa ecológica e inovadora à coloração e funcionalização de têxteis.

A extração dos compostos bioativos do própolis foi realizada através de uma extração em etanol, sendo posteriormente preparada uma solução adequada à coloração da malha têxtil pela tecnologia de esgotamento. No sentido de aumentar a reatividade superficial e melhorar a afinidade ao própolis, foram realizados pré-tratamentos na malha com alúmen de potássio, ácido tânico, plasma atmosférico (oxigénio) e quitosano. A caracterização dos provetes coloridos e funcionalizados envolveu a avaliação da cor e das atividades antioxidante e antibacteriana, prévia e posteriormente a vários ciclos de lavagem. Na análise da cor verificou-se que, de modo geral, as diferenças de cor aumentaram com o aumento de ciclos de lavagens. A avaliação da atividade antioxidante, por ABTS, permitiu confirmar que a solução de biocoloração conferiu à malha de algodão capacidade redutora superior a 90 %. A funcionalização do algodão com alúmen de potássio e com a solução de biocoloração permitiu manter esta percentagem, mesmo após 5 ciclos de lavagem. A análise antibacteriana revelou inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* para o algodão funcionalizado apenas com a solução de biocoloração. A amostra em estudo demonstrou uma diminuição na ação inibitória com as lavagens, mas o uso de alúmen de potássio permite manter a propriedade antibacteriana após 5 ciclos de lavagem.

Palavras – chave: biocoloração, bioatividade, própolis, têxteis multifuncionais, sustentabilidade

Abstract

The increase in industrial activity, particularly in the textile sector, increasingly requires the implementation of technologically innovative and more sustainable processes. The conventional dyeing process uses synthetic dyes and involves the consumption of many resources, namely water and energy, in addition to being highly harmful to living organisms. The awareness of the environmental impact and toxicity inherent to this process, as well as the increased demand for technical textiles, have led to a growing interest in the development of more ecological dyes and, in parallel, to the development of more sustainable functional agents. In this context, this project aims to evaluate the potential of propolis as a functional agent in the treatment of 100% cotton knits. In addition to colouring properties, this natural product produced by bees and deposited in hives, has antioxidant and antibacterial properties of great interest, thus creating an ecological and innovative alternative to the colouring and functionalization of textiles.

The extraction of bioactive compounds from propolis was carried out through an ethanol extraction, after which a suitable solution was prepared for the colouring of the textile mesh by the depletion technology. In order to increase the surface reactivity and improve the affinity to propolis, mesh pretreatments were carried out with potassium alum, tannic acid, atmospheric plasma (oxygen) and chitosan. The characterization of the coloured and functionalized test pieces involved the evaluation of colour and of the antioxidant and antibacterial activities, before and after several washing cycles. In the colour analysis it was found that, in general, the colour differences increased with the increase of washing cycles. The evaluation of antioxidant activity, by ABTS, allowed to confirm that the biocoloration solution gave the cotton fabric a reduction capacity greater than 90%. The functionalization of cotton with potassium alum and with the solution of biocoloration allowed to maintain this percentage, even after 5 washing cycles. Antibacterial analysis revealed an inhibition of *Staphylococcus aureus* growth for the functionalized cotton with only the biocoloration solution. The sample under study showed a decrease in the inhibitory action with washing, but the use of potassium alum allows to retain the antibacterial property after 5 washing cycles.

Key Words: Biocoloration, bioactivity, propolis, multifunctional textiles, sustainability

Índice

Direitos de autor e condições de utilização do trabalho por terceiros.....	ii
Agradecimentos.....	iv
Declaração de integridade.....	v
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Lista de abreviaturas, siglas, símbolos e acrónimos.....	xi
Índice de figuras.....	xiii
Índice de tabelas	xix
1. Introdução	1
1.1. Indústria têxtil	3
1.1.1. Fibras têxteis: Algodão	4
1.2. Tingimento têxtil.....	6
1.2.1. Coloração natural em substratos têxteis	8
1.2.1.1. Otimização dos processos de biocoloração têxtil.....	10
1.2.2. Avaliação da cor nos têxteis.....	15
1.3. Funcionalização têxtil com compostos naturais	17
1.3.1. Têxteis com atividade antioxidante.....	18
1.3.2. Têxteis com atividade antimicrobiana	20
1.4. Própolis – Um produto natural da colmeia	22
1.4.1. Composição química e propriedades biológicas	24
2. Materiais e Métodos	27
2.1. Extração de compostos ativos de própolis do Gerês	28
2.2. Biocoloração e funcionalização têxtil com própolis	29
2.2.1. Preparação da solução de biocoloração com própolis	29

2.2.2. Pré-tratamento dos substratos têxteis	29
2.2.3. Coloração e funcionalização dos substratos têxteis com a solução de própolis.....	31
2.3. Avaliação das propriedades de cor dos têxteis biocoloridos	33
2.4. Avaliação das bioatividades	33
2.4.1. Avaliação da atividade antioxidante.....	33
2.4.1.1. Extrato etanólico de própolis	33
2.4.1.2. Solução de biocoloração	34
2.4.1.3. Substratos têxteis biocoloridos e funcionalizados	35
2.4.2. Avaliação da atividade antibacteriana	35
2.4.2.1. Extrato etanólico de própolis	35
2.4.2.2. Solução de biocoloração	37
2.4.2.3. Substratos têxteis biocoloridos e funcionalizados	37
2.5. Avaliação da solidez à lavagem.....	38
3. Resultados e Discussão	39
3.1. Preparação e caracterização do extrato etanólico de própolis	40
3.1.1. Potencial antioxidante de G19.EE	41
3.1.2. Atividade antibacteriana de G19.EE	43
3.2. Caracterização da solução de biocoloração	46
3.2.1. Potencial antioxidante da solução de biocoloração	46
3.2.2. Atividade antibacteriana da solução de biocoloração	47
3.3. Caracterização dos têxteis biocoloridos e funcionais.....	49
3.3.1. Análise de cor	50
3.3.2. Capacidade antioxidante dos têxteis biocoloridos e funcionalizados	56
3.3.3. Potencial antibacteriano dos têxteis biocoloridos e funcionalizados.....	63
4. Conclusões e Perspetivas futuras.....	77

Referências Bibliográficas	81
Apêndices	95
Apêndice I.....	96
Apêndice II.....	97
Apêndice III	98
Anexos	99
Anexo I.....	100

Lista de abreviaturas, siglas, símbolos e acrónimos

a* – Gradiente vermelho-verde

AATCC – *American Association of Textile Chemists and Colorists*

ABTS – 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina 6-ácido sulfónico)

AG – Ácido gálico

AP – Alúmen de potássio

AT – Ácido tânico

b* – Gradiente amarelo-azul

CeNTI – Centro de Nanotecnologia e Materiais Técnicos, Funcionais e Inteligentes

CIE – Comissão Internacional da Iluminação, do francês *Commission Internationale de l'Eclairage*

CITEVE – Centro Tecnológico das Indústrias Têxtil e do Vestuário de Portugal

CMI – Concentração mínima inibitória

CO – 100 % Algodão

CO + AP – Algodão tratado simultaneamente com alúmen de potássio

CO + AT – Algodão tratado simultaneamente com ácido tânico

CO + 1%Gli-1%SA – Algodão tratado simultaneamente com 1 % de glioxal e 1 % sulfato de alumínio

CO + 1,5%Gli-0,5%SA – Algodão tratado simultaneamente com 1,5 % de glioxal e 0,5 % de sulfato de alumínio

CO_ptAP – Algodão pré-tratado com alúmen de potássio

CO_ptAT – Algodão pré-tratado com ácido tânico

CO_ptP – Algodão pré-tratado com plasma atmosférico

CO_ptQ – Algodão pré-tratado com quitosano

D.O. – Densidade Ótica

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EE – Extrato de etanol

G – Gerês

G19 – Própolis do Gerês recolhido em 2019

G19.EE – Extrato etanólico de própolis do Gerês recolhido em 2019

Gli – Glioxal

IC₅₀ – Concentração de um inibidor que reduz a resposta para metade, do inglês *Half Maximal Inhibitory Concentration*

ISO – *International Organization for Standardization*

JIS – *Japanese Industrial Standards*

K/s – Força colorística

L* – Luminosidade da cor

LB – *Luria Bertani*

P – Plasma atmosférico

pt – pré-tratamento

Q – Quitosano

R – Refletância

RNS – Espécies reativas de azoto, do inglês *Reactive Nitrogen Species*

ROS – Espécies reativas de oxigénio, do inglês *Reactive Oxygen Species*

rpm – rotações por minuto

SA – Sulfato de alumínio

SB – Solução de biocoloração

Sccm – centímetros cúbicos por minuto unidade padrão, do inglês *Standard cubic centimetres per minute*

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

UV – Ultravioleta

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

ΔE – Diferença de cor

Índice de figuras

Figura 1. Classificação geral e exemplos de fibras têxteis (adaptado de Sinclair, 2014).	4
Figura 2. Estrutura química da celulose (retirado de Rattanaphani <i>et al.</i> , 2007).	5
Figura 3. Diagrama representativo do processo de foulardagem (adaptado de Ratnapandian, 2013).	7
Figura 4. Estruturas químicas da celulose, da quitina e do quitosano (adaptado de Kumar, 2000).	12
Figura 5. Efeito do pré-tratamento de plasma na funcionalização da superfície da celulose (adaptado de Shahidi <i>et al.</i> , 2013).	14
Figura 6. <i>Sigma Technologies International – Atmospheric Plasma Treatment System</i> - Equipamento do CeNTI para o pré-tratamento a nível industrial de substratos têxteis com plasma não térmico à pressão atmosférica.	14
Figura 7. Espectro eletromagnético (adaptado de Hu <i>et al.</i> , 2020).	15
Figura 8. Representação das coordenadas de cor L^* , a^* , b^* segundo o sistema CIELab (adaptado de Liew <i>et al.</i> , 2008 e Cortez <i>et al.</i> , 2017).	16
Figura 9. Mecanismo de reação do radical livre 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido-sulfónico) (ABTS), originando a sua forma reduzida (adaptado de Pannala <i>et al.</i> , 2001).	19
Figura 10. Conversão de DPPH• à sua forma reduzida (DPPH-H) na presença de agentes antioxidantes dadores de hidrogénio (AH) (retirado de Gulcin, 2020).	19
Figura 11. Solução de própolis para biocoloração (B) obtida a partir de G19.EE (A) em 5% de etanol: 95 % de água.	29
Figura 12. Equipamento Grant OLS200 utilizado para os banhos de esgotamento realizados ao longo deste projeto.	30
Figura 13. Equipamentos utilizados no tratamento dos substratos têxteis com quitosano por impregnação: Foulard Mathis (A) e secadeira Werner Mathis AG (B).	31
Figura 14. Etapas da biocoloração/funcionalização dos provetes de algodão com própolis. A - Colocação da solução de biocoloração nos copos de esgotamento. B – Adição dos provetes de	

algodão à solução de biocoloração. C – Banho termostático onde decorre a etapa de esgotamento.	32
Figura 15. Condições testadas na biocoloração e funcionalização de provetes de malha 100 % algodão com própolis. AP - alúmen de potássio, AT - ácido tânico, Gli - glioxal e SA - sulfato de alumínio. O sinal “+” indica mordentagem simultânea e “_pt” indica pré-tratamento.....	32
Figura 16. Capacidade de captura do radical livre DPPH•, apresentada em valores de IC ₅₀ (µg/mL), dos extratos etanólicos de amostras de própolis do Gerês (G.EEs) recolhidas entre 2011 e 2019. G17.EE não foi considerado nesta análise pelo facto de se tratar de uma amostra diferente, conforme atrás referido. Realizou-se o teste <i>One-way</i> ANOVA (letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste <i>Tukey</i> ($p \leq 0,05$)).	43
Figura 17. Atividade antioxidante da solução de biocoloração (SB) pelo método ABTS. L-cisteína (0,3 g/L) representa o controlo positivo. Os resultados são exibidos como a média das três réplicas efetuadas e respetivo desvio padrão.....	46
Figura 18. Avaliação da atividade antibacteriana da solução de biocoloração (SB) contra as bactérias <i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , Methicillin susceptible <i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA) (A) e Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA), <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> (B). O controlo foi uma placa de meio LB sem SB. As bactérias foram cultivadas em LB a 37 °C, 200 rpm, até ser obtida uma D.O. ₆₀₀ entre 0,4 e 0,6. Posteriormente, as culturas foram diluídas de forma seriada até à diluição 10 ⁻⁴ e 5 µL de cada diluição foram pipetados para meio sólido, em placas contendo diferentes concentrações de SB. a - meio LBA, b – LBA e etanol, c - meio LBA contendo SB a 0,1 % e d - meio LBA com SB a uma concentração 0,2 %.....	48
Figura 19. Força colorística (K/s) dos provetes biocoloridos com a solução de biocoloração (SB). As amostras utilizadas foram algodão (CO), algodão tratado simultaneamente com alúmen de potássio (CO + AP), algodão pré-tratado com alúmen de potássio (CO_ptAP) e algodão tratado simultaneamente com 1 % de glioxal e 1 % de sulfato de alumínio (CO + 1%Gli-1%SA). As amostras foram analisadas previamente às lavagens (0 ciclos), e após 1, 3 e 5 ciclos de lavagem, numa máquina de lavar doméstica. Os resultados são apresentados como a média de duas réplicas efetuadas, para cada condição, e respetivo desvio padrão.	54

Figura 20. Diferença de cor (ΔE), calculada pela equação 1, para cada condição testada, após os diferentes ciclos de lavagem. Os resultados são apresentados como a média de duas réplicas para cada condição.	55
Figura 21. Atividade antioxidante de têxteis funcionalizados com a solução de biocoloração (SB) e dos respetivos têxteis controlo não tingidos. L-cisteína (0,3 g/L) foi usada como controlo positivo. Os resultados são apresentados em termos da média de três réplicas para cada condição e respetivo desvio padrão. As médias foram analisadas através de comparações múltiplas entre controlo positivo, a solução de biocoloração (SB) e o algodão (CO) com as restantes amostras, recorrendo ao teste <i>One-way</i> ANOVA (letras diferentes entre 2 valores indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste <i>Tukey</i> ($p \leq 0,05$)).	57
Figura 22. Atividade antioxidante de têxteis funcionalizados com a solução de biocoloração (SB) num intervalo de 8 meses. A atividade antioxidante foi avaliada em janeiro e em setembro de 2020, após cada uma das funcionalizações. O controlo positivo foi L-cisteína (0,3 g/L) e o controlo negativo é constituído pelos têxteis não tingidos. As amostras utilizadas foram algodão (CO), algodão tratado simultaneamente com alúmen de potássio (CO + AP), algodão pré-tratado com alúmen (CO_ ptAP) e algodão tratado simultaneamente com glicoxal e sulfato de alumínio a 10 g/L (CO + 1%Gli-1%SA). Os resultados são apresentados como a média de três réplicas para cada condição e respetivo desvio padrão. As médias foram analisadas através de comparações múltiplas, recorrendo ao teste <i>One-way</i> ANOVA (letras diferentes entre 2 valores indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste <i>Tukey</i> ($p \leq 0,05$)).	60
Figura 23. Atividade antioxidante da malha de algodão funcionalizada com a solução de biocoloração (CO + SB) medida logo após o tingimento e decorridos 8 meses, usando L-cisteína (0,3 g/L) como controlo. Os resultados são apresentados como a média de três réplicas para cada condição e respetivo desvio padrão. As médias foram analisadas recorrendo ao teste <i>One-way</i> ANOVA (letras diferentes entre 2 valores indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste <i>Tukey</i> ($p \leq 0,05$)).	61
Figura 24. Atividade antioxidante de têxteis funcionalizados com a solução de biocoloração (SB) e respetivos controlos após 1, 3 e 5 ciclos de lavagem. L-cisteína (0,3 g/L) foi usada como controlo positivo. As amostras utilizadas foram algodão (CO), algodão tratado simultaneamente com alúmen de potássio (CO + AP), algodão pré-tratado com alúmen (_ptAP) e algodão tratado simultaneamente com glicoxal e sulfato de alumínio a 10 g/L (CO + 1%Gli-1%SA). Os resultados são	

apresentados como a média de três réplicas para cada condição e respetivo desvio padrão. As médias foram analisadas através de comparações múltiplas, recorrendo ao teste *One-way ANOVA* (letras diferentes entre 2 valores indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste *Tukey* ($p \leq 0,05$))..... 62

Figura 25. Curva de crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com malhas de algodão funcionalizadas com solução de biocoloração (SB) e os respetivos controlos. As amostras utilizadas foram algodão (CO), algodão tratado simultaneamente com alúmen de potássio (CO + AP) ou com ácido tânico (CO + AT). Os têxteis foram colocados numa cultura bacteriana em meio LB com uma D.O.₆₀₀ inicial de 0,05, sendo a incubação a 37 °C e 200 rpm. A D.O.₆₀₀ foi medida ao longo de 5,5 horas. Apresentam-se os valores médios de três réplicas efetuadas, para cada ponto, e respetivo desvio padrão. 65

Figura 26. Curva de crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com malhas de algodão funcionalizadas com solução de biocoloração (SB). As amostras utilizadas foram algodão (CO), algodão pré-tratado com alúmen de potássio (CO_ptAP) e algodão pré-tratado com alúmen de potássio e simultaneamente com ácido tânico (CO_ptAP + AT). Os têxteis foram colocados numa cultura bacteriana em meio LB com uma D.O.₆₀₀ inicial de 0,05, sendo a incubação a 37 °C e 200 rpm. A D.O.₆₀₀ foi medida ao longo de 5,5 horas. Apresentam-se os valores médios de três réplicas efetuadas, para cada ponto, e respetivo desvio padrão. 67

Figura 27. Curva de crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com malhas de algodão funcionalizadas com solução de biocoloração (SB). As amostras utilizadas foram algodão (CO), algodão pré-tratado com ácido tânico (CO_ptAT) e algodão pré-tratado com ácido tânico simultaneamente com alúmen de potássio (CO_ptAT + AP). Os têxteis foram colocados numa cultura bacteriana em meio LB com uma D.O.₆₀₀ inicial de 0,05, sendo a incubação a 37 °C e 200 rpm. A D.O.₆₀₀ foi medida ao longo de 5,5 horas. Apresentam-se os valores médios de três réplicas efetuadas, para cada ponto, e respetivo desvio padrão. 68

Figura 28. Curva de crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com malhas de algodão funcionalizadas com solução de biocoloração (SB). As amostras utilizadas foram algodão (CO), algodão tratado simultaneamente com glioxal e sulfato de alumínio a 10 g/L (CO + 1%Gli-1%SA) e tratado simultaneamente com glioxal e sulfato de alumínio a 15 g/L e 5 g/L, respetivamente (CO + 1,5%Gli-0,5%SA). Os têxteis foram colocados numa cultura bacteriana em meio LB com uma D.O.₆₀₀ inicial de 0,05, sendo a incubação a 37 °C e 200 rpm. A D.O.₆₀₀ foi

medida ao longo de 5,5 horas. Apresentam-se os valores médios de três réplicas efetuadas, para cada ponto, e respetivo desvio padrão..... 68

Figura 29. Curva de crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com malhas de algodão funcionalizadas com solução de biocoloração (SB). As amostras utilizadas foram algodão (CO), algodão pré-tratado com quitosano (CO_ptQ), algodão pré-tratado com quitosano simultaneamente com alúmen de potássio (CO_ptQ + AP) e algodão pré-tratado com quitosano simultaneamente com ácido tânico (CO_ptQ + AT). Os têxteis foram colocados numa cultura bacteriana em meio LB com uma D.O.₆₀₀ inicial de 0,05, sendo a incubação a 37 °C e 200 rpm. A D.O.₆₀₀ foi medida ao longo de 5,5 horas. Apresentam-se os valores médios de três réplicas efetuadas, para cada ponto, e respetivo desvio padrão. 71

Figura 30. Curva de crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com malhas de algodão funcionalizadas com solução de biocoloração (SB). As amostras utilizadas foram algodão (CO), algodão pré-tratado com plasma (CO_ptP), algodão pré-tratado com plasma simultaneamente com alúmen de potássio (CO_ptP + AP) e algodão pré-tratado com plasma simultaneamente com ácido tânico (CO_ptP + AT). Os têxteis foram colocados numa cultura bacteriana em meio LB com uma D.O.₆₀₀ inicial de 0,05, sendo a incubação a 37 °C e 200 rpm. A D.O.₆₀₀ foi medida ao longo de 5,5 horas. Apresentam-se os valores médios de três réplicas efetuadas, para cada ponto, e respetivo desvio padrão. 72

Figura A1. Percentagem de redução de DPPH • ($\lambda = 517 \text{ nm}$) em função da concentração de ácido gálico.96

Figura A2. *Scan* da solução de trabalho de ABTS realizado no UV-Vis. 97

Figura A3. Reta de calibração com L-cisteína, o composto padrão utilizado na avaliação da atividade antioxidante pelo método de ABTS. 97

Figura A4. Curva de crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com malhas de algodão usada no rastreio inicial (CO do rastreio) e uma nova malha de algodão utilizada nos últimos ensaios (CO). Os têxteis foram colocados numa cultura bacteriana em meio LB com uma D.O.₆₀₀ inicial de 0,05, sendo a incubação a 37 °C e 200 rpm. A D.O.₆₀₀ foi medida periodicamente ao longo de 6,5 horas..... 98

Figura A5. Curva de crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com a nova malha de algodão após lavagem com água e com detergente padrão. Os têxteis foram colocados

numa cultura bacteriana em meio LB com uma D.O.₆₀₀ inicial de 0,05, sendo a incubação a 37 °C e 200 rpm. A D.O.₆₀₀ foi medida periodicamente ao longo de 6,5 horas. Apresentam-se os valores médios de duas réplicas efetuadas, para cada ponto, e respetivo desvio padrão.....98

Índice de tabelas

Tabela 1. Classificação dos corantes naturais segundo a sua estrutura química (adaptado de Siva, 2007; Patel, 2011; Saxena e Raja, 2015, Gürses, 2019).	9
Tabela 2. Estirpes de bactérias utilizadas nos ensaios para avaliação da atividade antibacteriana.	36
Tabela 3. Rendimentos de extração etanólica, em percentagem, dos extratos etanólicos de amostras de própolis do Gerês (G.EEs) recolhidas entre 2011 e 2019. *G17.EE não foi considerado nesta análise pelo facto de se tratar de uma amostra diferente, conforme referido.	41
Tabela 4. Atividade antibacteriana do extrato etanólico preparado com a amostra de própolis do Gerês recolhida em 2019 (G19.EE). A atividade antibacteriana foi expressa em valores de concentração mínima inibitória (CMI) ($\mu\text{g/mL}$).	44
Tabela 5. Valores obtidos para a força colorística (K/s) e fotografias dos têxteis tingidos com a solução de biocoloração (SB). Os resultados são apresentados como a média de três réplicas para cada condição e respetivo desvio padrão.	50
Tabela 6. Resultados obtidos após coloração, por esgotamento, com a solução de biocoloração (SB), antes e após os vários ciclos de lavagem, numa máquina de lavar convencional a 30 °C durante aproximadamente 1 h. As amostras utilizadas foram algodão (CO), algodão tratado simultaneamente com alúmen de potássio (CO + AP), algodão pré-tratado com alúmen de potássio (CO_ptAP) e algodão tratado simultaneamente com 1 % de glioxal e 1 % de sulfato de alumínio (CO + 1%Gli-1%SA).	53
Tabela 7. Parâmetros do crescimento - taxa específica de crescimento (h^{-1}), densidade ótica final, duração da fase de latência (h) e atividade antibacteriana (%) - de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 em contacto com malhas de algodão (CO), algodão tratado simultaneamente com alúmen de potássio (C + AP) ou com ácido tânico (CO+ AT) não funcionalizadas e funcionalizadas com a solução de biocoloração (SB). “-” indica não determinável.	66
Tabela 8. Parâmetros de crescimento - taxa específica de crescimento (h^{-1}), densidade ótica final, fase de latência (h) e atividade antibacteriana (%) - de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 em contacto com malhas de algodão (CO), algodão pré-tratado com alúmen de potássio (CO_ptAP), algodão pré-tratado com alúmen de potássio simultaneamente com ácido tânico (CO_ptAP + AT) e funcionalizadas com a solução de biocoloração (SB). “-” indica não determinável.	67

Tabela 9. Parâmetros do crescimento - taxa específica de crescimento (h^{-1}), densidade ótica final, duração da fase de latência (h) e atividade antibacteriana (%) - de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com malhas de algodão (CO), algodão pré-tratado com ácido tânico (CO_ptAT), algodão pré-tratado com ácido tânico simultaneamente com alúmen de potássio (CO_ptAT + AP) e funcionalizadas com a solução de biocoloração (SB). “-” indica não determinável. 69

Tabela 10. Parâmetros do crescimento - taxa específica de crescimento (h^{-1}), densidade ótica final, duração da fase de latência (h) e atividade antibacteriana (%) - de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com malhas de algodão (CO), algodão tratado simultaneamente com glicol e sulfato de alumínio a 10 g/L (CO + 1%Gli-1%SA) e tratado simultaneamente com glicol e sulfato de alumínio a 15 g/L e 5 g/L, respetivamente (CO + 1,5%Gli-0,5%SA) e funcionalizadas com a solução de biocoloração (SB). “-” indica não determinável..... 69

Tabela 11. Parâmetros do crescimento - taxa específica de crescimento (h^{-1}), densidade ótica final, duração da fase de latência (h) e atividade antibacteriana (%) - de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com malhas de algodão (CO), algodão pré-tratado com quitosano (CO_ptQ), algodão pré-tratado com quitosano simultaneamente com alúmen de potássio (CO_ptQ + AP) e algodão pré-tratado com quitosano simultaneamente com ácido tânico (CO_ptQ + AT) e funcionalizadas com a solução de biocoloração (SB). “-” indica não determinável..... 71

Tabela 12. Parâmetros do crescimento - taxa específica de crescimento (h^{-1}), densidade ótica final, duração da fase de latência (h) e atividade antibacteriana (%) - de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com malhas de algodão (CO), algodão pré-tratado com plasma (CO_ptP), algodão pré-tratado com plasma simultaneamente com alúmen de potássio (CO_ptP + AP) e algodão pré-tratado com plasma simultaneamente com ácido tânico (CO_ptP + AT) e funcionalizadas com a solução de biocoloração (SB). “-” indica não determinável..... 73

Tabela 13. Análise da densidade ótica final e da atividade antibacteriana (%) após 24 h de crescimento em meio LB a 37 °C e 200 rpm de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 quando em contacto com algodão tingido/funcionalizado com a solução de biocoloração (SB), previamente às lavagens e após 5 ciclos. 74

Tabela A1. Capacidade de captura do radical livre DPPH•, apresentada em valores de IC₅₀ (µg/mL), dos extratos etanólicos preparados com amostras de própolis do Gerês (G.EEs) recolhidas entre 2011 a 2016, 2018 e 2019. Os valores são apresentados na forma de média ± desvio

padrão. Realizou-se o teste *One-way* ANOVA (letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste *Tukey* ($p \leq 0,05$)).....100

Tabela A2. Atividade antibacteriana dos extratos etanólicos preparados com amostras de própolis do Gerês recolhidas entre 2011 e 2016, 2018 e 2019. A atividade antibacteriana foi expressa em valores de CMI ($\mu\text{g/mL}$). 101

1. Introdução

Atualmente, a poluição aquática é um dos maiores problemas a nível global, devido à libertação de vários produtos químicos nos cursos de água como consequência de processos industriais (Shanmugam *et al.*, 2018). Os corantes residuais de diferentes origens, tais como das indústrias têxtil e cosmética, são os principais responsáveis pela poluição aquática. Em 2019 foi estimada uma libertação anual de mais de 280 000 toneladas de corantes têxteis nos cursos de água (Tabasum *et al.*, 2019). Os corantes têxteis são amplamente utilizados para tingir *nylon*, lã, seda, algodão e couro devido aos seus reduzidos custos, reprodutibilidade e ampla gama de tonalidades (Baaka *et al.*, 2017). Porém, alguns corantes têxteis, nomeadamente os sintéticos, são prejudiciais para os seres humanos devido à sua possível toxicidade e carcinogenicidade (Benkhaya *et al.*, 2020). Além disso, também podem afetar a atividade fotossintética das plantas aquáticas, ao evitar a penetração da luz solar, e serem tóxicos para a fauna e flora aquáticas devido à presença de sais metálicos, entre outros (Selvaraj *et al.*, 2020).

A necessidade de contornar este problema para o ambiente tem conduzido ao incentivo da utilização de produtos naturais, especialmente a reintrodução de corantes naturais no tingimento de fibras têxteis (Ticha *et al.*, 2016). Estes corantes naturais apresentam diversas vantagens quando comparados com os sintéticos: para além de serem obtidos a partir de várias fontes naturais como plantas, insetos e/ou fungos, o resíduo resultante do tratamento do efluente é biodegradável e compatível com o meio ambiente, apresentando baixa toxicidade e efeitos alergénicos reduzidos (Ibrahim *et al.*, 2010; Hou *et al.*, 2013). Adicionalmente, conferem frequentemente a possibilidade de transferência de diversas propriedades biológicas, nomeadamente a atividade antimicrobiana e antioxidante, possibilitando assim a funcionalização dos substratos (Haji e Naebe, 2020). Portanto, torna-se essencial reforçar a investigação nesta área, de forma a otimizar e a rentabilizar a utilização de tais corantes naturais para um desenvolvimento capaz de responder às necessidades das indústrias têxteis.

No seguimento desta problemática, de encontrar alternativas aos processos de tingimento convencionais, os objetivos do presente trabalho centram-se na avaliação do potencial de própolis, um produto natural proveniente das colmeias, na coloração e funcionalização de têxteis de algodão, avaliando-se a performance dos substratos biocoloridos em termos da solidez da cor e das propriedades antimicrobiana e antioxidante à lavagem.

Inicialmente, a preparação do extrato de própolis e a avaliação das suas bioatividades (atividade antimicrobiana e antioxidante) foram realizadas no Departamento de Biologia da

Universidade do Minho. Posteriormente, os ensaios de coloração à escala micro-laboratorial foram concretizados no Centro de Nanotecnologia Materiais Técnicos, Funcionais e Inteligentes (CeNTI). Também nas instalações do CeNTI foi realizado o *scale up* dos ensaios preliminares, assim como a avaliação dos parâmetros de cor e da atividade antioxidante dos provetes coloridos. Os ensaios para caracterização das propriedades antibacterianas dos provetes coloridos foram realizados no Departamento de Biologia da Universidade do Minho.

1.1. Indústria têxtil

O aumento populacional e a globalização criaram a necessidade de produção em grande escala em diversas indústrias, nomeadamente na indústria têxtil, de modo a atender às necessidades do mercado (Carvalho e Santos, 2016; Selvaraj *et al.*, 2020). Atualmente é uma das indústrias mais globalizadas do mundo, sendo uma relevante fonte de rendimento e emprego de vários países. Gera cerca de 825 biliões de euros e emprega aproximadamente 35 milhões de trabalhadores em todo mundo, tornando-se importante para a coesão económica e social (Lellis *et al.*, 2019). Em países em desenvolvimento como a China, Índia, Paquistão ou Indonésia, entre outros (Bahadur e Bhargava, 2019), esta é uma indústria primordial, com um papel vital na economia (Lellis *et al.*, 2019).

Considerada a segunda maior indústria poluidora do mundo (Benkhaya *et al.*, 2020), a indústria têxtil está focada em reduzir a sua pegada ecológica através da economia circular e da sustentabilidade da produção. De facto, as empresas estão a adaptar-se para incorporar fibras recicladas e orgânicas, assim como fibras sintéticas biodegradáveis, tendo aumentado a procura por fios sustentáveis e com baixo impacto no meio ambiente (Direção Geral das Atividades Económicas (DGAE), 2018). Por exemplo, a Somelos Tecidos produz um tecido sustentável e biodegradável, que combina algodão com fibra de viscose, extraído do caule da rosa. Outro exemplo de empresa com boas práticas é a Riopelle, que produz tecidos funcionais e inovadores a partir de matérias-primas recicladas e incorporando ingredientes extraídos de resíduos agroalimentares para lhes conceder funcionalidades como a neutralização de odores ou propriedades antinódoas. A Penteadora – Sociedade Industrial de Penteação e Fiação de Lãs utiliza os desperdícios têxteis das suas empresas e cria um tecido cardado feito com, pelo menos, 50 % de resíduos de lã. Outras empresas trabalham com tecidos e peças elaboradas a partir dos seus próprios resíduos, usando fibras recicladas, biodegradáveis ou feitas a partir de produtos naturais

alternativos como a urtiga, ou usam botões produzidos com vários tipos de resíduos, como papel, cortiça, casca de arroz ou serrim (DGAE, 2018).

Em Portugal, a indústria têxtil e do vestuário representa um dos setores mais importantes na economia nacional, devido à criação de empregos e de riqueza, somando mais de 150 anos de atividade produtiva em grande escala (Nunes *et al*, 2015). Em 2018, este setor empregava 135521 pessoas (44837 nos têxteis e 90684 no vestuário), o que representava cerca de 19,7 % do total da indústria transformadora (DGAE, 2018).

1.1.1. Fibras têxteis: Algodão

A indústria têxtil tem como base a utilização de fibras. O Instituto Têxtil define fibra como uma matéria prima que normalmente se caracteriza pela sua flexibilidade, finura e elevada relação entre comprimento e espessura, podendo ser de dois tipos: naturais e não naturais (Broadbent, 2001). As fibras de origem natural são produzidas pela natureza (por exemplo, algodão), enquanto as não naturais são obtidas por processos industriais a partir de material sintético (por exemplo, poliéster). As fibras naturais podem ser ainda divididas em três subgrupos consoante a sua origem: animal, como a lã e a seda, que são à base de proteínas; vegetal, que têm como constituinte a celulose e onde se incluem o algodão, o linho e o rami; e as fibras de origem mineral, mais precisamente o amianto. Por sua vez, as fibras não-naturais podem ser sintéticas, se são obtidas a partir de polímeros que são transformados por ação de reagentes químicos, como por exemplo o poliéster; ou artificiais, como a viscose, que são fibras existentes na natureza numa forma não utilizável mas que se tornam funcionais através de processos químicos (Broadbent, 2001; Sinclair, 2014; Burkinshaw, 2016). A **Figura 1** mostra a classificação geral das fibras têxteis.

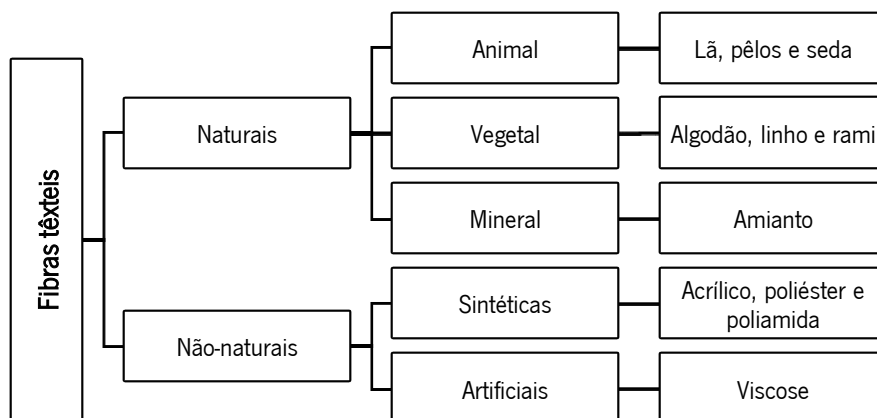


Figura 1. Classificação geral e exemplos de fibras têxteis (adaptado de Sinclair, 2014).

As fibras naturais são utilizadas como matéria-prima para a produção de têxteis desde tempos históricos. No século XIX, os cientistas desenvolveram as fibras sintéticas, como a viscose, o *nylon* e o poliéster, que afetaram a produção de fibras naturais (Pensupa *et al.*, 2017). Contudo, hoje em dia, devido às crescentes preocupações sobre o uso de recursos não naturais, as fibras naturais têm captado uma atenção renovada (Balla *et al.*, 2019).

O algodão é a fibra natural mais utilizada na indústria têxtil, devido às suas excelentes características, como suavidade, elevada hidrofiliidade, conforto, boa capacidade de descarga estática, fácil tingimento, aliado ao facto de ser renovável e biodegradável (Haji, 2013; Eid e Ibrahim, 2020). Deriva de uma planta do género *Gossypium* e é composta principalmente por celulose, um polímero formado a partir de unidades monoméricas de glicose (Pisitsak *et al.*, 2016), que pode ser descrito quimicamente como poli(1,4- β -D-anidroglicopiranosose) (**Figura 2**). Dada a presença de numerosos grupos -OH, o algodão é uma fibra higroscópica e facilmente tingível com corantes. No entanto, a eficiência da fixação dos corantes, nomeadamente os naturais, nesta fibra, é relativamente baixa. Quando imerso em água, como acontece durante o processo de tingimento, o algodão apresenta carga negativa conferida pelos grupos carboxilo e hidroxilo. Como a maioria dos corantes naturais apresenta também carga negativa, há repulsão entre as cargas negativas na superfície da celulose e os corantes naturais (Haji e Naebe, 2020). Para ultrapassar este problema e melhorar a coloração com corantes naturais, vários processos de tratamento podem ser aplicados, incluindo a utilização de mordentes como bio-mordentes e sais metálicos (Sinha *et al.*, 2016; Adeel *et al.*, 2018), cationização (Ticha *et al.*, 2016), tratamento com quitosano (Haji *et al.*, 2016; Haji, 2017), tratamento com plasma (Ahmed *et al.*, 2017; Gorjanc *et al.*, 2018) ou tratamento com proteínas vegetais (Pisitsak *et al.*, 2016).

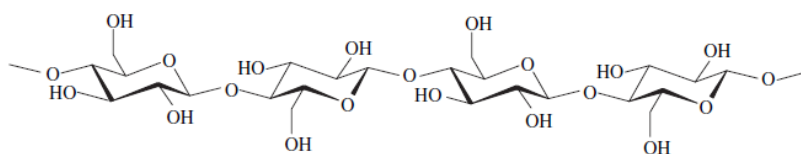


Figura 2. Estrutura química da celulose (retirado de Rattanaphani *et al.*, 2007).

As fibras de algodão constituem também um meio favorável para o crescimento de microrganismos - que podem multiplicar-se rapidamente em condições básicas de humidade, nutrientes e temperatura -, são suscetíveis ao amassar e apresentam efeitos negativos relacionados com a higiene e com a deterioração do tecido (Singh *et al.*, 2005; Karolia e

Mendapara, 2007). Neste sentido, uma nova geração de têxteis de algodão com características funcionais tem vindo a ser desenvolvida em resposta às necessidades e estilo de vida do consumidor (Zhou e Kan, 2013).

1.2. Tingimento têxtil

O tingimento ou coloração do substrato têxtil é um processo de adição de cor ao material têxtil, ocorrendo uma modificação físico-química do mesmo que o pode levar a adquirir infinitas cores (Samsami *et al.*, 2020). O nível de tingimento depende de fatores como a reatividade química do corante para a fibra, a concentração de corante, o tipo de têxtil a tingir, a temperatura e os auxiliares utilizados durante o processo (Ratnapandian, 2013). A cor deverá permanecer inalterada durante o tempo de vida útil do artigo. Para além da cor inicial do produto, os consumidores preocupam-se com a solidez da cor às lavagens, à exposição à luz e à transpiração (Carvalho e Santos, 2016).

A arte de tingir envolve a utilização de corantes, mas também de produtos auxiliares que permitem controlar as forças químicas responsáveis pela adsorção, absorção e fixação destes compostos corados às fibras. O processo de tingimento envolve três etapas: a preparação, o tingimento e o acabamento. A preparação consiste na remoção das impurezas indesejadas presentes no material têxtil, através de uma lavagem em meio aquoso com substâncias que podem ser alcalinas, detergentes ou enzimas, sendo esta etapa realizada pelo fornecedor. Na etapa de tingimento é aplicada a cor no material têxtil, tendo vindo a ser privilegiados corantes sintéticos. Ao longo deste processo adicionam-se os corantes e os auxiliares - como ácidos, bases, eletrólitos, agentes tensoativos e quelantes, entre outros - para que o substrato têxtil obtenha uma cor uniforme e com elevada solidez. Por fim, o acabamento envolve o tratamento com compostos químicos com o propósito de conferir uma melhoria na qualidade do têxtil (Ratnapandian, 2013).

Na indústria têxtil existem duas metodologias principais de coloração: a contínua e a descontínua. Na primeira, também conhecida por foulardagem (**Figura 3**), o têxtil passa por um banho e, posteriormente, entre dois rolos, a uma determinada pressão e velocidade, de modo a remover o excesso de solução e garantir que o corante é transferido uniformemente para a fibra (Ratnapandian, 2013; Munoz *et al.*, 2017).

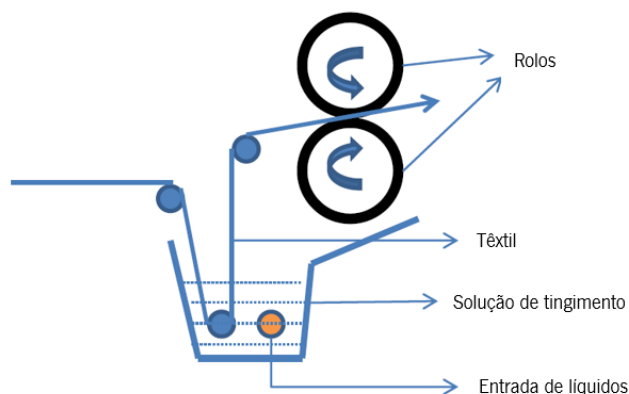


Figura 3. Diagrama representativo do processo de foulardagem (adaptado de Ratnapandian, 2013).

Na metodologia descontínua, usualmente designada como esgotamento, o têxtil é imerso numa solução contendo o corante, durante um certo período de tempo e a uma determinada temperatura, podendo estes fatores variar consoante a natureza do corante e da fibra (textura, morfologia e composição) (Ratnapandian, 2013). Esta tecnologia é mais complexa que a anterior, uma vez que é necessária agitação contínua e um controlo das condições de temperatura e pH. O banho de esgotamento é caracterizado por causar uma diminuição na quantidade de corante no banho e um aumento da concentração do mesmo no material têxtil a ser tingido (Munoz *et al.*, 2017).

Os corantes são compostos orgânicos, insaturados, com uma estrutura relativamente complexa que absorvem luz e conferem cor na região do visível (Benkhaya *et al.*, 2020). A parte insaturada é denominada cromóforo que, na luz visível, tem a capacidade de absorver e refletir uma determinada cor. Para se obter uma cor intensa é necessária também a presença de grupos recetores e doadores de eletrões chamados auxocromos ($-CO$, $-NO_2$, $-OH$, $-OCH_3$). Além da propriedade corante, estes compostos exibem geralmente boa solubilidade em água, o que se torna bastante importante, uma vez que os tingimentos ocorrem normalmente em meio aquoso (Carvalho e Santos, 2015; Burkinshaw, 2016; Beldean-Galea *et al.*, 2018).

Existe um elevado número de classes de corantes para aplicação têxtil disponíveis no mercado, nomeadamente ácido, azóico, básico, cuba, direto. No entanto, devido à grande diversidade de fibras existentes e às suas propriedades físico-químicas extremamente variáveis, torna-se impossível encontrar um corante e um processo de tingimento que possam ser universalmente aplicados a todas elas (Burkinshaw, 2016). Outra propriedade que importa considerar é a afinidade dos substratos têxteis - uma propriedade intrínseca da matéria, na qual

um corpo tem maior ou menor tendência a interagir com outro -, podendo neste contexto ser definida como a diferença entre o potencial químico do corante na fibra e o seu correspondente potencial químico no banho de tingimento em condições especificadas de temperatura, concentração, relação de banho e pH (Burkinshaw, 2016).

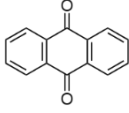
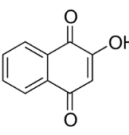
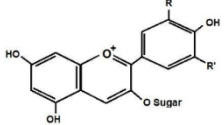
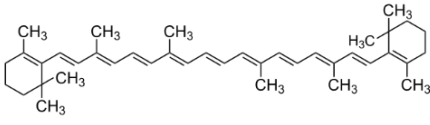
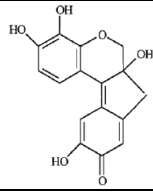
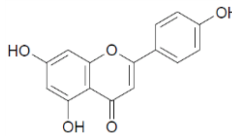
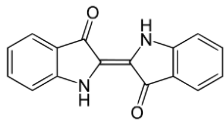
1.2.1. Coloração natural em substratos têxteis

Desde os tempos pré-históricos, os corantes naturais têm sido utilizados para diversos fins, nomeadamente para o tingimento têxtil (Sinha *et al.*, 2012). No entanto, com a industrialização e a descoberta de corantes sintéticos, a utilização de corantes naturais declinou rapidamente, levando à sua substituição quase completa pelos sintéticos. Estes últimos apresentam características essenciais ao tingimento, como estabilidade à luz, distribuição uniforme, elevado grau de fixação e resistência ao processo de lavagem (Baaka *et al.*, 2017; Rather *et al.*, 2017). Contudo, os corantes sintéticos não são biodegradáveis e apresentam níveis perigosos de substâncias com efeitos mutagénico e carcinogénico, sendo prejudiciais para os seres vivos e meio ambiente (Beldean-Galea *et al.*, 2018). Portanto, há um crescente interesse na reintrodução dos corantes naturais como substâncias ecológicas e atóxicas (Haji e Naebe, 2020).

Os corantes naturais provêm de recursos naturais e são, geralmente, classificados como vegetais, animais e minerais, com base na sua origem (Beldean-Galea *et al.*, 2018; Zerin *et al.*, 2019). Os corantes naturais, principalmente os obtidos de plantas, produzem diferentes cores, como amarelo, verde, rosa/vermelho, azul, castanho e uma combinação entre estas (Zhou *et al.*, 2015). Além disso, são constituídos principalmente por flavonóides, que apresentam diferentes propriedades biológicas como atividade antioxidante e antimicrobiana, entre outras (Zerin *et al.*, 2019). A utilização destes corantes nos processos de tingimento pode ser vista como um passo para o desenvolvimento contínuo de processos de tingimento e acabamento têxtil, e para uma maior sustentabilidade, nomeadamente no que diz respeito ao consumo de água, produtos químicos e energia (Bechtold *et al.*, 2003).

Os corantes naturais podem também ser classificados, de acordo com a sua estrutura química, em antraquinonas, α -hidroxinaftoquinonas, antocianinas, carotenóides, diidropiranos, flavonóides e indigo (**Tabela 1**) (Siva, 2007; Patel, 2011; Saxena e Raja, 2015; Gürses, 2019).

Tabela 1. Classificação dos corantes naturais segundo a sua estrutura química (adaptado de Siva, 2007; Patel, 2011; Saxena e Raja, 2015, Gürses, 2019).

Classe	Estrutura química
Antraquinonas	
α -hidroxinaftoquinonas	
Antocianinas	
Carotenóides	
Diidropiranos	
Flavonóides	
Indigo	

Do ponto de vista ambiental, a utilização de corantes naturais no processo de tingimento é bastante vantajosa e confere maior segurança para o planeta, pois sendo renováveis e biodegradáveis contribuem para a redução do uso de corantes de base petroquímica (Ibrahim, *et al.*, 2010; Hou *et al.*, 2013; Beldean-Galea *et al.*, 2018; Zerin *et al.*, 2020). Assim, podem ajudar a ultrapassar muitos dos problemas associados aos corantes sintéticos, como a poluição da água e a produção de efeitos colaterais nos seres vivos (Ticha *et al.*, 2016), para além de proporcionarem a produção de cores suaves e atrativas para o consumidor (Haji e Naebe, 2020).

Apesar das suas inerentes vantagens, os corantes naturais apresentam também algumas limitações. Entre elas incluem-se a dificuldade de reproduzir as cores pretendidas de forma contínua e a falta de conhecimento técnico aprofundado acerca dos processos de extração e de tingimento. Baixos rendimentos de extração requerem, por vezes, maior quantidade de corante e mais tempo de tingimento. Adicionalmente, a aplicação dos corantes naturais nos têxteis como passo único não é suficiente para ocorrer ligação ao substrato, daí ser frequentemente necessário recorrer à utilização de auxiliares para melhorar a fixação da cor e, consequentemente, a sua solidez (Kumar e Konar, 2011; Zerin *et al.*, 2019; Haji e Naebe, 2020).

1.2.1.1. Otimização dos processos de biocoloração têxtil

Tendo em conta as limitações do tingimento com corantes naturais, já mencionadas, torna-se fundamental a adição de agentes auxiliares no processo (Kumar e Konar, 2011). Estes auxiliares - que podem ser mordentes (como alúmen de potássio), ou agentes de ligação (como o glioxal) ou enzimas (como a lacase) – podem ser adicionados durante a etapa de coloração, ou ser utilizados para efetuar um pré ou pós-tratamento ao substrato têxtil (Ratnapandian, 2013). Muitos destes processos já estão estabelecidos na coloração de têxteis para melhorar a afinidade e a solidez às lavagens.

Utilização de mordentes

Os mordentes são compostos utilizados para facilitar a ligação entre o corante e os têxteis (Shahid *et al.*, 2013). Na indústria têxtil, os mais utilizados são os derivados de metais, como alumínio, ferro, cobre e estanho, na forma de sais. O alúmen de potássio, de baixo custo, boa disponibilidade e uso seguro, é o mordente metálico mais usado. Os taninos e o ácido tânico, compostos fenólicos presentes nas plantas, podem também ser usados como mordentes e introduzem grupos hidroxilo e carboxilo nas fibras (Shahid *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2018). Os diferentes tipos de mordentes podem originar cores distintas a partir do mesmo corante natural, bem como influenciar o brilho e a solidez da cor (Kumar e Konar, 2011). O mordente ideal será aquele que produzir um bom rendimento tintorial, em condições de tingimento exequíveis e a baixo custo, sem comprometer as propriedades das fibras. É igualmente importante que o mordente não produza qualquer efeito nocivo.

Os mordentes podem ser aplicados em 3 fases distintas: pré-mordentagem, mordentagem em simultâneo (*in situ*) ou pós-mordentagem. Na pré-mordentagem, os têxteis são inicialmente

tratados com uma solução aquosa que contém os mordentes e posteriormente tingidos. Por sua vez, quando a mordentagem é realizada em simultâneo com a coloração, o mordente é adicionado diretamente no banho de coloração, onde o têxtil ficará submerso. Relativamente ao processo pós-mordentagem, o têxtil é tingido primeiro e posteriormente tratado com o mordente, utilizando-se um banho distinto daquele previamente usado na coloração (Kundal *et al.*, 2016).

Yusuf *et al.* (2012) recorreram a extratos de folhas de *Lawsonia inermis* para investigar as propriedades de tingimento em fios de lã, realizando uma pré-mordentagem com sais metálicos, como o alúmen de potássio e o sulfato de ferro. Demonstraram que a utilização de mordentes se traduziu numa melhor absorção do corante e em melhores propriedades de solidez da cor (exposição à luz, lavagem e fricção), comparativamente aos resultados obtidos sem pré-mordentagem. Ali *et al.* (2010) testaram um corante natural extraído da casca de *Acacia nilotica* no tingimento de tecidos de algodão, comparando os ensaios com e sem mordentes, em termos de características de cor e propriedades de solidez. Os autores verificaram que a pré-mordentagem com ácido tânico, sulfato ferroso, sulfato de zinco e sulfato de alumínio não só melhorou a profundidade da cor e o brilho, mas também as propriedades de solidez do corante natural (Ali *et al.*, 2010).

Utilização de enzimas

O recurso a enzimas para alterar a superfície de um têxtil também é possível, com diferentes tipos de enzimas como proteases, amilases, lipases, diastases e lacases a poder ser aplicadas nas diferentes etapas do processamento (Shahid *et al.*, 2013). A sua utilização permite o desenvolvimento de metodologias não prejudiciais ao meio ambiente, durante o processamento de fibras têxteis, e de estratégias que visam melhorar a qualidade do produto final. As enzimas possuem características que as tornam favoráveis relativamente aos compostos químicos convencionais, ou aos catalisadores microbianos, tais como a elevada eficiência de catálise, o nível de especificidade elevado e a ausência de reações paralelas. Para além disso, são biodegradáveis, não poluentes e permitem a operação a baixas temperaturas. Estudos mostraram que o tratamento com enzimas (amilase, amiloglicosidase e tripsina) melhora a absorção de corante e as propriedades de resistência das fibras ao encolhimento (Vankar e Shanker, 2008, Su *et al.*, 2018). A utilização destas enzimas na indústria têxtil permite assim a substituição da elevada quantidade de compostos químicos utilizados no processo de tingimento convencional.

Modificação da superfície têxtil

A modificação da superfície têxtil corresponde a uma alteração do têxtil com o objetivo de modificar a sua composição e características químicas e obter propriedades específicas, como maior capacidade de tingimento e afinidade (Patiño *et al.*, 2011).

Um dos processos de pré-tratamento muito utilizado no têxtil de algodão é a cationização, que possibilita a transferência de cargas positivas para a celulose, tornando-a mais reativa face aos corantes. Este processo oferece vantagens significativas, tais como o tingimento em menos tempo e, conseqüentemente, a utilização de menos energia e compostos químicos, traduzindo-se num menor impacto ambiental, maior rendimento na coloração e melhores propriedades de solidez da cor em comparação com o algodão sem pré-tratamento (Acharya *et al.*, 2014). A cationização é normalmente realizada com compostos químicos mas uma abordagem mais ecológica poderá ser o uso de biopolímeros anexados a grupos amino como, por exemplo, o quitosano (Rattanaphani *et al.*, 2007). Este é um polissacarídeo policatiónico, que adquiriu grande importância na aplicação têxtil principalmente devido à sua biocompatibilidade, não toxicidade e excelentes propriedades biológicas. Quimicamente (**Figura 4**), é bastante semelhante à celulose, sendo composto por 2-amino-2desoxi- β -D- glucopiranosose ligado a β -(1,4), obtido por desacetilação da quitina, amplamente presente na natureza como no exosqueleto de insetos e de invertebrados marinhos (caranguejos e camarões) (Shahid-ul-Islam *et al.*, 2018).

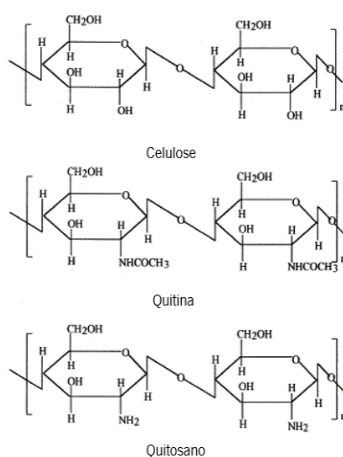


Figura 4. Estruturas químicas da celulose, da quitina e do quitosano (adaptado de Kumar, 2000).

Devido à sua natureza policatiónica, o quitosano possui boas propriedades antimicrobianas contra bactérias e fungos através da interação iônica na superfície das células, tornando-se uma opção atraente para o tingimento e acabamento antimicrobiano de algodão e

outros têxteis (Ye *et al.*, 2005). No entanto, devido à presença de grupos amina, os derivados do quitosano podem perder as suas propriedades em condições alcalinas, para além de poderem apresentar baixa ancoragem em superfícies de têxteis, o que limita a sua aplicação (Pan *et al.*, 2019). Este problema poderá ser ultrapassado através da utilização de agentes de ligação, como o glioxal, o glutaraldeído ou o ácido cítrico, de forma a aumentar a durabilidade do quitosano nos substratos têxteis (Sadeghi-Kiakhani *et al.*, 2015; Jawad *et al.*, 2019).

No contexto do tingimento, o quitosano incrementa também a absorção do corante pelas fibras de algodão, podendo ser utilizado como agente de ligação na etapa de coloração (Shahidi *et al.*, 2013). Com efeito, Gupta e Haile (2007) demonstraram que o algodão pré-tratado com quitosano apresenta maior capacidade para ser colorido e que foi possível obter tons brilhantes com elevada solidez à lavagem. Também Silva *et al.* (2018) aplicaram um pré-tratamento de quitosano em algodão que foi tingido com extratos de folhas de eucalipto e verificaram que este pré-tratamento poderá substituir a utilização de mordentes, uma vez que proporcionou aos tecidos maior resistência à cor e melhores propriedades de solidez, tornando o processo de tingimento mais sustentável.

Nos últimos anos, têm sido desenvolvidas outras abordagens de modificação de superfície têxtil, como por exemplo o tratamento com plasma (**Figura 5**). Também conhecido pelo “quarto estado da matéria”, o plasma é um gás eletricamente neutro e configura atualmente um dos métodos mais utilizados, por ser mais sustentável e ecológico, não requerendo banhos de funcionalização nem produzindo resíduos pós-tratamento (Hussain e Wahab, 2018). Na prática, o tratamento com plasma induz uma modificação físico-química da superfície das fibras têxteis através de vários processos simultâneos, como ativação, ataque químico, adição de grupos funcionais químicos e reticulação (Zanini *et al.*, 2018). Este tratamento utiliza diversos gases, como oxigénio, azoto, hidrogénio, árgon, na sua forma pura ou em diferentes combinações. O tratamento dos têxteis com plasma com oxigénio produz radicais, grupos funcionais e aumenta a rugosidade devido ao bombardeamento de iões na superfície dos substratos. A rugosidade aumenta a aderência dos materiais de deposição aos extratos (Rani *et al.*, 2018). A aplicação da tecnologia de plasma é de grande interesse para os processos de pré-tratamento e de acabamento uma vez que apenas altera as propriedades químicas e topográficas da camada mais externa do substrato, sem alterar as propriedades do têxtil (Zanini *et al.*, 2018).

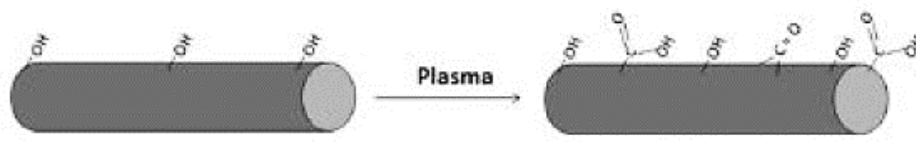


Figura 5. Efeito do pré-tratamento de plasma na funcionalização da superfície da celulose (adaptado de Shahidi *et al.*, 2013).

De uma forma geral, o plasma pode ser dividido em duas categorias: térmicos ou quentes e não térmicos ou frios. Os primeiros excedem temperaturas extremamente elevadas, acima de 700 °C enquanto os segundos são gerados pela aplicação de um campo elétrico elevado no qual a temperatura permanece próxima da temperatura ambiente. O plasma não térmico é particularmente adequado para a modificação e para o processamento de superfícies têxteis, uma vez que estes são normalmente polímeros sensíveis ao calor (Ratnapandian, 2013; Zille *et al.*, 2015).

Na indústria têxtil, o tratamento de plasma não térmico à pressão atmosférica (**Figura 6**) é mais adequado do que o tratamento químico ou de baixa pressão, porque apresenta maior eficácia, maior rapidez e é mais económico e amigo do ambiente (Prysiashnyi *et al.*, 2013). Segundo a literatura, o tratamento com plasma melhora o tingimento (Kamel *et al.*, 2011), a solidez da cor (Yaman *et al.*, 2009) e aumenta os grupos funcionais de oxigénio dos têxteis de algodão (Rani *et al.*, 2018). Ibrahim *et al.* (2012) melhoraram as funcionalidades anti-UV e antibacterianas de tecidos contendo celulose utilizando um pré-tratamento com plasma de oxigénio.



Figura 6. Sigma Technologies International – Atmospheric Plasma Treatment System - Equipamento do CeNTI para o pré-tratamento a nível industrial de substratos têxteis com plasma não térmico à pressão atmosférica.

1.2.2. Avaliação da cor nos têxteis

A cor é a parte da percepção visual que os humanos têm face a tudo que os rodeia, e que resulta dos diferentes comprimentos de onda da luz (King, 2017). Para que um material possua cor é necessário que tenha a capacidade de absorver e refletir radiações eletromagnéticas com um determinado comprimento de onda e intensidade. Para os humanos, a luz visível é a zona do espectro eletromagnético com radiação entre um comprimento de onda de 380 a 780 nanómetros (nm). Dependendo do observador, e da intensidade da cor, os valores típicos do espectro eletromagnético, na zona do visível, são a 450 nm azul, de 500 a 550 nm verde, a 580 nm amarelo, a 600 nm laranja e a 650 nm vermelho (Hu *et al.*, 2020) (Figura 7).

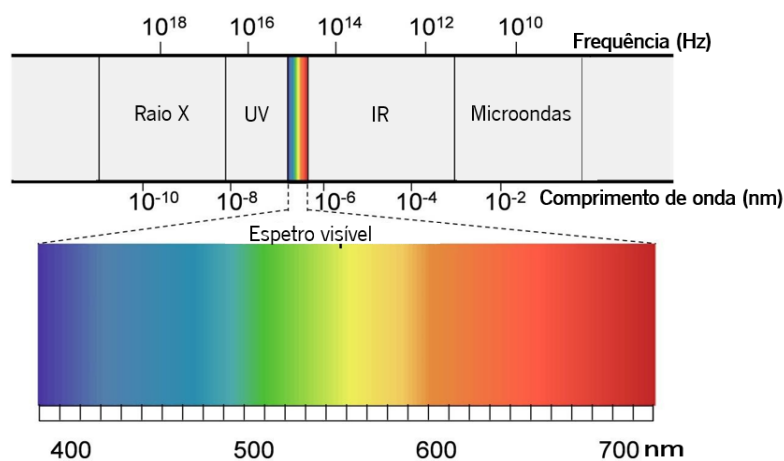


Figura 7. Espectro eletromagnético (adaptado de Hu *et al.*, 2020).

A cor é uma componente altamente significativa no quotidiano do ser humano. Por exemplo, a percepção visual da cor dos alimentos está entre os primeiros estímulos sensoriais a serem notados ao ingerir um alimento. A cor domina também a indústria têxtil e do vestuário, onde encontramos cores específicas associadas a determinados momentos (King, 2017).

Como a cor é uma percepção visual do olho humano e é dependente do observador, a sua quantificação requer estudos de colorimetria, que por sua vez englobam um conjunto de técnicas referentes à medição, avaliação e quantificação da cor, sendo a base fundamental para a especificação da aparência de cores uniformizada pela Comissão Internacional da Iluminação (CIE) (Cukurel *et al.*, 2012).

Na indústria têxtil, utiliza-se o sistema CIELab para quantificar a cor (Broadbent, 2001). O método baseia-se na obtenção dos valores das coordenadas L^* , a^* e b^* . L^* é uma medida da

luminosidade do têxtil, que varia entre 0 (preto) a 100 (branco); a^* é uma medida do carácter vermelho-verde do têxtil, correspondendo valores positivos (+) ao vermelho e os valores negativos (-) ao verde; e b^* é uma medida do tom amarelo-azul do têxtil, em que os valores positivos (+) são relativos ao amarelo e os valores negativos (-) ao azul (**Figura 8**) (Rossi *et al.*, 2017). Os valores de L^* , a^* e b^* da amostra a estudar, neste caso um têxtil colorido, são determinadas num colorímetro. As coordenadas de cor obtidas permitirão a quantificação das diferenças de cor entre o controlo e as amostras (ΔE), através da equação 1.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (\text{Equação 1})$$

onde, ΔE é a diferença de cor entre as referências e as amostras, enquanto ΔL^* , Δa^* e Δb^* correspondem, respetivamente, à diferença entre a amostra padrão e as amostras em estudo relativamente aos valores nos eixo a^* , b^* e L^* (Broadbent, 2001).

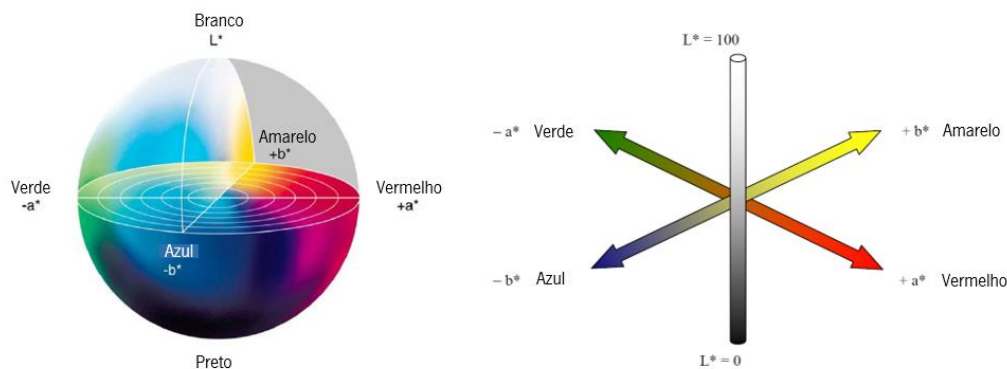


Figura 8. Representação das coordenadas de cor L^* , a^* , b^* segundo o sistema CIE Lab (adaptado de Liew *et al.*, 2008 e Cortez *et al.*, 2017).

A medida da cor baseia-se na razão entre a radiação absorvida (K) e a radiação dispersa (S) pelo substrato têxtil, sendo definida como a força colorística (K/s), na região visível do espectro (400-700 nm), e expressa pela equação de Kubelka-Munk (equação 2):

$$K/s = \frac{(1 - R)^2}{2R} \quad (\text{Equação 2})$$

onde K é o coeficiente de absorção, R a refletância da amostra tingida e s é o coeficiente de dispersão (Yusuf *et al.*, 2016).

1.3. Funcionalização têxtil com compostos naturais

A crescente preocupação com a saúde e com o bem-estar leva a indústria têxtil a procurar novas tecnologias para o desenvolvimento de produtos que correspondam às necessidades e expectativas dos consumidores (Shahid *et al.*, 2017). Em paralelo, o rápido crescimento da população e a melhoria do estilo de vida, principalmente nas áreas da saúde e bem-estar, impulsionam o desenvolvimento de têxteis com propriedades funcionais como atividade antimicrobiana e antioxidante - funcionalizações consideradas primordiais para a saúde, uma vez que podem proteger as pessoas de serem infetadas por microrganismos nocivos ou impedir o stresse oxidativo causado por espécies nocivas, como radicais ativos de oxigénio. Segundo a literatura, os têxteis funcionais destinados a uma aplicação na saúde eram, geralmente, tratados com produtos químicos, como por exemplo aminas aromáticas, compostos contendo formaldeído e derivados de fenóis (Hoenich, 2006; Monier e Abdel-Latif, 2013; Zhang *et al.*, 2013). No entanto, estas substâncias químicas apresentam elevada toxicidade e dificuldade em degradar-se naturalmente (Dong *et al.*, 2019). Portanto, recentemente, assiste-se a um interesse mundial pelos compostos naturais, devido às suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade, reduzida toxicidade e inúmeras propriedades multifuncionais, tais como repelência de insetos, proteção ultravioleta, atividade antimicrobiana, capacidade antioxidante, entre outras, que podem ser transferidas para diferentes substratos, como os têxteis (Shahid *et al.*, 2017).

O desenvolvimento de têxteis funcionais com compostos naturais bioativos afigura-se altamente promissor, uma vez que existe um alto potencial químico, biológico e farmacológico em muitos compostos biologicamente ativos. Nos últimos anos tem-se assistido a um esforço para identificar novas fontes de corantes naturais (Haddar, *et al.*, 2014) e para os reintroduzir no processo de tingimento e de funcionalização têxtil (Bechtold *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2015; Shahid *et al.*, 2017). Uma das formas mais usuais para a funcionalização de têxteis, sem comprometer o seu aspeto original, é através do processo de acabamento, comumente usado para melhorar o aspeto do têxtil e aumentar a sua durabilidade. De seguida, serão abordados dois tipos de funcionalidades, a atividade antioxidante e a antimicrobiana, por serem das mais procuradas e contempladas no presente trabalho.

1.3.1. Têxteis com atividade antioxidante

Uma das funcionalidades têxteis recentemente explorada tem sido a atividade antioxidante. Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de estabilizar, quelar e remover radicais livres, sem eles próprios se tornarem prejudiciais ou instáveis, prevenindo as consequências adversas das espécies reativas de oxigénio (ROS), como o radical hidroxilo, o peróxido de hidrogénio, e de espécies reativas de azoto (RNS), nomeadamente o óxido nítrico (Alonso *et al.*, 2013). A maioria dos radicais livres produzidos pode ser eliminados através da remoção das enzimas que os geram ou da ativação de defesas enzimáticas (catalase) e/ou não enzimáticas (flavonoides). No entanto, um desequilíbrio entre a produção de radicais e a capacidade antioxidante, poderá levar a danos oxidativos nos lipídios da membrana, proteínas e ácidos nucleicos, levando à morte celular ou à aceleração de várias doenças como cancro, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Ferreira *et al.*, 2007; Karamian e Ghasemlou, 2013). Assim, os antioxidantes desempenham um papel fundamental na defesa do organismo contra os radicais livres, que estão envolvidos na patogénese de várias doenças crónicas e degenerativas (Alonso *et al.*, 2013).

Para avaliar o potencial antioxidante existem diferente metodologias, sendo os métodos de ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfónico)] e do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) dos mais usados. O ABTS é um composto quimicamente estável, solúvel em água e que se apresenta incolor na forma reduzida. Pode ser convertido num catião radicalar estável de cor azul-esverdeada ($\text{ABTS}^{\bullet+}$), por reações de oxidação com radicais orgânicos ou inorgânicos e espécies não radicalares (Erel, 2004). Este método consiste na análise espectrofotométrica da atividade oxidante do radical catiónico ($\text{ABTS}^{\bullet+}$), que pode ser produzido através da reação em solução aquosa entre o ABTS e o persulfato de potássio, originando uma solução azul-esverdeada. A adição de substâncias com poder antioxidante ao $\text{ABTS}^{\bullet+}$, como os compostos fenólicos, por exemplo, provoca uma alteração estrutural que se traduz na descoloração e perda da capacidade de absorver a 734 nm (**Figura 9**) (Pannala *et al.*, 2001; Zemljič *et al.*, 2014).

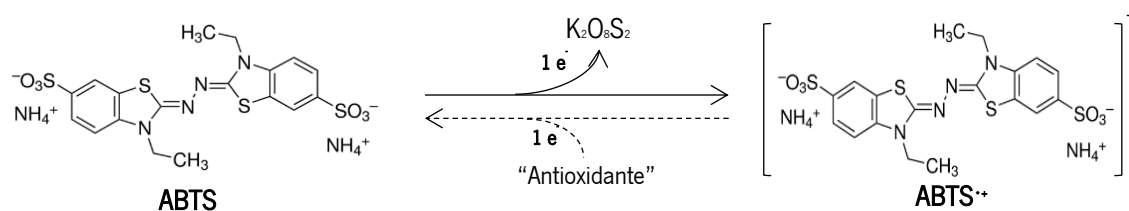


Figura 9. Mecanismo de reação do radical livre 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido-sulfônico) (ABTS), originando a sua forma reduzida (adaptado de Pannala *et al.*, 2001).

O DPPH • é um radical livre estável que possui um eletrão de valência não emparelhado que pode ser doado. Este método baseia-se na redução de DPPH • em solução de metanol na presença de um antioxidante doador de hidrogénio, originando a produção da forma não radicalar DPPH-H (**Figura 10**). Esta transformação vai resultar na mudança da cor púrpura da solução para amarela, que é medida espectrofotometricamente a 517 nm (Mitra e Uddin, 2014).

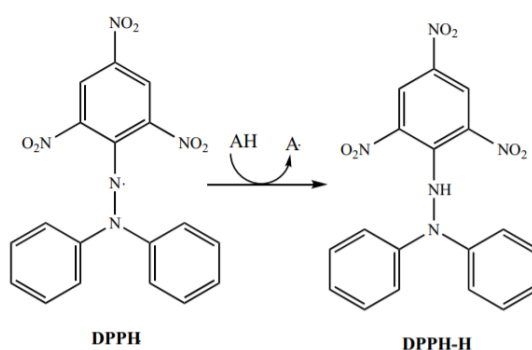


Figura 10. Conversão de DPPH • à sua forma reduzida (DPPH-H) na presença de agentes antioxidantes dadores de hidrogénio (AH) (retirado de Gulcin, 2020).

Ambas as metodologias são simples e de rápida execução, mas o método do ABTS permite avaliar uma ampla gama de valores de pH, que é útil para estudar o efeito do pH nos mecanismos antioxidantes. Além disso, o radical de ABTS é solúvel em solventes aquosos e orgânicos, o que permite a determinação da capacidade antioxidante de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos, enquanto o método de DPPH só é aplicável a sistemas hidrofóbicos (Gulcin, 2020).

Têxteis com propriedades antioxidantes podem funcionar como um sistema de reservatório, fornecendo constantemente antioxidantes à pele. Quando em contacto com a pele, terão a capacidade de eliminar os radicais livres causados pela degeneração da pele e de proteger os tecidos da pele do stresse e de danos oxidativos. No entanto, até ao momento, a funcionalização de têxteis com propriedades antioxidantes não tem sido muito estudada (Li *et al.*, 2019). A pele é

cada vez mais utilizada como uma via de administração de compostos. Têxteis com atividade antioxidante poderão ter um grau de difusão na pele semelhante à dos adesivos transdérmicos aplicados no campo farmacêutico (Alonso *et al.*, 2013), permitindo eliminar radicais que possam ser altamente reativos e nocivos, como os radicais de oxigênio reativos (Zhou *et al.*, 2015).

Recentemente foi descoberto que alguns extratos de plantas apresentam propriedades de eliminação de radicais livres, após a aplicação em substratos têxteis, conferindo-lhes assim um acabamento antioxidante (Pan *et al.*, 2017; Rather *et al.*, 2017). Koh e Hong (2014) analisaram a capacidade antioxidante de fibras de algodão coloridas com extrato de castanha através do método do DPPH e verificaram que atividade antioxidante, de aproximadamente 90 %, tinha aumentado significativamente após biocoloração. Por sua vez, Shabbir *et al.*, (2018), através do método de ABTS, observaram que amostras de tecido de lã tingidas com calêndula, a uma concentração igual ou superior a 15 %, apresentaram uma atividade antioxidante superior a 95 %. Assim, a excelente atividade de eliminação de radicais por parte dos tecidos tingidos com corantes naturais poderá ser utilizada para a produção de vestuário de proteção e têxteis cosméticos (Shahid *et al.*, 2017).

1.3.2. Têxteis com atividade antimicrobiana

As superfícies têxteis são locais propícios ao crescimento de microrganismos, tais como fungos e bactérias, que podem causar odores desagradáveis, perda de cor e durabilidade do têxtil e, não menos importante, riscos para a saúde humana, como a transmissão de doenças infecciosas (Singh *et al.*, 2005; Purwar, 2019). As fibras naturais de algodão, constituídas por celulose, são particularmente propensas a estas alterações, pois fornecem as condições básicas como humidade, oxigênio e temperatura necessárias ao crescimento e multiplicação microbianos (Singh *et al.*, 2005). Assim, a propriedade antimicrobiana torna-se importante para a aplicação na área têxtil por proteger o utilizador de microrganismos patogénicos ou causadores de odores, bem como por proteger os têxteis de alterações estéticas indesejáveis, como descoloração, degradação e formação de bolores (Mahlting *et al.*, 2005; Gao e Cranston, 2008). Além disso, a mudança de atitude dos consumidores face a hábitos de higiene e a estilos de vida têm incentivado a investigação e desenvolvimento de têxteis funcionais, como curativos, máscaras antibacterianas e ligaduras (Zhou *et al.*, 2020). Neste âmbito, são vários os agentes antimicrobianos usualmente usados para aplicação têxtil, como compostos quaternários de amónia, organometálicos, triclosano, nanopartículas de metais nobres e de óxidos metálicos (Simoncic e Tomsic, 2010). Embora estes agentes sejam muito eficientes contra uma diversidade de micróbios e apresentem

uma boa durabilidade nos têxteis, são tóxicos na sua grande maioria, quer para a saúde humana, quer para o meio ambiente (Ali *et al.*, 2014).

Mais recentemente, verificou-se um aumento da utilização de compostos ativos naturais derivados de microrganismos, animais e plantas (Gargoubi *et al.*, 2016). As plantas são consideradas a principal fonte de agentes bioativos naturais, devido à presença de alcaloides, flavonoides, curcuminóides, taninos e quinonas nos seus extratos (Son *et al.*, 2007; Murugesu e Ravindra, 2015). Os corantes naturais à base de taninos parecem ser mais eficazes na inibição do crescimento bacteriano (Shahid *et al.*, 2013). A romã, por exemplo, para além de poder ser usada em biocoloração, possui elevada atividade antimicrobiana atribuída à presença de grande quantidade de taninos (Joshi *et al.*, 2009). A atividade antimicrobiana dos corantes dependerá dos compostos bioativos e da estrutura química dos grupos funcionais neles presentes (Shahid *et al.*, 2013), bem como da ligação do agente de ligação/mordente com a fibra celulósica (Purwar, 2019).

O desenvolvimento de têxteis bioativos levou à necessidade de criar métodos para determinar a sua eficácia. Estes podem ser simples, como a observação dos halos de inibição e contagem de unidades formadoras de colónias (UFC), ou mais complexos, como a citofluorometria. Um dos métodos consiste no teste de difusão em agar, que é relativamente simples, rápido, económico e particularmente adequado quando existe um grande número de amostras a analisar. Trata-se de um método qualitativo, baseado na observação do crescimento microbiano à volta do substrato funcional, que foi colocado num meio sólido inoculado com o microrganismo indicador de suscetibilidade. A atividade antimicrobiana é indicada pelo aparecimento de uma área de tamanho variável, ao redor do halo, na qual o crescimento dos microrganismos é inibido (Gao e Cranston, 2008; Ristić *et al.*, 2011). Outro método qualitativo e de fácil realização é o seguimento da curva de crescimento do microrganismo, colocado em contacto com a amostra em estudo, em meio líquido.

Existem diversos procedimentos normativos para a avaliação da atividade antimicrobiana em têxteis, estabelecidos por diversas entidades reguladoras. Alguns desses métodos encontram-se descritos nas normas AATCC 147-2004 (*American Association of Textile Chemists and Colorists*), ISO 20645:2004 (*Determination of antibacterial activity – Agar diffusion plate test*) e JIS L 1902:2008 (*Testing for antibacterial activity and efficacy on textile products*) (Ristić *et al.*, 2011). Por outro lado, os métodos quantitativos baseiam-se na suspensão e contagem de

microrganismos, permitindo especificar um nível de atividade antimicrobiana; no entanto, são ensaios mais morosos e dispendiosos. Estes testes encontram-se descritos nas normas AATCC 100:2004 (*Antimicrobial Fabric Test*) e ISO 20743:2007 (*Determination of antibacterial activity of antibacterial finished products*). Neste tipo de teste, o inóculo deverá ser totalmente absorvido pelo substrato têxtil tratado, garantindo o contacto íntimo entre este e as bactérias (Gao e Cranston, 2008). Os microrganismos sobreviventes são extraídos das amostras por agitação, num volume conhecido de líquido neutralizante, sendo posteriormente recuperados e contabilizados como unidades formadoras de colónias (UFC). Os resultados são apresentados em percentagem ou $\log_{10}$ da redução microbiana ou a inibição do crescimento é expressa com base nas diferenças entre as amostras de teste e as de controlo (Ristić *et al.*, 2011).

As bactérias *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) e *Escherichia coli* (Gram-negativa), juntamente com *Klebsiella pneumoniae* (Gram-negativa), são as mais usadas em estudos de avaliação dos efeitos antibacterianos de têxteis funcionalizados. Lee e colaboradores (2009) analisaram a funcionalização antibacteriana em fibras de algodão, lã e seda tingidas com corantes naturais, extraídos de várias fontes (peónia, cravo, romã, castanha). Todas as fibras coradas apresentaram excelentes valores de atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (taxa de redução de 96,8 – 99,9 %). Ibrahim *et al.* (2010) usaram o método quantitativo para avaliar a atividade antibacteriana de fibras de algodão tingidas com diferentes extratos naturais (ruiva-dos-tintureiros, curcuma, cebola e hena) neste caso contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O extrato preparado com rizomas de curcuma apresentou a melhor atividade antibacteriana, com uma percentagem de redução de 99,9 % de *Staphylococcus aureus* e de 96,6 % em *Escherichia coli*. Koh e Hong (2014) verificaram que os tecidos de algodão tratados com extrato de castanha apresentaram excelente atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (percentagem de redução de 99,9 %) e *Klebsiella pneumoniae* (94,5 %). Por sua vez, Chakraborty *et al.* (2020) aplicaram o método de difusão em agar para analisar a atividade antibacteriana de algodão tingido com um extrato natural de *Acacia auriculiformis*, revelando-se este um extrato satisfatório, quer contra *Staphylococcus aureus* (taxa de redução de 96,82 %) quer contra *Escherichia coli* (97,19 %).

1.4. Própolis – Um produto natural da colmeia

O própolis, geralmente conhecido como “cola de abelha” (Pasupuleti *et al.*, 2017), é uma substância resinosa lipofílica que as abelhas, sobretudo *Apis mellifera* L., recolhem de diversas

plantas e misturam com a enzima salivar β -glicosidase, sendo assim digerido e misturado com cera e outros produtos do metabolismo das abelhas para formar o produto final (de Groot, 2013; Silva-Carvalho *et al.*, 2015). Etimologicamente, a palavra própolis deriva do grego: *pro* significa defesa e *polis* significa cidade ou comunidade, aludindo às suas funções na colmeia, uma vez que as abelhas usam este produto natural como proteção contra predadores e microrganismos, para reparação de danos mecânicos, como isolante térmico, e para construir locais asséticos para prevenir infecções microbianas das larvas (Silva-Carvalho *et al.*, 2015; Pasupuleti *et al.*, 2017).

O própolis apresenta um cheiro aromático muito característico e agradável e a sua cor varia entre o amarelo, verde ou vermelho ou mesmo castanho-escuro, dependendo da fonte vegetal (de Groot, 2013; Pasupuleti *et al.*, 2017). Apresenta-se duro e quebradiço quando frio, semelhante à cera fria, mas torna-se maleável e muito pegajoso a temperaturas elevadas (Pasupuleti *et al.*, 2017).

O própolis é comercializado em diferentes partes do mundo e é reconhecido como uma importante fonte de compostos com propriedades funcionais para diversas aplicações (Fokt *et al.*, 2010). Desde os tempos primordiais da humanidade, o própolis tem sido usado na medicina tradicional, cedo adquirindo popularidade entre egípcios, árabes, gregos e muitos outros povos (Moreira *et al.*, 2008). Para os egípcios, o própolis foi utilizado devido às suas propriedades antiputrefativas e à sua capacidade para embalsamar os cadáveres. Os incas usavam-no como agente antipirético e os médicos gregos e romanos utilizavam-no como desinfetante oral, como antisséptico e para curar feridas, sendo prescrito para o tratamento tópico da pele e das mucosas. Nos estados Balcãs utilizavam o própolis para tratar feridas, queimaduras, dor de garganta e úlceras gástricas. Registado como medicamento oficial na farmacopeia de Londres, no século XVII, o própolis tornou-se muito popular na Europa desde então, principalmente devido à sua atividade antibacteriana (Fokt *et al.*, 2010). Atualmente é utilizado em produtos farmacêuticos e cosméticos, como cremes faciais e corporais, pomadas, géis (Anjum *et al.*, 2019) e em bastantes formulações para higiene oral como elixires, pastas dos dentes para prevenção de infecções microbianas e para tratamento da gengivite (Khurshid *et al.*, 2017). É também encontrado comercialmente na forma de comprimidos, pastilhas, xaropes para a tosse, pó, sabão, loções e vitaminas (Anjum *et al.*, 2019). Além das aplicações farmacológicas, este produto natural tem sido largamente utilizado na indústria alimentar, como um conservante natural com propriedades antibacterianas, antifúngicas

e antioxidantes. Pode proteger a qualidade dos alimentos impedindo alterações desfavoráveis nas suas características físicas e químicas (Pobiega *et al.*, 2019).

Relativamente à aplicação do própolis em têxteis, estão em curso alguns estudos, contudo são ainda inexistentes soluções comerciais, e a sua validação técnica e funcional ainda não está muito fundamentada. Os estudos sobre a integração de própolis em têxteis focam sobretudo a atividade antibacteriana e a antioxidante e revelam resultados bastante promissores (Abramiuc *et al.*, 2013; Sharaf *et al.*, 2013; Adomavičiute *et al.*, 2017), no entanto, estas e as restantes propriedades dos têxteis funcionalizados com própolis ainda carecem de maior validação científica e de aumento da durabilidade à lavagem.

1.4.1. Composição química e propriedades biológicas

A composição química e as atividades biológicas do própolis bruto variam com a vegetação existente em redor das colmeias onde a resina é recolhida (Sforcin e Bankova, 2011; Silva-Carvalho *et al.*, 2015), com as características climáticas (Falcão *et al.*, 2010; Silva-Carvalho *et al.*, 2015; Pobiega *et al.*, 2019), com a época e a técnica utilizada para a colheita, com as espécies de abelhas (Pereira *et al.*, 2002) bem como com o método (Sheng *et al.*, 2007) e o solvente da extração (Sforcin e Bankova, 2011). Mesmo assim, de uma forma geral, o própolis *in natura* apresenta uma composição de 50 % de resina, 30 % de cera, 10 % de óleos essenciais, 5 % de pólen e 5 % de outras substâncias, incluindo compostos orgânicos, como fenólicos e ésteres, flavonoides (flavonóis, flavonas, flavononas, di-hidroflavonóis e chalconas), terpenos, β -esteroides, aldeídos e álcoois aromáticos (Silva-Carvalho *et al.*, 2015).

A complexa e diversificada atividade biológica do própolis é uma das razões pelas quais a composição química permanece o foco de muito interesse (Mašek *et al.*, 2018). A análise de amostras de diferentes origens geográficas mostrou uma composição química variável e novos compostos estão a ser constantemente reconhecidos durante a caracterização química de novas amostras (Bankova, 2005; Sforcin e Bankova, 2011). Deste modo, a padronização química será difícil de obter, dada a dependência da composição química de um rol de fatores (Silva-Carvalho *et al.*, 2015), já atrás referidos. De todos os compostos identificados, os mais importantes parecem ser os fenólicos, aos quais se atribuem as múltiplas bioatividades do própolis. Os compostos fenólicos mais comuns em própolis de zonas temperadas são flavonoides como crisina, galangina e pinocembrina e os ácidos fenólicos como ácido cafeico, ácido cinâmico e ácido ferúlico (Ankovaa

et al., 2000; Huang *et al.*, 2014; Silva-Carvalho *et al.*, 2015). Já o própolis de áreas tropicais, por exemplo, principalmente o do sudeste do Brasil, é rico em fenilpropanoides pré-alquilados, e alguns compostos não típicos como kaempferide e isosakuranetin também foram encontrados (Bankova *et al.*, 2000).

Na Europa, os principais compostos bioativos do própolis são os flavonoides (flavonas, flavononas e flavonóis), ácidos fenólicos e os seus esteres (Huang *et al.*, 2014; Silva-Carvalho *et al.*, 2015). Um estudo sobre os compostos fenólicos de própolis português, demonstrou a presença de flavonoides, bem como de novos derivados metilados, incluindo esterificados e hidroxilados de flavonóides, e derivados de pinocembrina/pinobanksina que contêm um radical derivado de ácido fenilpropanóico na sua estrutura (Falcão *et al.*, 2010, 2013). Silva-Carvalho e colaboradores (2014) demonstraram que o própolis do Pereiro (distrito da Guarda, Beira Alta) apresenta uma elevada concentração de compostos fenólicos. Freitas *et al.* (2019) analisaram a composição química de amostras de própolis do Gerês de diferentes anos e, de uma forma geral, verificaram que os compostos fenólicos são coincidentes ao longo dos quatro anos consecutivos. Além disso, os principais compostos fenólicos dos extratos etanólicos de própolis do Gerês correspondem aos descritos anteriormente em outras amostras de própolis portuguesas e europeia (Bankova, 2005; Falcão *et al.*, 2010, 2013; Cruz *et al.*, 2016; Freitas *et al.*, 2019).

Algumas das atividades biológicas estão sempre presentes no própolis, independentemente das diferentes áreas geográficas e/ou climáticas. Os principais compostos responsáveis pelas atividades biológicas são os ácidos aromáticos, os ácidos diterpénicos, os compostos fenólicos e derivados do ácido cinâmico, incluindo ésteres de ácido cafeico, no entanto, muitas vezes diferentes tipos de própolis possuem compostos bioativos distintos (Borrelli *et al.*, 2002).

O elevado interesse neste produto natural deve-se ao seu amplo espectro de propriedades biológicas e farmacológicas, que nos últimos anos foram validadas numa panóplia de estudos. Nestes estavam incluídas as atividades antibacteriana (Falcão *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Roh e Kim, 2018), antioxidante (Sheng *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 2008; Falcão *et al.*, 2010; Cruz *et al.*, 2016; Mašek *et al.*, 2018) antifúngica (Falcão *et al.*, 2010; de Castro *et al.*, 2012; Roh e Kim, 2018), anti-inflamatória (Sforcin, 2007; Sheng *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 2008; Falcão *et al.*, 2010), antineurodegenerativa (Chen *et al.*, 2008; Falcão *et al.*, 2010),

antiprotosoário (Falcão *et al.*, 2013), antitumoral (Sforcin, 2007; Moreira *et al.*, 2008; Silva-Carvalho *et al.*, 2014) ou antiviral (Sheng *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 2008), entre outras.

2. Materiais e Métodos

Neste capítulo serão identificados os reagentes e os solventes utilizados em todos os ensaios e serão descritos os procedimentos usados na preparação do extrato de própolis e da solução de biocoloração e na caracterização das suas bioatividades. Serão igualmente apresentados os procedimentos usados na preparação dos têxteis coloridos e funcionalizados com própolis e na caracterização das suas propriedades finais, como a cor e as atividades antioxidante e antibacteriana.

2.1. Extração de compostos ativos de própolis do Gerês

A amostra de própolis utilizada neste trabalho foi gentilmente fornecida pelo Eng. Amadeu Fortunas, da Casa do Couto, e provém de um apiário que se localiza perto do rio Cávado, nas aldeias de Paradela e Sirvozelo em Montalegre, Gerês (G), Portugal (41°45'41.62'' N; 7°58'03.34'' W). Foi recolhida em 2019 (G19) e foi usada na preparação de um extrato etanólico (EE).

A extração etanólica foi feita de acordo com Freitas *et al.*, 2019, a partir de aproximadamente 15 g de própolis. O própolis foi incubado com 80 mL de etanol absoluto (Carlo Erba Reagents S.A.S) a 25 °C e com uma agitação orbital de 100 rotações por minuto (rpm) (Orbital shaker, Bibby Stuart S01), durante 24 h, no escuro. A suspensão resultante foi filtrada através de papel de filtro de Macherey-Nagel, colocado sobre um funil de Buchner e um sistema de quitasato ligados a uma bomba de vácuo (600 milibar). O filtrado foi reservado e colocado a 4 °C enquanto os resíduos obtidos foram recolhidos e extraídos novamente, com 50 mL de etanol absoluto. O filtrado resultante foi adicionado ao previamente obtido e procedeu-se à evaporação do solvente no Büchi Rotavapor RE 121, a 40 °C e 40 rpm. Obteve-se o extrato etanólico (EE) de própolis - G19.EE - que foi armazenado a 4 °C, no escuro, até à sua utilização.

2.2. Biocoloração e funcionalização têxtil com própolis

2.2.1. Preparação da solução de biocoloração com própolis

Os compostos com potencial de coloração e de funcionalização têxtil foram obtidos através da extração etanólica do própolis G19 (**Figura 11. A**), realizada no departamento de Biologia da Universidade do Minho, como referido no subcapítulo 2.1. Seguidamente, no CeNTI, preparou-se uma solução de 1 % (v/v) de G19.EE em 5 % etanol:95 % água (**Figura 11. B**), que foi armazenada a 4 °C no escuro até posterior utilização.

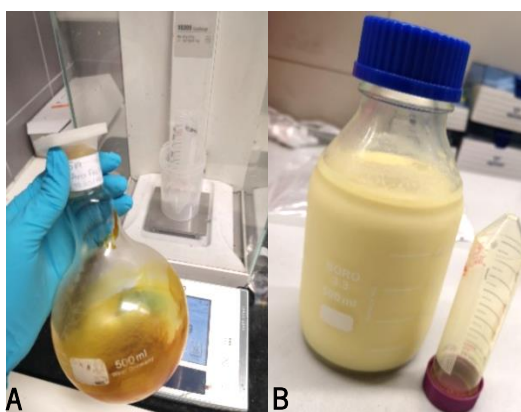


Figura 11. Solução de própolis para biocoloração (**B**) obtida a partir de G19.EE (**A**) em 5% de etanol: 95 % de água.

2.2.2. Pré-tratamento dos substratos têxteis

O substrato têxtil (malha) usado ao longo do presente projeto foi o 100 % algodão (CO), com uma gramagem de $157 \pm 0,2$ g/m². Previamente à etapa de coloração e funcionalização, algumas malhas foram submetidas a diferentes tratamentos, nomeadamente impregnação por esgotamento com alúmen de potássio e ácido tânico, plasma atmosférico e impregnação por foulardagem com quitosano.

A pré-mordentagem com **alúmen de potássio** (AP, fornecido gentilmente pelo CITEVE) e com **ácido tânico** (AT; Alfa Aesar) foi realizada por esgotamento no banho termostático Grant OLS 200 (**Figura 12**). Cada solução aquosa, preparada numa concentração de 10 g/L, foi adicionada ao substrato de algodão, ficando sob agitação constante (100 rpm), a 60 °C durante 60 min. A razão utilizada foi de 1 g de têxtil para 20 mL de solução. Posteriormente, as malhas foram retiradas e secas à temperatura ambiente, durante 24 h.



Figura 12. Equipamento Grant OLS200 utilizado para os banhos de esgotamento realizados ao longo deste projeto.

No pré-tratamento por **plasma atmosférico (P)** recorreu-se ao equipamento plasma de pressão atmosférica (*Sigma Technologies International – Atmospheric Plasma Treatment System*) (**Figura 6**), onde se usou o oxigénio como gás reativo, a 100 % da potência máxima do equipamento e a um caudal de 15000 sccm, e ao árgon como gás de arraste, a 45 % da potência máxima do equipamento e a um caudal de 450 sccm. A amostra de algodão foi tratada, em ambas as faces, com recurso a elétrodos metálicos nas seguintes condições: diâmetro dos rolos – 250 mm; comprimentos dos elétrodos – 4 m; velocidade de passagem – 3,3 Hz.

A modificação da superfície da amostra de algodão por impregnação por foulardagem com **quitosano (Q)** decorreu no equipamento foulard (Mathis), na Unidade de Tinturaria do CITEVE (**Figura 13. A**). A técnica consiste num método de incorporação semi-contínuo em que o têxtil passa por um banho, e posteriormente através do interior de dois rolos controlados por uma determinada pressão e velocidade (Broadbent, 2001) (**Figura 3**). Em primeiro lugar, preparou-se uma solução *stock* de quitosano (Primex) 1 % (p/v) em ácido acético (Sigma - Aldrich) a 1 % (v/v). Para a preparação desta solução, adicionou-se lentamente o quitosano alternando com a adição igualmente lenta do ácido acético, mantendo a mistura sob agitação para evitar a formação de grumos. A malha 100 % algodão foi submersa na solução de quitosano, fazendo impregnação na mesma durante 1 min e, seguidamente, de modo a facilitar a ligação do quitosano à superfície do substrato têxtil, a malha foi colocada no foulard a uma velocidade de 2 m/min e a uma pressão de 3 bar. A amostra foi depois submetida a uma secagem a 100 °C, durante 6 min e a uma termofixação a 140 °C, durante 4 min, na secadeira Werner Mathis AG (**Figura 13. B**).

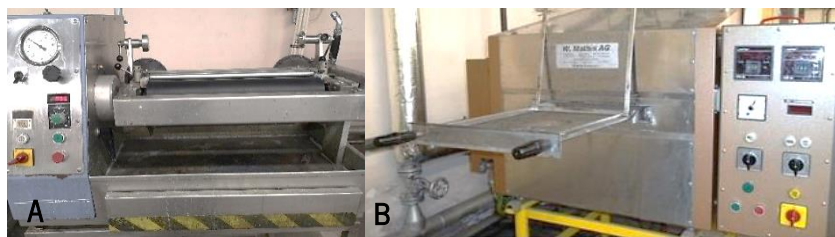


Figura 13. Equipamentos utilizados no tratamento dos substratos têxteis com quitosano por impregnação: Foulard Mathis (A) e secadeira Werner Mathis AG (B).

2.2.3. Coloração e funcionalização dos substratos têxteis com a solução de própolis

A tecnologia usada para a coloração e funcionalização têxtil foi o método de esgotamento num banho termostático Grant OLS200, a 40 °C, durante 90 min e a 100 rpm, tal como demonstrado na **Figura 14. C**. A razão de banho utilizada foi de 1 g têxtil para 20 mL de solução de biocoloração. As malhas selecionadas foram algodão (CO), algodão pré-tratado com alúmen de potássio (CO_ptAP), algodão pré-tratado com ácido tânico (CO_ptAT), algodão pré-tratado por plasma atmosférico (CO_ptP) e algodão pré-tratado com quitosano (CO_ptQ). Em determinados ensaios, foi testada a adição simultânea de auxiliares de coloração/funcionalização ao banho de esgotamento, nomeadamente dois **mordentes**: o alúmen de potássio (CO + AP) e o ácido tânico (CO + AT); e de um agente de ligação - o **glioxal** (Sigma - Aldrich) (Gli) - juntamente com um catalisador - o **sulfato de alumínio** (Acros - Organics) (SA) - como referido por Sharaf e colaboradores (2013) (CO + Gli-SA). Assim, os provetes de algodão, previamente cortados, foram enxaguados com água, e de seguida colocados na solução de biocoloração contendo um dos **mordentes** a uma concentração de 10 g/L (mordentagem em simultâneo) ou contendo o agente de ligação **glioxal** e o catalisador **sulfato de alumínio**. Neste último caso, testou-se o glioxal a 10 g/L e a 15 g/L com o sulfato de alumínio a 10 g/L e a 5 g/L, respetivamente.

Após a etapa de coloração e funcionalização, as amostras foram secas à temperatura ambiente durante 24 h.



Figura 14. Etapas da biocoloração/funcionalização dos provetes de algodão com própolis. **A** - Colocação da solução de biocoloração nos copos de esgotamento. **B** - Adição dos provetes de algodão à solução de biocoloração. **C** - Banho termostático onde decorre a etapa de esgotamento.

Resumidamente, durante este projeto foram testados quatro pré-tratamentos (alúmen potássio, ácido tânico, plasma atmosférico e quitosano) na malha de algodão, dois mordentes (alúmen de potássio e ácido tânico) e um agente de ligação com um catalisador (glioxal e sulfato de alumínio, respetivamente), além do tratamento unicamente com própolis (**Figura 15**).

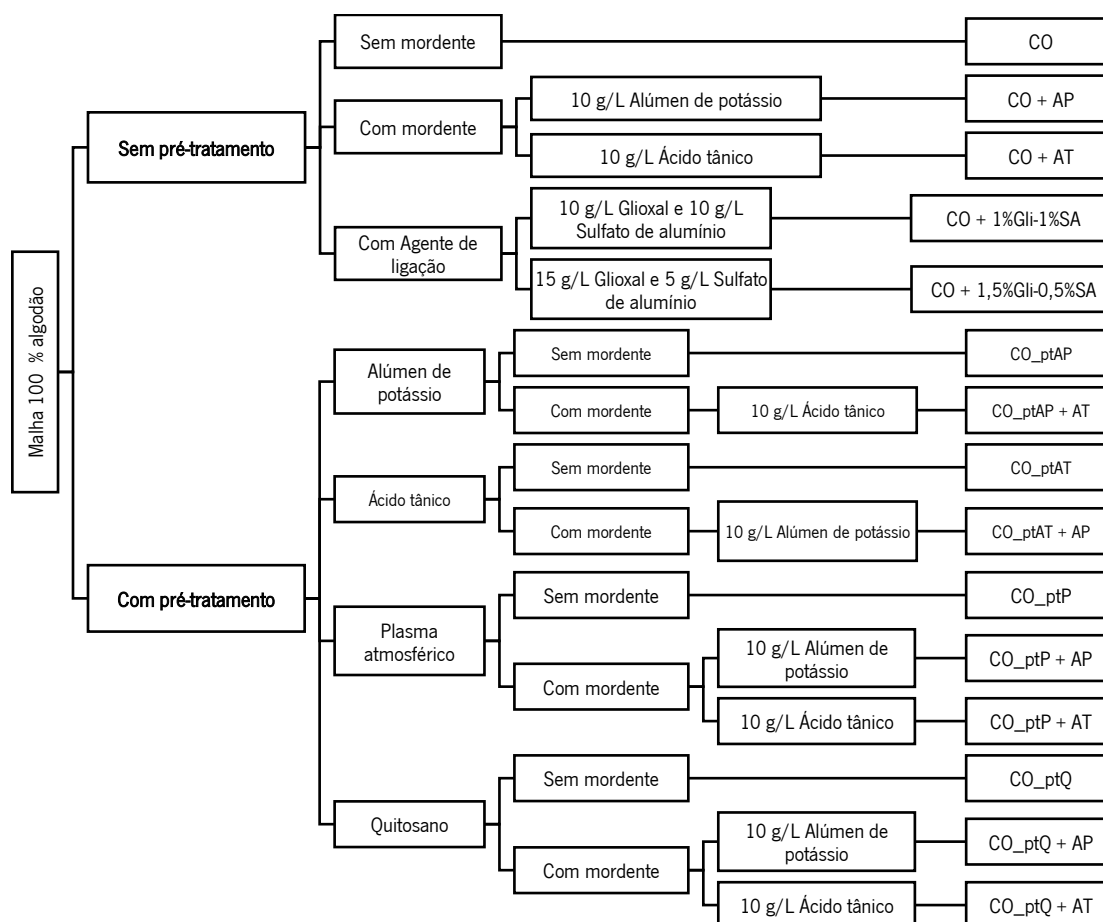


Figura 15. Condições testadas na biocoloração e funcionalização de provetes de malha 100 % algodão com própolis. AP - alúmen de potássio, AT - ácido tânico, Gli - glioxal e SA - sulfato de alumínio. O sinal “+” indica mordentagem simultânea e “_pt” indica pré-tratamento.

2.3. Avaliação das propriedades de cor dos têxteis biocoloridos

De forma a avaliar as cores obtidas e as diferenças de cor foram efetuados estudos de colorimetria nas malhas de algodão. Para esta análise traçaram-se os espectros de refletância na zona do visível entre os 400 e 700 nm com recurso a um espectrofotómetro UV-Vis PerkinElmer Lambda 35, com esfera interna de 60 mm. Durante o ensaio foram consideradas as normas ASTM D 23244 - 05 *Standard Practice for Calculation of Color Tolerances and Color Differences from Instrumentally Measured Color Coordinates* e ASTM E 308 - 01 *Standard Practice for Computing the Colors Of Objects by Using the CIE System*, que consideram um iluminante D65 e um ângulo de observação de 10 °.

Inicialmente, fez-se a *baseline* para 100 % e 0 % de refletância com recurso a um padrão de refletância difusa *labsphere®* branco e opaco. Seguidamente, procedeu-se à medição da refletância de cada um dos têxteis coloridos, realizada no “lado direito” do têxtil. Uma vez obtidas as curvas de refletância, fez-se a conversão da percentagem de refletância (% R) nas coordenadas de cor - L^* a^* b^* - que por sua vez permitiram calcular o valor de força colorística (K/s) seguindo a equação 2.

Numa fase mais avançada, com o intuito de avaliar a solidez da cor às lavagens, foram calculados os valores de ΔE entre o substrato têxtil sem funcionalização e os provetes funcionalizados, após vários ciclos de lavagens. Os valores de ΔE foram calculados (equação 1) tendo em consideração os valores das coordenadas de cor.

2.4. Avaliação das bioatividades

2.4.1. Avaliação da atividade antioxidante

2.4.1.1. Extrato etanólico de própolis

Para a avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante do G19.EE foi utilizado o método de DPPH, método que tem vindo a ser usado no grupo para caracterização desta bioatividade em própolis.

O G19.EE foi dissolvido em etanol absoluto para obter concentrações de 0,5 a 50 µg/mL (0,5; 1; 5; 10; 25 e 50 µg/mL). Em seguida, 50 µL de cada uma destas soluções foram misturados com 100 µL de DPPH • (Sigma) seguindo-se uma incubação de 20 min, à temperatura

ambiente e no escuro. A absorvância da reação foi medida a 517 nm no leitor de microplacas Spectra Max Plus 384 usando-se G19.EE dissolvido em etanol como branco. O controle foi preparado com DPPH• e etanol em substituição do extrato de própolis. A atividade de eliminação de DPPH• por G19.EE foi calculada e comparada com a do ácido gálico (Sigma) (AG), aqui usado como padrão antioxidante. Os resultados foram expressos em percentagem de redução em relação aos valores do controle, de acordo com a seguinte equação (equação 3):

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

em que A_{controle} é a absorvância do controle com DPPH• e etanol absoluto e A_{amostra} é a absorvância do extrato com DPPH•, após 20 min de reação. O IC_{50} (metade da concentração máxima de inibição) definido como a concentração de amostra necessária para obter uma redução de 50 % (Sebaugh, 2011), correspondente neste caso à concentração de G19.EE necessária para eliminar 50 % do DPPH• inicial, nas condições experimentais utilizadas, foi obtido por interpolação na curva padrão de ácido gálico (**Figura A1, Apêndice I**) a partir da análise de regressão linear. A capacidade antioxidante total do G19.EE foi calculada e expressa em equivalentes de ácido gálico por adição da concentração.

2.4.1.2. Solução de biocoloração

A análise da capacidade antioxidante da solução de biocoloração (SB) foi realizada através do método espectrofotométrico do radical ABTS, no CeNTI.

Em primeiro lugar, foi preparada uma solução aquosa 7 mM de ABTS (Sigma - Aldrich) em persulfato de potássio (Sigma - Aldrich) 2,45 mM e armazenada no escuro, à temperatura ambiente, durante 16 h. Sempre que necessário, a solução de trabalho de ABTS foi diluída com tampão fosfato 0,1 M a pH=7,4 e efetuou-se um varrimento de modo a garantir uma absorvância de $0,700 \pm 0,025$ no comprimento de onda máximo entre 700 e 800 nm (**Figura A2, Apêndice II**), medida por um espectrofotômetro UV-Vis (PerkinElmer Lambda 35). Para o ensaio propriamente dito foram adicionados 2,970 mL da solução de trabalho a 30 µL de SB e, após 6 min de contacto à temperatura ambiente, mediu-se a absorvância no comprimento de onda correspondente ao pico entre 700 e 800 nm. Ao longo do ensaio foi utilizada uma concentração de cisteína (Sigma - Aldrich), um composto padrão utilizado na avaliação da atividade antioxidante, de 0,3 g/L como o

objetivo de verificar a coerência do método de ABTS (**Figura A3, Apêndice II**). Por fim, foi calculada a percentagem de inibição do radical ABTS através da seguinte equação (equação 4):

$$\% \text{ Inibição} = \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \quad (\text{Equação 4})$$

na qual A_{controle} é a absorvância da solução de trabalho de ABTS e A_{amostra} a absorvância da solução em estudo (SB).

2.4.1.3. Substratos têxteis biocoloridos e funcionalizados

As amostras de têxteis funcionalizados com própolis foram avaliados no que diz respeito às suas propriedades antioxidantes, utilizando o método de ABTS, tal como descrito anteriormente. Neste caso colocou-se a reagir 0,030 g de têxtil funcionalizado com 3 mL da solução de trabalho e, após 30 min de contacto à temperatura ambiente, mediu-se a absorvância no comprimento de onda correspondente ao pico entre 700 e 800 nm, de acordo com Zemljič *et al.* (2014) com algumas modificações. A percentagem de inibição do radical de ABTS é calculada através da equação 4.

Neste ensaio, o controlo negativo corresponde à malha 100 % algodão não funcionalizado, respetivo de cada condição experimental (**Figura 15**). No caso dos ensaios onde se utilizam um tratamento em simultâneo e um pré-tratamento com alúmen de potássio e ácido tânico, o controlo negativo é representado pela condição onde apenas se adicionou mordente à malha, tratando-se de um pré-tratamento (CO_ptAP e CO_ptAT).

2.4.2. Avaliação da atividade antibacteriana

Para além da atividade antioxidante, outra vertente central do presente trabalho foi o estudo do potencial antibacteriano.

2.4.2.1. Extrato etanólico de própolis

Para avaliar as propriedades antibacterianas de G19.EE, os valores de concentração mínima inibitória (CMI) foram determinados contra sete estirpes de bactérias - uma Gram-negativa e seis Gram-positivas (**Tabela 2**), da coleção de microrganismos do Departamento de Biologia, através de uma adaptação do método de difusão em agar (Sforcin *et al.*, 2000; Freitas *et al.*, 2019). O ensaio foi realizado em meio *Luria Bertani* (LB) - 0,5 % (p/v) de extrato de levedura DB

Bacto™, 1 % (p/v) de triptona Bacto™, 1 % (p/v) NaCl - ao qual foi adicionado 2 % de agar (Liofilchem) (p/v) (meio LBA).

Tabela 2. Estirpes de bactérias utilizadas nos ensaios para avaliação da atividade antibacteriana.

Bactéria	Referência da estirpe
Gram – positiva	
<i>Bacillus megaterium</i>	932
<i>Bacillus subtilis</i>	48886
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 7064
<i>Propionibacterium acnes</i>	H60803(2961351)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538/Methicillin susceptible (MSSA)
<i>Staphylococcus aureus</i>	M746665/Methicillin resistant (MRSA)
Gram – negativa	
<i>Escherichia coli</i>	CECT 423

Para preparar as células para o ensaio, uma cultura microbiana foi cultivada, durante a noite, a 37 °C e a 200 rpm. O crescimento das culturas em meio LB foi monitorizado por leitura da densidade ótica a 600 nm ($D.O_{600}$) no espectrofotômetro da Thermo Scientific Genesys 20. No dia seguinte, a cultura microbiana foi diluída em meio LB fresco para uma $D.O_{600}= 0,1$ e incubada até se obter uma $D.O_{600}$ entre 0,4 e 0,6, correspondente à fase exponencial de crescimento. Seguidamente, gotas de 5 µL de cada amostra foram transferidas para as placas com meio LBA contendo G19.EE em concentrações variando entre 10 e 2000 µg/mL (10, 50, 100, 200, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 e 2000 µg/mL). As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. Os valores de CMI contra cada bactéria foram conseguidos pela observação da presença ou ausência de crescimento, correspondendo à menor concentração para a qual não se observou crescimento.

2.4.2.2. Solução de biocoloração

Para avaliar as propriedades antibacterianas da solução de biocoloração, utilizou-se o painel de bactérias indicado na **Tabela 2** e recorreu-se ao método descrito anteriormente, com ligeiras modificações. A partir de culturas em fase exponencial de crescimento ($D.O_{600}$ entre 0,4 e 0,6), retiraram-se 100 μ L de cada suspensão bacteriana e procedeu-se à sua diluição em série até 10^{-4} . Gotas de 5 μ L de cada cultura nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} foram então transferidas para placas com meio LBA suplementadas com 0,1 % e 0,2 % de SB, concentrações que tentaram mimetizar as encontradas no banho por esgotamento e calculadas com base na razão de têxtil: solução (1:20). O ensaio foi igualmente realizado na ausência de própolis e na presença de etanol, em volume idêntico ao da maior concentração de solução de biocoloração usado. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h e observadas para a presença ou ausência de crescimento. Para além da avaliação das propriedades antibacterianas da SB, este ensaio permitiu ainda selecionar a bactéria a usar posteriormente como microrganismo indicador de suscetibilidade no ensaio para avaliação das propriedades antibacterianas dos têxteis coloridos e funcionais.

2.4.2.3. Substratos têxteis biocoloridos e funcionalizados

A atividade antibacteriana dos têxteis coloridos e funcionalizados foi avaliada por observação do crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em meio LB, quando em contacto com os substratos têxteis, de acordo com Nobre (2018). Previamente ao ensaio, as amostras foram cortadas e pesadas para 0,1 g de cada substrato têxtil, e esterilizadas por radiação UV, numa câmara de fluxo laminar vertical Faster Bio 48, durante 10 min de cada lado.

Para cada ensaio realizado, preparou-se um pré-inóculo da *Staphylococcus aureus*, inoculando em meio LB parte de uma colónia da cultura em meio sólido. De seguida, esta cultura líquida foi colocada a 37 °C e 200 rpm na Infors HT Multitron Standard, durante a noite, e a $D.O_{600}$ foi corrigida para 0,05 através de uma diluição com meio de crescimento fresco. A amostra de 0,1 g de cada têxtil foi então adicionada a 10 mL de meio LB contendo *Staphylococcus aureus* a uma $D.O_{600}$ de 0,05, sendo esta incubada a 37 °C e 200 rpm. Posteriormente, a $D.O_{600}$ foi medida, retirando-se alíquotas de 1 mL após 2 h de incubação e a cada intervalo de 30 min. Aquando da última leitura, foi retirada uma alíquota de 100 μ L e foram realizadas diluições seriadas (de cada uma das culturas, nas diferentes condições). A partir das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram retirados 10 μ L e inoculados em meio LBA. Após incubação durante a noite a 37 °C, as colónias foram

contadas e os resultados expressos em unidades formadoras de colónias (UFC/mL). A atividade antimicrobiana é expressa em termos de percentagem de redução bacteriana, calculada como a razão entre o número de bactérias sobreviventes antes e após o contacto com os têxteis revestidos, segundo a equação 5 (Suneeta *et al.*, 2020):

$$\text{Atividade antibacteriana (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

onde A representa as colónias observadas no algodão não tratado e B as contabilizadas em amostras de algodão tratado com própolis.

No presente ensaio, o controlo positivo da atividade antibacteriana corresponde à ampicilina a 200 µg/mL e o controlo negativo corresponde ao têxtil não colorido/funcionalizado correspondente a cada tipo de tratamento efetuado (ver **Figura 15**). Também foi incluído um controlo do crescimento bacteriano, em meio LB apenas, de forma a avaliar possíveis efeitos da presença das diferentes amostras têxteis.

2.5. Avaliação da solidez à lavagem

Os têxteis biocoloridos e funcionalizados que revelaram melhores propriedades foram avaliados no que diz respeito à sua solidez à lavagem. Para o efeito, as malhas 100% algodão tingidas e seleccionadas para esta avaliação, bem como os seus respetivos controlos (CO, CO_ptAP e CO + 1%Gli-1%SA) foram submetidos a vários ciclos de lavagem numa máquina de lavar doméstica Indesit IWDC 6105. Cada ciclo foi realizado a 30 °C durante aproximadamente 60 min e com uma dose de detergente Soflan, indicado para lavagens suaves e menos abrasivas. No final, as amostras foram secas à temperatura ambiente, avaliadas para as propriedades pretendidas e comparadas com as amostras não submetidas às lavagens.

3. Resultados e Discussão

A presente secção diz respeito à obtenção de um extrato de própolis (G19.EE) e à preparação da solução de biocoloração (SB) bem como à análise das suas propriedades biológicas (antioxidante e antibacteriana), antes e após a sua aplicação num substrato têxtil de algodão. Também serão apresentados os resultados referentes à avaliação da solidez da cor e das propriedades dos têxteis coloridos/funcionalizados após lavagem com detergente.

3.1. Preparação e caracterização do extrato etanólico de própolis

O própolis bruto do Gerês recolhido em 2019 (G19) foi extraído com etanol absoluto, obtendo-se o extrato etanólico desta amostra de própolis - G19.EE - com um rendimento de extração de 83,53 %.

Segundo a literatura, os compostos bioativos presentes no própolis podem ser extraídos com diferentes solventes, tais como a acetona, água, etanol, metanol e misturas de etanol-água (variando a percentagem de etanol na mistura entre 70, 80, 90 e 96 % (v/v)) (Park *et al.*, 1998; Mello *et al.*, 2010; Moura *et al.*, 2011; Kubiliene *et al.*, 2015; Bankova *et al.*, 2016; Abdullah *et al.*, 2019). O etanol é considerado o solvente mais adequado para a obtenção de extratos de própolis com baixo teor de cera e ricos em compostos biologicamente ativos, apesar da utilização deste solvente poder apresentar limitações na indústria cosmética e farmacêutica, por estar muitas vezes associado a reações alérgicas (Mello *et al.*, 2010; Kubiliene *et al.*, 2015). Um solvente alternativo poderá ser água, porém o rendimento de extração aquosa é normalmente inferior ao registado em extração etanólica (Mello *et al.*, 2010; Kubiliene *et al.*, 2015). Com efeito, num estudo em que se usaram diferentes solventes para a extração de amostras de própolis do Gerês recolhido em 2018 (Freitas A., comunicação pessoal), verificou-se que o rendimento de extração etanólica era cerca de 10 vezes superior ao da extração aquosa.

Comparando com extratos etanólicos de amostras de própolis provenientes da mesma localidade, mas recolhidas em anos anteriores (**Tabela 3**), G19.EE aparenta ser um extrato promissor, pois apresenta um dos maiores rendimentos de extração e, provavelmente, apresentará mais compostos biologicamente ativos extraíveis por etanol, tais como flavonoides, ácidos fenólicos e seus ésteres.

Tabela 3. Rendimentos de extração etanólica, em percentagem, dos extratos etanólicos de amostras de própolis do Gerês (G.EEs) recolhidas entre 2011 e 2019. *G17.EE não foi considerado nesta análise pelo facto de se tratar de uma amostra diferente, conforme referido.

Extratos etanólicos de Própolis	Rendimento de extração (%)	Referência
G11.EE	67,7	(Freitas, 2015)
G12.EE	88,0	
G13.EE	75,5	
G14.EE	76,42	
G15.EE	66,17	(Gonçalves, 2017)
G16.EE	76,45	Freitas A., comunicação pessoal
G17.EE	*	
G18.EE	61,63	
G19.EE	83,53	Este trabalho

O própolis que designamos Gerês resulta de uma mistura de própolis provenientes de três apiários distintos - Toutelo, Felgueiras e Bogalho. Em 2017, um incêndio destruiu as colmeias do apiário Bogalho, pelo que o própolis G17 não foi incluído para comparação no presente trabalho. Após a extinção das colmeias do Bogalho, as amostras G18 e G19 passaram a ser constituídas por uma nova mistura, agora originária dos apiários de Toutelo, Felgueiras e Roca (este localizado numa zona de vegetação idêntica à do apiário Bogalho).

3.1.1. Potencial antioxidante de G19.EE

Entre as diversas ações dos antioxidantes, um dos mecanismos consiste na eliminação de radicais livres, processo avaliado frequentemente nos estudos da atividade antioxidante através de técnicas simples e rápidas que averiguam a atividade de eliminação de radicais de compostos específicos *in vitro*. Dos diversos métodos disponíveis, o de DPPH é dos mais utilizados para avaliar esta atividade (Gulcin, 2020) e tem sido usado para estimar o potencial antioxidante dos vários G.EEs e outros EE de própolis que o grupo tem vindo a estudar (Moreira *et al.*, 2008; Gonçalves,

2017; Freitas *et al.*, 2019; Gomes, 2019). Nesta metodologia, os resultados são expressos pela diminuição percentual da absorvância da solução do radical na presença do composto (neste caso o extrato), em função das concentrações testadas, e pelo valor de IC₅₀. Quanto maior a redução de radical pelo extrato de própolis, para uma dada concentração, menor será o IC₅₀ e, portanto, maior será a atividade antioxidante do extrato (Moreira *et al.*, 2008).

O potencial antioxidante de G19.EE, estimado utilizando ácido gálico como padrão, revela um valor de IC₅₀ igual a 24,29±0,07 µg/mL. Comparando com amostras de própolis oriundas da mesma proveniência, mas colhidas em anos anteriores, constata-se alguma variabilidade nesta bioatividade (**Figura 16**). A capacidade antioxidante de G19.EE é idêntica à de G13.EE (IC₅₀=25,24±2,45 µg/mL), por sua vez semelhante ao potencial antioxidante de amostras de própolis irlandesas e checas (IC₅₀=26,45 ± 3,8 µg/mL e 27,72 ± 5,2 µg/mL, respectivamente) (AL-Ani *et al.*, 2018). Em relação a outros G.EEs, G19.EE apresenta diferenças significativas, sendo a sua capacidade antioxidante inferior, apesar de se ter obtido um dos maiores rendimentos na sua extração. Esta diferença poderá estar relacionada com diferentes quantidades de alguns compostos associados às propriedades antioxidante do própolis, como apigenina, kaempferol, galangina, éster isoprenílico do ácido cafeico (isómero) (Chen *et al.*, 2009; Boisard *et al.*, 2014). De acordo com Freitas e colaboradores (2019), a abundância dos compostos principais diferencia todos os G.EEs, isto é, os G.EEs são caracterizados pela prevalência dos mesmos compostos, mas alguns mais abundantes como crisina, éster isoprenílico do ácido cafeico e pinocembrina e outros menores, como pinobanksina e derivados de ácidos fenólicos. Assim, G19.EE poderá apresentar mais compostos responsáveis por outras atividades, por exemplo atividade antimicrobiana (pinocembrina, ácido ferúlico e galangina), do que pela atividade antioxidante, mas seria necessário fazer a sua análise química para se fazer uma análise mais detalhada.

Sabe-se que própolis pode exibir grande diversidade em termos de potencial antioxidante, se proveniente de origens diferentes. Esta diversidade foi já observada a nível nacional, com Moreira *et al.* (2008) a reportarem que própolis de Bornes e do Fundão apresentam elevada atividade antioxidante, com valores de IC₅₀ de aproximadamente 6 µg/mL e de 52 µg/mL, respetivamente. A diversidade é mesmo observada em própolis recolhido num mesmo apiário, mas em diferentes estações do ano, como constatado por Miguel *et al.* (2010) em própolis do Algarve.

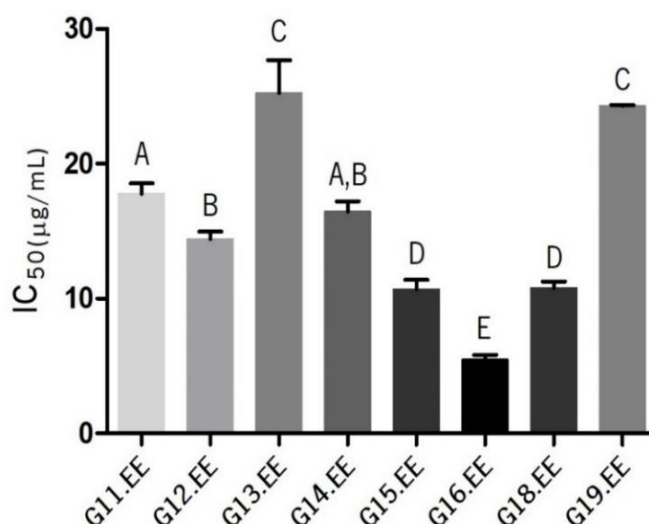


Figura 16. Capacidade de captura do radical livre DPPH•, apresentada em valores de IC₅₀ (µg/mL), dos extratos etanólicos de amostras de própolis do Gerês (G.EEs) recolhidas entre 2011 e 2019. G17.EE não foi considerado nesta análise pelo facto de se tratar de uma amostra diferente, conforme atrás referido. Realizou-se o teste *One-way* ANOVA (letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste *Tukey* ($p \leq 0,05$)).

O G19.EE, em comparação com os estudos apresentados, apresenta uma forte atividade de eliminação de radicais livres de DPPH, tornando-se muito atrativo para futuras aplicações.

3.1.2. Atividade antibacteriana de G19.EE

Na avaliação da atividade antibacteriana de G19.EE, através do método de difusão em agar, determinou-se a menor concentração de extrato para a qual não se observou crescimento de cada uma das bactérias testadas (**Tabela 4**).

As bactérias Gram-positivas revelam maior suscetibilidade ao extrato do que a única bactéria Gram-negativa testada, sugerindo que as bactérias Gram-positivas são também mais suscetíveis a G19.EE, conforme genericamente descrito na literatura para a resposta deste tipo de bactérias a diferentes amostras de própolis (Bankova *et al.*, 2000; Sforcin *et al.*, 2000; Uzel *et al.*, 2005; Ramos e Miranda, 2007; El-Guendouz *et al.*, 2018; Oryan *et al.*, 2018; Freitas *et al.*, 2019). A razão que tem sido apontada prende-se com o facto de as bactérias Gram-negativas possuírem uma parede celular mais complexa e terem um teor em lípidos maior que as Gram-positivas, nomeadamente a presença de uma membrana externa, que inibe ou retarda a penetração do própolis (Cushnie e Lamb, 2005a; Silva *et al.*, 2012).

Tabela 4. Atividade antibacteriana do extrato etanólico preparado com a amostra de própolis do Gerês recolhida em 2019 (G19.EE). A atividade antibacteriana foi expressa em valores de concentração mínima inibitória (CMI) ($\mu\text{g/mL}$).

Bactéria	CMI ($\mu\text{g/mL}$) de G19.EE
Gram-positiva	
<i>Bacillus megaterium</i>	100
<i>Bacillus subtilis</i>	100
<i>Bacillus cereus</i>	100
<i>Propionibacterium acnes</i>	500
<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA)	500
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	>2000
Gram-negativa	
<i>Escherichia coli</i>	>2000

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, do inglês Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; MSSA - *Staphylococcus aureus* suscetível à meticilina, do inglês Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus*

G19.EE exibe maior efeito antibacteriano contra as bactérias do género *Bacillus* (CMI = 100 $\mu\text{g/mL}$) seguidas de *Propionibacterium acnes* e de *Staphylococcus aureus* (MSSA) com valores semelhantes (CMI = 500 $\mu\text{g/mL}$). Em relação à estirpe de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, MRSA, não é detetada atividade na gama de concentrações de extrato testadas, tal como observado relativamente a *Escherichia coli*. Estes resultados são semelhantes a resultados obtidos em anos anteriores para própolis do Gerês (Tabela A2, Anexo I), verificando-se uma constância nesta bioatividade ao longo dos anos, um comportamento invulgar em amostras de própolis já reportado por Freitas *et al.* (2019). Este facto poderá ser de particular relevância, por exemplo para a indústria farmacêutica, para garantir homogeneidade e qualidade no produto final. A maior atividade antibacteriana de G19.EE e dos restantes G.EEs contra *Bacillus* sp. sugere ainda que as bactérias formadoras de esporos, como *Bacillus cereus*, de particular importância na indústria alimentar por estar associada a intoxicações alimentares, são mais sensíveis ao própolis, em comparação com as bactérias não esporulantes (Ramanauskiene *et al.*, 2009), o que poderá

sugerir um espectro de atividade específica de G.EEs contra bactérias Gram-positivas formadoras de esporos (Freitas *et al.*, 2019).

Propionibacterium acnes também se mostra suscetível ao extrato testado, embora sendo necessária uma maior concentração para inibir o seu crescimento, em comparação com as bactérias do género *Bacillus*. Tal como já sugerido por outros autores (Boyanova *et al.*, 2006), própolis tem potencial para ser utilizado no tratamento de problemas associados a esta estirpe, nomeadamente no tratamento da acne.

Em relação ao género *Staphylococcus*, MSSA demonstra uma suscetibilidade semelhante a *Propionibacterium acnes*, mas o extrato não revela atividade, nas concentrações testadas, contra MRSA. Como já referido, resultados semelhantes foram obtidos com própolis do Gerês recolhido entre 2011 e 2016 (**Tabela A2, Anexo I**); no entanto, seria aconselhável aumentar a gama de concentrações testadas, atendendo que Dias *et al.* (2012) demonstraram a eficácia de amostras de própolis da região dos Trás-os-Montes contra MRSA. Resultados idênticos foram obtidos por AL-Ani *et al.* (2018) com EE de própolis de várias origens geográficas, nomeadamente da Alemanha, Irlanda e República Checa.

Não se detetou atividade contra a bactéria Gram-negativa na gama de concentrações testada, uma vez mais à semelhança do ocorrido com própolis do Gerês de anos anteriores (Freitas *et al.*, 2019). Esta ausência de suscetibilidade foi também observada face a EE de própolis de várias regiões do país Basco (norte de Espanha) (Bonvehí e Gutiérrez, 2012); porém, outras amostras de própolis mostraram-se ativas contra esta bactéria (Rahman *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012; AL-Ani *et al.*, 2018).

Esta variabilidade entre amostras de própolis de diferentes origens e mesmo em amostras de origem semelhante, quer nesta atividade como noutras bioatividades, parece ser uma constante neste produto natural. A diferença observada entre a atividade antibacteriana pode dever-se a vários fatores, tais como a complexa e variável composição química do própolis, as diferentes técnicas que são frequentemente aplicadas para determinar os valores de CMI, sendo também testadas diferentes gamas de concentração, bem como estirpes, dificultando assim a comparação dos resultados com outros trabalhos.

Embora desconhecido ainda o mecanismo de ação do própolis do Gerês, a atividade antibacteriana deste produto natural parece poder ocorrer por diversos mecanismos de ação,

como a inibição da divisão celular, dissociação da membrana citoplasmática e da parede celular, inibição da síntese proteica e RNA polimerase ou através da inibição enzimática (Cushnie e Lamb, 2005b). Baixas concentrações de própolis podem interferir com enzimas de produção de energia, e concentrações mais elevadas podem desnaturar as proteínas (Tiwari *et al.*, 2009).

3.2. Caracterização da solução de biocoloração

3.2.1. Potencial antioxidante da solução de biocoloração

A avaliação da capacidade antioxidante da solução de biocoloração (SB) - própolis a 1 % (p/v) em 5 % etanol:95 % água (**Figura 11. B**) - foi realizada recorrendo ao método de ABTS que tem por base a redução de um radical livre, quando em contacto com uma amostra com poder antioxidante, provocando a descoloração da solução de radical, detetada por espectrofotometria. Como previsto, a L-cisteína (controlo positivo), testada numa concentração de 0,3 g/L, exibiu uma redução de $47,47 \pm 13,51$ % do radical livre, em linha com os resultados da curva de calibração efetuada (**Figura A3, Apêndice II**). A SB apresenta uma atividade antioxidante de, aproximadamente, 90 % (**Figura 17**), demonstrando que a atividade do própolis G19.EE se manteve e passou para a solução. Esta atividade pode estar intimamente associadas aos compostos flavonóides, apesar de se desconhecer a composição do extrato G19.EE, mas segundo Freitas *et al.* (2019), em G.EEs de anos anteriores encontra-se apigenina, kaempferol, galangina, éster isoprenílico do ácido cafeico (isómero) que podem estar associados a esta atividade. Tendo em consideração os resultados obtidos, decidiu-se prosseguir as etapas de coloração/funcionalização têxtil.

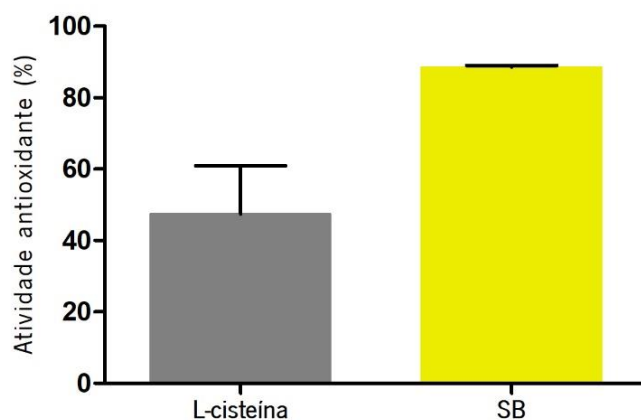


Figura 17. Atividade antioxidante da solução de biocoloração (SB) pelo método ABTS. L-cisteína (0,3 g/L) representa o controlo positivo. Os resultados são exibidos como a média das três réplicas efetuadas e respetivo desvio padrão.

3.2.2. Atividade antibacteriana da solução de biocoloração

Para além da atividade antioxidante, pretendeu-se avaliar também, no presente trabalho, o potencial da SB conferir atividade antibacteriana aos têxteis de algodão. Neste sentido, estudou-se a capacidade da SB inibir o crescimento de seis bactérias Gram-positivas e de uma bactéria Gram-negativa (**Tabela 2**). Neste ensaio foi usado o método de difusão em agar, observando-se a presença ou ausência de crescimento de cada uma das bactérias testadas na presença de SB (**Figura 18**).

Pela observação dos resultados, verifica-se que os controlos estão de acordo com o previsto, já que não se observa inibição do crescimento bacteriano para nenhuma diluição quer em meio de cultura apenas (**Figura 18. A e B, a**) quer na presença de etanol (**Figura 18. A e B, b**).

As bactérias do género *Bacillus* não cresceram na presença de SB (**Figura 18. A e B, c e d**). *Staphylococcus aureus* demonstrou uma suscetibilidade semelhante às bactérias do género *Bacillus*. Contrariamente, a solução não se revela eficaz, nas concentrações testadas, contra MRSA, a estirpe de *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina, embora se observe alguma inibição de crescimento (**Figura 18. B, d**). Um comportamento idêntico é exibido por *Propionibacterium acnes*. Eventualmente será possível inibir o crescimento desta bactéria na presença de concentrações superiores, uma vez que na diluição 10^{-4} não existe crescimento (**Figura 18. B, d**).

Relativamente a *Escherichia coli*, as concentrações testadas não demonstraram atividade antibacteriana, sendo possível observar crescimento nas placas, um resultado que corrobora o que se obteve para G19.EE (subcapítulo 3.1.2) e que ilustra o que amplamente se refere sobre a menor suscetibilidade destas bactérias Gram-negativas a própolis (Bankova *et al.*, 2000; Sforcin *et al.*, 2000; Uzel *et al.*, 2005; Ramos e Miranda, 2007; El-Guendouz *et al.*, 2018).

Para além de permitir analisar a atividade antibacteriana da SB, esta experiência permitiu ainda selecionar a bactéria a usar nos ensaios antibacterianos com os têxteis funcionalizados com própolis. Nestes testes, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* são as bactérias referenciadas nos procedimentos normativos como indicadores de suscetibilidade (Ristić *et al.*, 2011), por serem as mais comuns em infeções hospitalares e também as que mais degradam os materiais têxteis (Lee *et al.*, 2009; Ibrahim *et al.*, 2010). Face ao exposto e aos resultados ilustrados na **Figura 18**, foi selecionada para tais ensaios *Staphylococcus aureus*, ou MSSA, por ser mais suscetível.

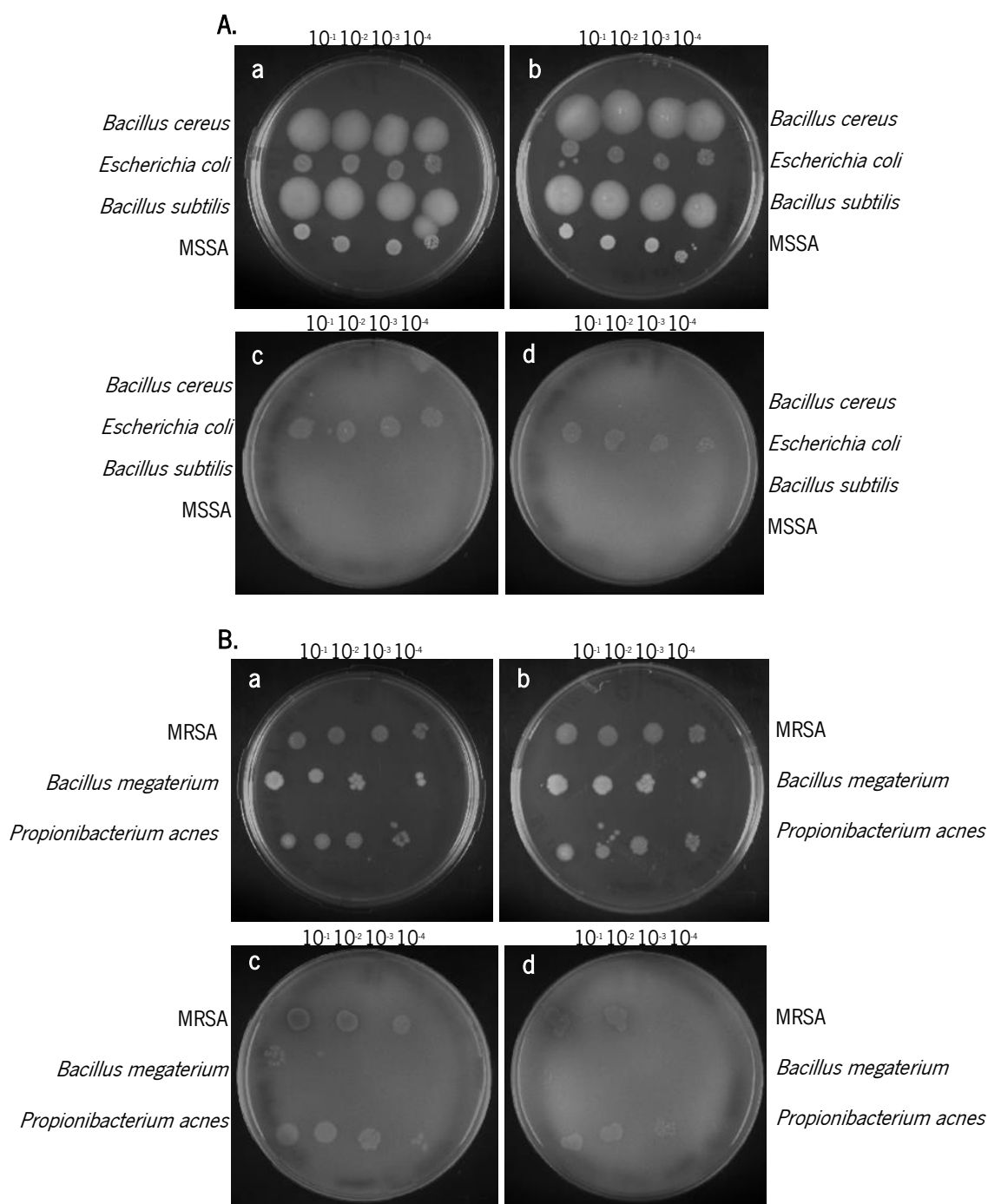


Figura 18. Avaliação da atividade antibacteriana da solução de biocoloração (SB) contra as bactérias *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) (A) e Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Bacillus megaterium*, *Propionibacterium acnes* (B). O controle foi uma placa de meio LB sem SB. As bactérias foram cultivadas em LB a 37 °C, 200 rpm, até ser obtida uma D.O.₆₀₀ entre 0,4 e 0,6. Posteriormente, as culturas foram diluídas de forma seriada até à diluição 10⁻⁴ e 5 µL de cada diluição foram pipetados para meio sólido, em placas contendo diferentes concentrações de SB. **a** - meio LBA, **b** – LBA e etanol, **c** - meio LBA contendo SB a 0,1 % e **d** - meio LBA com SB a uma concentração 0,2 %.

Com a confirmação de ambas as atividades na solução de biocoloração concluiu-se que, usando o solvente água/etanol, as atividades de G19.EE se mantêm na SB. Assim, poderemos sugerir que a água será um bom veículo para obtenção de uma solução mais económica a nível industrial.

3.3. Caracterização dos têxteis biocoloridos e funcionais

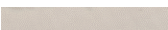
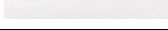
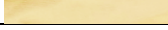
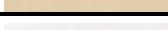
Após caracterização de G19.EE e da SB, procedeu-se à coloração e funcionalização dos têxteis com o objetivo de verificar a capacidade da solução em estudo prover cor, bem como atividade antioxidante e/ou atividade antibacteriana aos mesmos. Pela importância já referida no setor, os têxteis utilizados foram malhas de algodão.

Com o intuito de melhorar a ancoragem da SB aos têxteis, vários processos de modificação de superfície têxtil e/ou de mordentagem foram testados, mencionados nos subcapítulos 2.2.2 e 2.2.3. Assim, para este rastreio inicial, foram produzidas várias amostras de têxteis biocoloridos, nomeadamente algodão tingido com solução de biocoloração (CO + SB), algodão tingido simultaneamente com alúmen de potássio e solução de biocoloração (CO + AP + SB), algodão tingido simultaneamente com ácido tânico e solução de biocoloração (CO + AT + SB), algodão tingido simultaneamente com 1 % glioxal, 1 % sulfato de alumínio e solução de biocoloração (CO + 1%Gli-1%SA + SB), algodão tingido simultaneamente com 1,5 % glioxal, 0,5 % sulfato de alumínio e solução de biocoloração (CO + 1,5%Gli-0,5%SA + SB), algodão pré-tratado com alúmen de potássio e tingido com solução de biocoloração (CO_ptAP + SB), algodão pré-tratado com alúmen de potássio e tingido simultaneamente com ácido tânico e solução de biocoloração (CO_ptAP + AT + SB), algodão pré-tratado com ácido tânico e tingido com solução de biocoloração (CO_ptAT + SB), algodão pré-tratado com ácido tânico e tingido simultaneamente com alúmen de potássio e solução de biocoloração (CO_ptAT + AP + SB), algodão pré-tratado com plasma e tingido com solução de biocoloração (CO_ptP + SB), algodão pré-tratado com plasma e tingido simultaneamente com alúmen de potássio e solução de biocoloração (CO_ptP + AP + SB), algodão pré-tratado com plasma e tingido simultaneamente com ácido tânico e solução de biocoloração (CO_ptP + AT + SB), algodão pré-tratado com quitosano e tingido com solução de biocoloração (CO_ptQ + SB), algodão pré-tratado com quitosano e tingido simultaneamente com alúmen de potássio e solução de biocoloração (CO_ptQ + AP + SB) e algodão pré-tratado com quitosano e tingido simultaneamente com ácido tânico e solução de biocoloração (CO_ptQ + AT + SB) (ver Figura 15).

3.3.1. Análise de cor

Para analisar de forma mais objetiva a cor dos substratos tingidos e funcionalizados com SB, foi realizado um ensaio de leitura da refletância de todas as amostras do rastreio inicial (**Figura 15**), recorrendo-se a um espectrofotômetro UV-Vis. Através dos resultados obtidos e, tendo em consideração as normas ASTM D 2244-05 e E 308-01, foram calculadas as coordenadas de cor $L^*a^*b^*$, assim como o valor correspondente da força colorística de cada um dos têxteis. Na **Tabela 5**, apresentam-se os resultados obtidos para a variável K/s, bem como fotografias de cada uma das amostras, ilustrando a sua cor.

Tabela 5. Valores obtidos para a força colorística (K/s) e fotografias dos têxteis tingidos com a solução de biocoloração (SB). Os resultados são apresentados como a média de três réplicas para cada condição e respetivo desvio padrão.

Amostra	Força colorística (K/s)	Cor obtida
CO	0,024±0,001	
CO + SB	2,622±0,063	
CO + AP + SB	3,107±0,318	
CO + AT + SB	3,022±0,138	
CO + 1%Gli-1%SA + SB	6,001±1,508	
CO + 1,5%Gli-0,5%SA + SB	4,814±0,323	
CO_ptAP	0,030±0,001	
CO_ptAP + SB	3,736±0,076	
CO_ptAP + AT + SB	6,147±1,428	
CO_ptAT	0,116±0,002	
CO_ptAT + SB	2,789±0,149	
CO_ptAT + AP + SB	2,847±0,127	
CO_ptP	0,030±0,001	
CO_ptP + SB	2,683±0,350	
CO_ptP + AP + SB	2,766±0,349	
CO_ptP + AT + SB	2,403±0,136	
CO_ptQ	0,039±0,002	
CO_ptQ + SB	5,227±0,377	
CO_ptQ + AP + SB	2,624±0,044	
CO_ptQ + AT + SB	5,608±0,169	

De uma forma geral, e por análise visual dos têxteis bicoloridos com própolis obtidos (**Tabela 5**), verifica-se que quase todas as amostras apresentaram uma cor amarelada e com algum manchamento, em que algumas partes tinham uma cor amarelada-castanhada, devido à presença de um precipitado nas soluções respetivas. Em ensaios futuros, seria importante ultrapassar este problema, através da otimização da preparação da solução ou com a realização de uma lavagem de processo após a etapa de tingimento.

Constata-se igualmente que os têxteis que foram sujeitos a tratamentos em simultâneo, ou a dois tratamentos (amostras de algodão submetidas ao tratamento com plasma ou quitosano e a um processo de mordentagem simultânea com solução de biocoloração e alúmen de potássio ou com ácido tânico), adquiriram uma cor amarela com uma tonalidade mais intensa que a amostra CO + SB, com exceção das amostras CO_ptQ + AP + SB (algodão pré-tratado com quitosano e com alúmen de potássio no banho) e CO_ptP + AT + SB (algodão pré-tratado com plasma e com ácido tânico no banho), que apresentam tonalidade idêntica ou inferior/mais clara, respetivamente, à do provete biocolorido sem qualquer tratamento (CO + SB).

Os dados referentes a K/s, apresentados na **Tabela 5**, vêm comprovar as observações anteriores. Como é possível verificar, nos provetes que foram sujeitos a tratamentos adicionais (mordentagem e/ou modificação prévia da superfície têxtil) ao tingimento com própolis, os valores de K/s são superiores ao do provete CO + SB. Além disso, verifica-se que existem valores relativamente altos, tais como os de CO + 1%Gli-1%SA + SB e CO + 1,5%Gli-0,5%SA + SB. Este facto pode dever-se à adição (simultânea) do glicol à solução de biocoloração, uma vez que se verificou a presença de um precipitado nesta solução, tal como referido acima, demonstrando uma heterogeneidade na cor obtida e originando valores de K/s muito superiores ao do têxtil tingido unicamente com a solução de biocoloração (CO + SB).

Relativamente à utilização de mordentes, os valores de K/s indicam que o alúmen de potássio e o ácido tânico, CO + AP + SB e CO + AT + SB respetivamente, influenciam a obtenção de têxteis com tonalidade mais forte, existindo valores de K/s ligeiramente superiores aos da amostra só com solução (CO + SB). Note-se que, mesmo sem a utilização de qualquer processo de mordentagem, os têxteis demonstram boas tonalidades. Contudo, é de salientar que mordentes são geralmente utilizados com o intuito de conceder uma maior ancoragem da cor quando sujeita a fatores inerentes ao ciclo de vida de um produto têxtil, entre os quais a lavagem, luz solar e secagem na máquina. Na comparação entre os diferentes processos de mordentagem utilizados

(prévia ou simultânea), não parece existir uma diferença considerável entre os dois, ou seja, os valores da força colorística da amostra CO_ptAP + SB (pré-mordentagem) são idênticos aos da amostra CO + AP + SB (mordentagem em simultâneo), o mesmo se verificando para o mordente ácido tânico (CO_ptAT + SB e CO + AT + SB). Logo, à escala industrial poderia ser mais benéfico recorrer à mordentagem em simultâneo, tendo em conta a duração e os custos dos dois processos. De ressaltar que, apesar do alúmen de potássio ser considerado um mordente seguro, a consciencialização ambiental leva à necessidade de procurar métodos alternativos à utilização de metais, que produzam o mínimo de efluentes. Assim, o mordente natural ácido tânico apresenta-se como uma oportunidade mais sustentável para facilitar a ligação entre o têxtil e a SB. Contudo, como se poderá constatar mais à frente (subcapítulos 3.3.2 e 3.3.3), este mordente não se mostrou tão promissor na análise da atividade antioxidante e/ou antibacteriana dos têxteis.

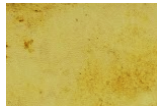
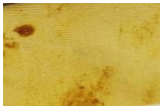
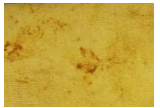
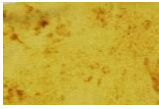
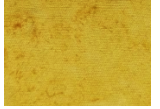
Com o objetivo de observar o efeito entre dois tipos de tratamento, as amostras de algodão foram submetidas ao tratamento com o equipamento de plasma atmosférico e a um processo de mordentagem simultânea com alúmen de potássio (CO_ptP + AP + SB) ou com ácido tânico (CO_ptP + AT + SB). Os resultados (**Tabela 5**) não demonstram diferenças nos valores da força colorística destes dois têxteis com o têxtil unicamente tingido com a solução de biocoloração (CO + SB). Tal como mencionado anteriormente, a utilização da SB apenas é vantajosa a nível industrial, além de que o uso desta tecnologia de plasma atmosférico pressupõe a utilização de condições ideais, como por exemplo o gás reativo mais adequado. Paralelamente, foi também testado o efeito do pré-tratamento com quitosano seguido de mordentagem em simultâneo com cada um dos dois mordentes em estudo. Os têxteis impregnados com a solução de biocoloração e alúmen de potássio (CO_ptQ + AP + SB) apresentaram valores de K/s iguais ao de CO + SB. Porém, os têxteis bicoloridos com a solução e ácido tânico (CO_ptQ + AT + SB) exibem valores de K/s muito superiores ao de CO + SB e idêntico ao CO_ptQ + SB. Uma possível justificação para estes valores elevados, poderá ser a falta de uniformidade na cor obtida, o que demonstra ser um problema para a aplicação à escala industrial. Assim, e como já mencionado anteriormente, seria de extrema importância uma posterior otimização do processo de tingimento, nomeadamente através de uma lavagem de processo após tingimento para remover os excessos do corante.

Os dados obtidos indicam que todos os tratamentos aplicados ao longo desta análise se mostraram benéficos para obtenção de têxteis biocoloridos, bem como funcionalizados (subcapítulos seguintes). Contudo, tratando-se de tratamentos que visam promover a ancoragem do composto na malha quando esta é sujeita às condicionantes normais da sua utilização, como

a lavagem, seria interessante submeter todas estas amostras a vários ciclos de lavagem, de modo a verificar ou não a existência do efeito positivo. No entanto, dada a falta de tempo, os testes realizados para verificar a solidez da cor e das atividades antioxidante e antibacteriana à lavagem, foram em algodão colorido/funcionalizado com a solução de biocoloração (CO + SB), algodão tratado simultaneamente com alúmen de potássio e colorido/funcionalizado com a referida solução (CO + AP + SB), algodão pré-tratado com alúmen de potássio e colorido/ funcionalizado com a mesma solução de biocoloração (CO_ptAP + SB) e algodão tratado simultaneamente com o glicol e sulfato de alumínio a 10 g/L e colorido/ funcionalizado com a solução de biocoloração (CO + 1%Gli-1%SA + SB). A seleção das amostras resultou num compromisso entre os critérios de economia, sustentabilidade e os resultados que se obtiveram nas bioatividades dos têxteis (subcapítulos 3.3.2 e 3.3.3). Neste sentido sujeitaram-se as amostras selecionadas a vários ciclos de lavagem numa máquina doméstica convencional e analisou-se a cor, recorrendo ao sistema CIELab. Os controlos relativos às amostras indicadas foram igualmente sujeitos às mesmas condições, contudo não foram incluídos nesta análise por se tratar de amostras brancas, para as quais se não obtiveram valores de força colorística nem diferenças de cor.

Relativamente à análise visual da cor, as fotografias dos substratos biocoloridos encontram-se na **Tabela 6**, sendo possível verificar que, de um modo geral, e após os diferentes ciclos de lavagens, a perda de cor nos provetes foi pouco significativa, revelando-se este um resultado promissor.

Tabela 6. Resultados obtidos após coloração, por esgotamento, com a solução de biocoloração (SB), antes e após os vários ciclos de lavagem, numa máquina de lavar convencional a 30 °C durante aproximadamente 1 h. As amostras utilizadas foram algodão (CO), algodão tratado simultaneamente com alúmen de potássio (CO + AP), algodão pré-tratado com alúmen de potássio (CO_ptAP) e algodão tratado simultaneamente com 1 % de glicol e 1 % de sulfato de alumínio (CO + 1%Gli-1%SA).

Ensaio	Cor obtida			
	0 Ciclos	1 Ciclo	3 Ciclos	5 Ciclos
CO + SB				
CO + AP + SB				
CO_ptAP + SB				
CO + 1%Gli-1%SA + SB				

No que diz respeito à força colorística (**Figura 19**), verifica-se que o valor de K/s obtido para a amostra tingida com a solução de biocoloração sem adição de agentes auxiliares (CO + SB) diminui com o decorrer das lavagens, confirmando-se, assim, uma das principais limitações da coloração natural, a baixa solidez à lavagem. Contudo, como a cor desta amostra não é muito intensa, a perda também não é muito significativa (**Tabela 6**).

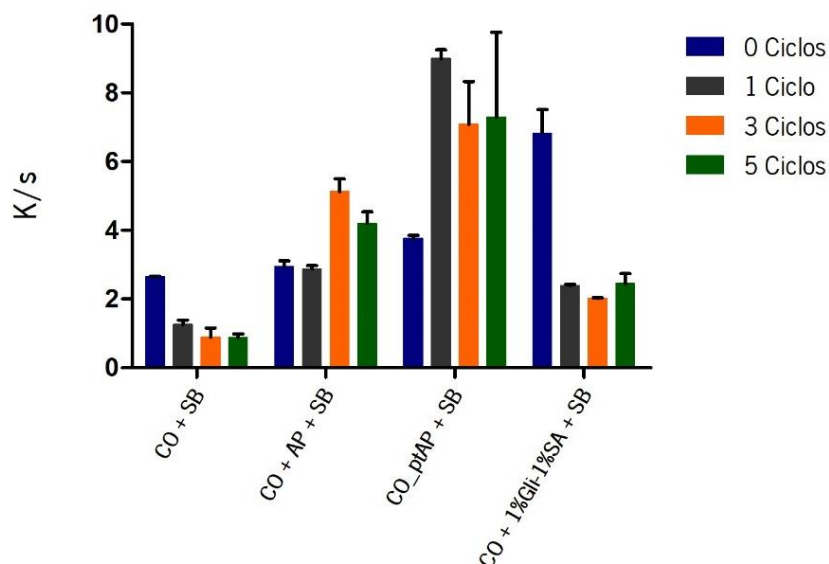


Figura 19. Força colorística (K/s) dos provetes biocoloridos com a solução de biocoloração (SB). As amostras utilizadas foram algodão (CO), algodão tratado simultaneamente com alúmen de potássio (CO + AP), algodão pré-tratado com alúmen de potássio (CO_ptAP) e algodão tratado simultaneamente com 1 % de glioxal e 1 % de sulfato de alumínio (CO + 1%Gli-1%SA). As amostras foram analisadas previamente às lavagens (0 ciclos), e após 1, 3 e 5 ciclos de lavagem, numa máquina de lavar doméstica. Os resultados são apresentados como a média de duas réplicas efetuadas, para cada condição, e respetivo desvio padrão.

O mesmo cenário é verificado na amostra com um agente de ligação a 10 g/L e com a solução de biocoloração (CO + 1%Gli-1%SA + SB) (**Figura 19**) embora, neste caso, exista um decréscimo significativo no valor de K/s, após 1 ciclo, mantendo-se praticamente estável nos ciclos seguintes. Este resultado poderá estar relacionado com o facto da solução de tingimento apresentar um precipitado que acabou por ser transferido para o substrato, sendo maioritariamente removido após o primeiro ciclo de lavagem. Uma vez mais, reforça-se a necessidade de uma otimização no processo de tingimento de forma a retirar o excesso de corante na superfície da fibra. Os resultados de K/s indicam que o agente de ligação utilizado forneceu maior ligação da solução colorida à malha de 100 % algodão em comparação com o algodão apenas funcionalizado com a solução de biocoloração (CO + SB).

Por outro lado, no caso da mordentagem em simultâneo (CO + AP + SB) e prévia com alúmen de potássio (CO_ptAP + SB) verifica-se um aumento do valor K/s após 3 ciclos e após 1 ciclo, respetivamente. Por vezes, as cores das amostras alteram-se ou escurecem com as lavagens, daí obter-se um valor de K/s superior ao valor obtido na ausência de lavagem (0 ciclos). Além disso, ambas as amostras apresentam valores de força colorística superiores aos valores das outras duas amostras testadas, após os 5 ciclos. Provavelmente deve-se à elevada capacidade dos sais metálicos do mordente melhorarem a ancoragem dos compostos de coloração na fibra têxtil (Ayele *et al.*, 2020). Para uma melhor avaliação da solidez à lavagem dos provetes biocoloridos, foram calculados os valores de ΔE entre cada provete lavado (1, 3 e 5 vezes) e o respetivo têxtil sem qualquer lavagem (**Figura 20**). Estes valores de ΔE foram calculados tendo em consideração os valores medidos para as coordenadas de cor $L^*a^*b^*$.

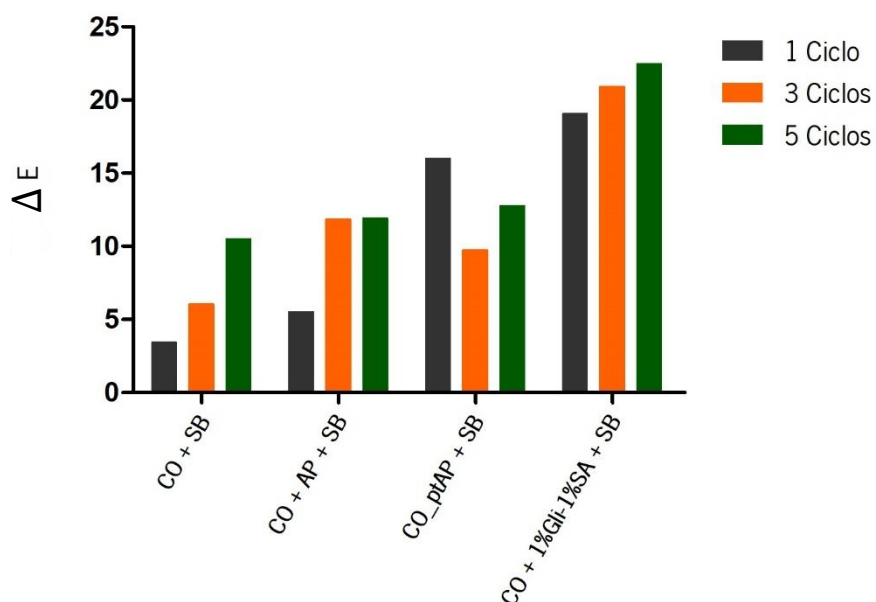


Figura 20. Diferença de cor (ΔE), calculada pela equação 1, para cada condição testada, após os diferentes ciclos de lavagem. Os resultados são apresentados como a média de duas réplicas para cada condição.

Analisando a **Figura 20**, verifica-se que, de um modo geral, as diferenças de cor aumentam com o aumento do número de lavagens. Esta observação corrobora os valores calculados para a força colorística apresentados na **Figura 19**, que diminuem sistematicamente após cada ciclo, traduzindo consequentemente uma perda de cor a cada lavagem. Uma vez que os provetes perdem cor após cada ciclo de lavagem, é esperado que se afastem cada vez mais da cor obtida após funcionalização. Além disso, as amostras de cores mais claras (CO + SB) não apresentam

tanta perda de cor, comparando com os provetes de cores mais escuras (CO_ptAP + SB e CO + 1%Gli-1%SA + SB).

Em suma, tendo em conta os provetes analisados, o mordente alúmen de potássio parece ser o agente auxiliar mais promissor no processo de tingimento, permitindo uma melhor ancoragem da cor, proveniente da solução de própolis, à malha de algodão, mesmo após ciclos de lavagem. Relativamente aos processos de mordentagem, verifica-se que em ambas as abordagens, simultânea e prévia, os resultados da análise de cor, após os 5 ciclos, se mantiveram semelhantes. Logo, a nível industrial seria mais vantajoso executar o processo de mordentagem em simultâneo, diminuindo o tempo, os gastos com energia e com recursos humanos. Assim, a utilização da SB com própolis poderá ser uma boa abordagem para a indústria têxtil, com o intuito de substituir os corantes e compostos funcionais sintéticos convencionais pelos de base natural, tornando a indústria e os produtos têxteis mais sustentáveis.

3.3.2. Capacidade antioxidante dos têxteis biocoloridos e funcionalizados

A análise da atividade antioxidante das várias amostras de têxteis bicoloridas foi efetuada com recurso ao método do radical ABTS. Os resultados encontram-se representados na **Figura 21** (tendo sido obtidos no comprimento de onda ótimo de 729 nm, com um máximo de absorvância de 0,698; **Figura A2, Apêndice II**). No caso dos ensaios onde se utilizou um tratamento simultâneo e um pré-tratamento com alúmen de potássio e/ou ácido tânico, o controlo negativo é representado pela condição onde apenas se adicionou mordente à malha, tratando-se de um pré-tratamento (_ptAP e _ptAT); nos ensaios com o pré-tratamento com alúmen ou ácido tânico, equipamento de plasma e quitosano, o controlo corresponde à condição onde apenas se adicionou o tratamento à malha, sendo que se deveria ter efetuado um controlo correspondente ao pré-tratamento seguido da mordentagem.

Através da **Figura 21**, é possível confirmar que a L-cisteína (controlo positivo) regista valores de acordo com o esperado, apresentando uma atividade antioxidante média a rondar os 50 % em todos os ensaios representados. No que diz respeito aos têxteis que não foram tingidos/funcionalizados com própolis apresentam diferenças significativas quando comparados com a própria solução de biocoloração e com a amostra tingida (CO + SB), demonstrando não ter atividade antioxidante. Contudo, verifica-se uma exceção na amostra pré-tratada com ácido tânico (CO_ptAT) com atividade antioxidante ($94,73 \pm 1,83$ %) estatisticamente idêntica à da solução de

biocoloração ($88,66 \pm 0,39$), bem como à da amostra de algodão tingida (CO + SB) ($91,64 \pm 2,86$ %), mostrando que o mordente ácido tânico tem capacidade de eliminar o radical livre ABTS. Este resultado tem eco na literatura, com Koh e Hong (2017) a constatar que o algodão pré-tratado com uma solução de ácido tânico a 10 g/L apresentou uma atividade antioxidante de, aproximadamente, 90 %. A elevada atividade antioxidante do ácido tânico poderá estar associada à presença de compostos polifenólicos, que apresentam capacidade de eliminar radicais livres (Zhang *et al.*, 2019). Desta forma, os provetes que contêm este mordente não serão tão interessantes para o presente estudo, uma vez que não se saberia se atividade antioxidante presente provinha do própolis presente na solução, do ácido tânico ou de uma eventual sinergia entre os dois.

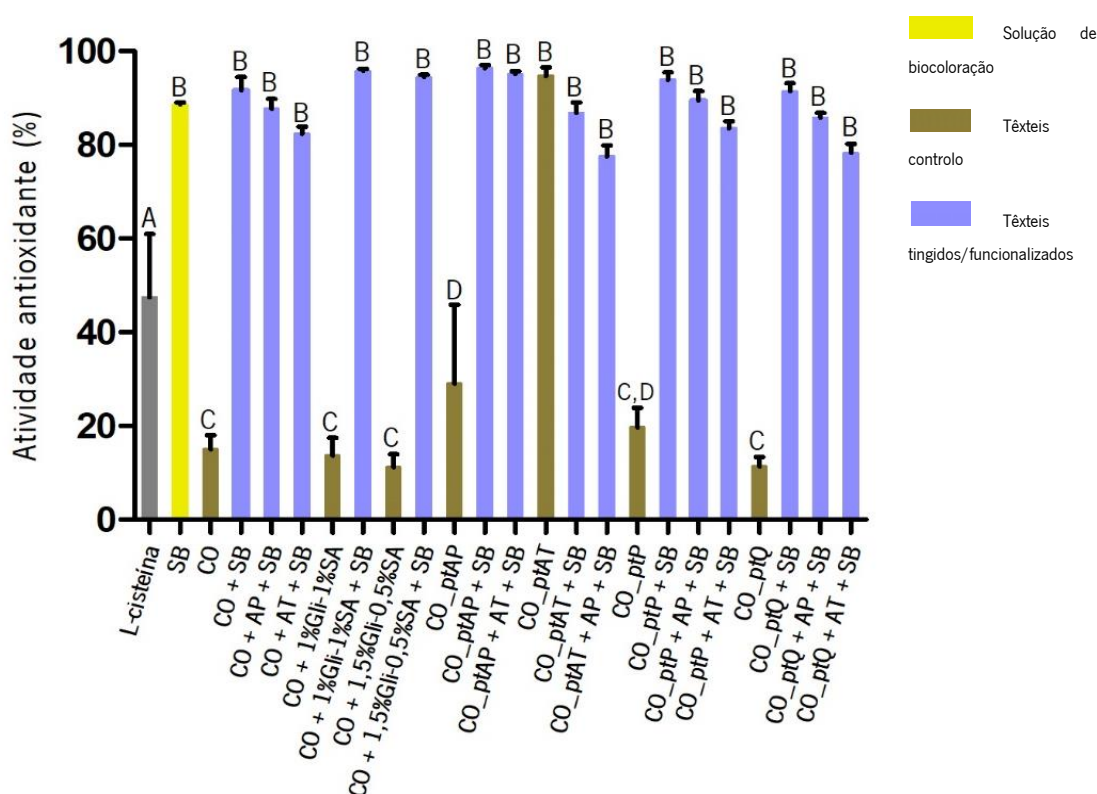


Figura 21. Atividade antioxidante de têxteis funcionalizados com a solução de biocoloração (SB) e dos respectivos têxteis controle não tingidos. L-cisteína (0,3 g/L) foi usada como controle positivo. Os resultados são apresentados em termos da média de três réplicas para cada condição e respetivo desvio padrão. As médias foram analisadas através de comparações múltiplas entre controle positivo, a solução de biocoloração (SB) e o algodão (CO) com as restantes amostras, recorrendo ao teste *One-way* ANOVA (letras diferentes entre 2 valores indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste *Tukey* ($p \leq 0,05$)).

Por outro lado, é possível verificar que todos os têxteis tingidos/funcionalizados com a solução de biocoloração conferiram às malhas uma maior capacidade antioxidante, em

comparação com os têxteis controlos. Isto poderá ser explicado pela presença de compostos funcionais, transferidos aquando do banho de esgotamento da SB para o algodão. É de notar que a amostra sem qualquer pré-tratamento ou adição de agentes auxiliares, o provete CO + SB, apresentou um valor de atividade antioxidante elevado, mais especificamente de $91,64 \pm 2,86 \%$. Este é um resultado particularmente interessante e promissor a nível industrial, pela possibilidade de remover os custos com mordentes e, também, por permitir que o processo seja mais sustentável, evitando efluentes com resíduos tóxicos.

Relativamente ao mordente alúmen de potássio (**Figura 21**), este não influencia significativamente a obtenção de têxteis com atividade antioxidante, existindo distinção entre as malhas tingidas e não tingidas. No entanto, o provete pré-tratado com este mordente (CO_ptAP) apresenta um ligeiro aumento de atividade antioxidante ($29,05 \pm 16,81 \%$) quando comparado com o algodão (CO) ($15,08 \pm 3,00 \%$). Esta diferença entre amostras poderá dever-se a uma ligeira heterogeneidade do tratamento, ou seja, a uma diferença na concentração do alúmen de potássio em diferentes zonas da mesma malha, que se reflete também na amplitude dos desvios padrão obtidos. No caso dos têxteis biocoloridos e tratados com alúmen de potássio nos diferentes processos de mordentagem utilizados - simultânea (CO + AP + SB) e pré (CO_ptAP + SB) - ambos apresentam atividade antioxidante estatisticamente idêntica à da solução, e entre si ($87,73 \pm 2,06 \%$ e $96,35 \pm 0,71 \%$).

Relativamente ao agente de ligação glioxal e ao catalisador sulfato de alumínio verifica-se que estes não influenciam a atividade analisada, não havendo distinção entre as malhas com e sem este auxiliar (**Figura 21**). Por outro lado, a atividade antioxidante das amostras têxteis funcionalizadas com diferentes concentrações destes agentes de ligação (CO + 1%Gli-1%SA + SB e CO + 1,5%Gli-0,5%SA + SB) é estatisticamente semelhante ($95,82 \pm 0,41 \%$ e $94,43 \pm 0,49 \%$). Assim, para os ensaios subsequentes, optou-se por uma destas condições, que foi a que apresentava menor concentração do agente de ligação glioxal (CO + 1%Gli-1%SA + SB), não só para efeitos de comparação pois trata-se de um tratamento já utilizado para funcionalizar têxteis com própolis (Sharaf, *et al.*, 2013) mas também por representar uma melhor opção a nível industrial.

Apesar do mordente de alúmen de potássio e do agente de ligação glioxal serem considerados seguros, a crescente consciencialização ambiental leva à necessidade de procurar métodos alternativos que gerem o mínimo de efluentes. A tecnologia de plasma permite induzir

grupos funcionais sem a necessidade de químicos ou solventes e não produz efluentes. As amostras de algodão foram submetidas ao pré-tratamento com plasma e a um processo de mordentagem em simultâneo com alúmen de potássio ou com ácido tânico, com o objetivo de analisar o efeito entre os dois tipos de tratamento. Pela análise da **Figura 21** conclui-se que, após o tratamento com plasma, a malha (CO_ptP) não exibe atividade antioxidante, não havendo distinção entre a malha com ($19,68 \pm 4,24 \%$) e sem pré-tratamento ($15,08 \pm 3,00 \%$). Nos têxteis impregnados com a solução de biocoloração todas as amostras apresentaram um aumento significativo da atividade antioxidante. Relativamente ao efeito da utilização de dois tratamentos, e excluindo a análise do pré-tratamento com ácido tânico uma vez que este mordente por si só tem atividade, constata-se não haver diferenças significativas na atividade antioxidante comparativamente a metodologias mais rápidas (provetes CO_ptP + AP + SB e CO + AP + SB por exemplo). Desta forma, e pensando em termos de escala industrial, seria mais vantajoso recorrer apenas ao mordente alúmen de potássio tendo em conta a duração, custo e conhecimento mais avançado do processo.

Outra alternativa sustentável para potencializar a ligação dos compostos funcionais ao têxtil pode ser através de um pré-tratamento com quitosano. Da mesma forma que para a tecnologia de plasma, foi igualmente testado o efeito do pré-tratamento com quitosano juntamente com a mordentagem simultânea com alúmen de potássio. Analisando os controlos, o algodão pré-tratado (CO_ptQ) não apresenta atividade antioxidante, demonstrando-se semelhante à malha não tratada (CO). Relativamente aos têxteis biocoloridos, todas as amostras tiveram um aumento significativo da atividade analisada em comparação com as malhas com e sem pré-tratamento. Contudo, tal como o pré-tratamento com plasma, este tratamento não apresenta diferenças relativamente aos métodos mais simples, que continuam assim a mostrar-se mais vantajosos.

Uma vez que os resultados do rastreio inicial da avaliação da atividade antioxidante nos têxteis desenvolvidos foram positivos, no sentido em que houve transferência desta bioatividade da SB para o algodão, pretendeu-se avaliar a durabilidade da funcionalidade ao longo do tempo e à lavagem com detergente. Para o efeito, optou-se pelas amostras CO + SB, CO + AP + SB, CO_ptAP + SB e CO + 1%Gli-1%SA + SB, a par dos respetivos controlos. Os critérios subjacentes a esta escolha tiveram em linha de conta não apenas os resultados da atividade antioxidante, mas também o facto do tempo e dos gastos com a energia e os recursos humanos serem inferiores no caso destas amostras, a par da constatação de que os respetivos têxteis controlos não possuem atividade antioxidante. E para estudar a capacidade da solução de biocoloração funcionalizar os

têxteis em fases temporais diferentes e, consequentemente, a sua estabilidade ao longo do tempo, procedeu-se a uma nova funcionalização têxtil após 8 meses e avaliou-se por ABTS a atividade antioxidante destas amostras. A comparação entre os resultados obtidos para a atividade antioxidante das amostras tratadas em janeiro de 2020 e então avaliadas para esta bioatividade com os das amostras tingidas com a mesma solução em setembro do mesmo ano encontram-se na **Figura 22**.

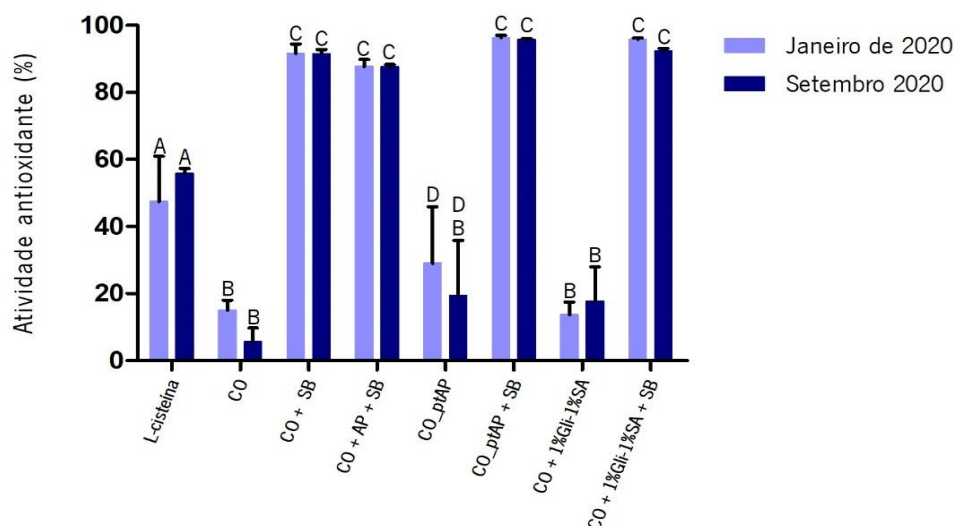


Figura 22. Atividade antioxidante de têxteis funcionalizados com a solução de biocoloração (SB) num intervalo de 8 meses. A atividade antioxidante foi avaliada em janeiro e em setembro de 2020, após cada uma das funcionalizações. O controlo positivo foi L-cisteína (0,3 g/L) e o controlo negativo é constituído pelos têxteis não tingidos. As amostras utilizadas foram algodão (CO), algodão tratado simultaneamente com alúmen de potássio (CO + AP), algodão pré-tratado com alúmen (CO_ptAP) e algodão tratado simultaneamente com glicol e sulfato de alumínio a 10 g/L (CO + 1%Gli-1%SA). Os resultados são apresentados como a média de três réplicas para cada condição e respetivo desvio padrão. As médias foram analisadas através de comparações múltiplas, recorrendo ao teste *One-way* ANOVA (letras diferentes entre 2 valores indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste *Tukey* ($p \leq 0,05$)).

Os provetes biocoloridos e funcionalizados com 8 meses de intervalo apresentam idêntico potencial antioxidante, o que demonstra que a solução de biocoloração com própolis se mantém estável, pelo menos, durante este período. Trata-se de uma grande vantagem a nível industrial, uma vez que as empresas poderão armazenar a solução a 4 °C e usá-la em processos de tingimento e de funcionalização durante este período, sem necessidade de prepararem nova solução a cada ensaio.

Paralelamente, voltou a avaliar-se a atividade antioxidante da amostra tingida/funcionalizada com a solução de biocoloração (CO + SB) em janeiro 2020, isto é, decorridos 8 meses após o tratamento (**Figura 23**). Consta-se que o provete em estudo manteve a atividade

funcional, o que demonstra que se pode tingir uma maior quantidade de malha e armazená-la durante pelo menos 8 meses sem que a atividade antioxidante se perca, o que representa outra vantagem a nível industrial.

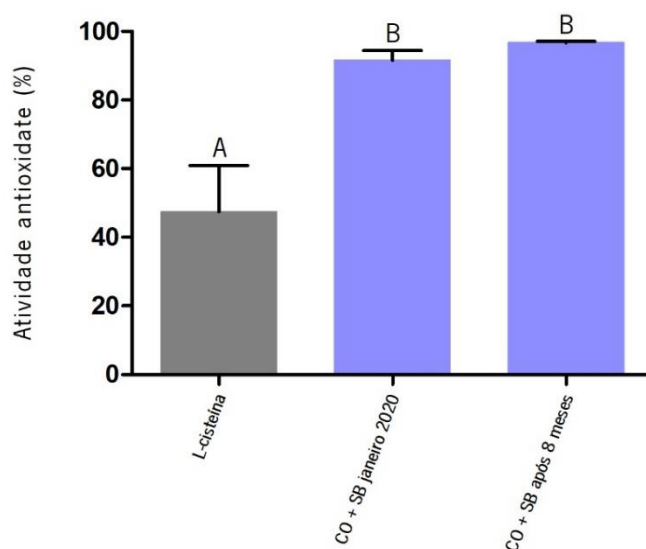


Figura 23. Atividade antioxidante da malha de algodão funcionalizada com a solução de biocoloração (CO + SB) medida logo após o tingimento e decorridos 8 meses, usando L-cisteína (0,3 g/L) como controlo. Os resultados são apresentados como a média de três réplicas para cada condição e respetivo desvio padrão. As médias foram analisadas recorrendo ao teste *One-way* ANOVA (letras diferentes entre 2 valores indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste *Tukey* ($p \leq 0,05$)).

Uma das principais limitações inerentes ao desenvolvimento de têxteis funcionais, sobretudo com produtos naturais, é a sua capacidade de manter a atividade inicial, particularmente depois de sujeitos a várias condições da sua utilização, como a lavagem. Neste sentido, para averiguar a solidez da atividade antioxidante à lavagem, os têxteis, entretanto selecionados, e os seus respetivos controlos, foram submetidos a vários ciclos de lavagem, numa máquina de lavar convencional e com recurso a um detergente para roupa delicada (Soflan). Os resultados obtidos para estes ensaios com diferentes ciclos de lavagem estão representados na **Figura 24**.

Analisando os controlos (CO, CO_ptAP e CO +1 %Gli-1%SA) (**Figura 24**) verifica-se, de um modo geral, que ocorreu um decréscimo na atividade em comparação com os têxteis não lavados. Isto pode estar associado com a eliminação de impurezas de acabamento têxtil que, antes da lavagem, influenciavam, ligeiramente, o método de ABTS.

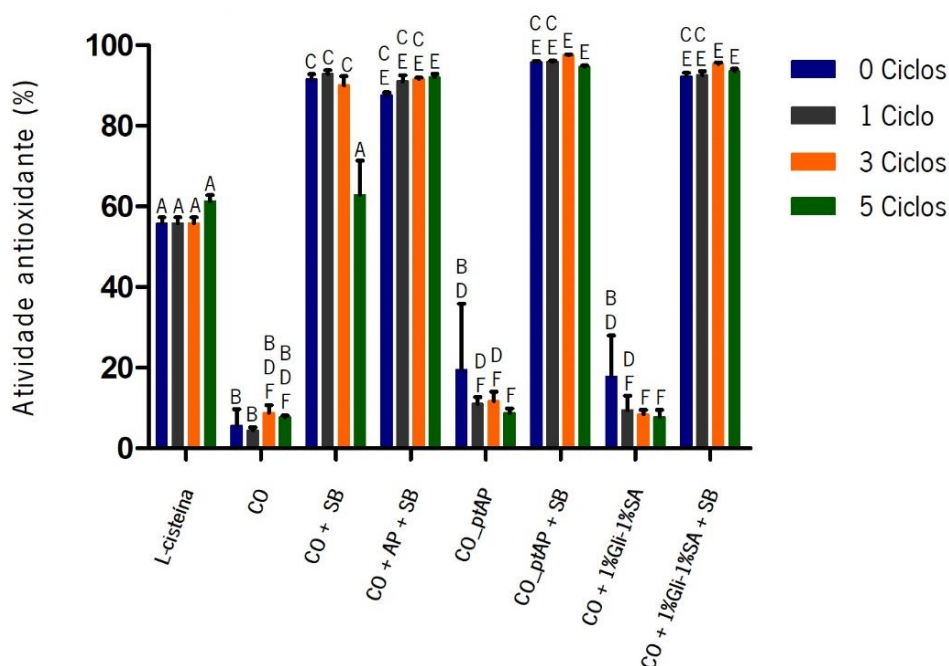


Figura 24. Atividade antioxidante de têxteis funcionalizados com a solução de biocoloração (SB) e respectivos controles após 1, 3 e 5 ciclos de lavagem. L-cisteína (0,3 g/L) foi usada como controle positivo. As amostras utilizadas foram algodão (CO), algodão tratado simultaneamente com alúmen de potássio (CO + AP), algodão pré-tratado com alúmen (CO_{ptAP}) e algodão tratado simultaneamente com glioxal e sulfato de alumínio a 10 g/L (CO + 1%Gli-1%SA). Os resultados são apresentados como a média de três réplicas para cada condição e respectivo desvio padrão. As médias foram analisadas através de comparações múltiplas, recorrendo ao teste *One-way* ANOVA (letras diferentes entre 2 valores indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste *Tukey* ($p \leq 0,05$)).

A amostra tratada unicamente com a solução de biocoloração (CO + SB) teve uma perda de atividade antioxidante, mas apenas após 5 ciclos de lavagem, apresentando diferenças significativas em comparação com os provetes que foram sujeitos a 1 e a 3 ciclos de lavagem, resultados que vão ao encontro das conclusões retiradas na análise da cor (**Figura 19 e 20**). Este resultado está também de acordo com o que tem sido reportado na literatura relativamente às limitações do tingimento e da funcionalização natural, e que é a baixa solidez às principais condicionantes do ciclo de vida do artigo têxtil, sobretudo à lavagem, requerendo a utilização de compostos auxiliares para melhorar a ancoragem e a durabilidade dos compostos funcionais presentes nos substratos têxteis (Zerin *et al.*, 2019; Eid e Ibrahim, 2020; Haji e Naebe, 2020). Contudo, após 5 ciclos de lavagem, esta amostra ainda apresenta uma atividade antioxidante consideravelmente maior que o respetivo provete controlo (CO), ou seja, $62,75 \pm 8,65$ % em relação a $7,75 \pm 0,35$ %, respetivamente. Mesmo assim, a amostra CO + SB poderá fornecer benefícios cosméticos como antienvelhecimento, útil em determinadas aplicações de utilização

única ou com eficácia até 3 ciclos de lavagem, como numa máscara, por exemplo, descartável ou reutilizável 2-3 vezes.

Relativamente às malhas coloridas/funcionalizadas, quer utilizando um tratamento simultâneo ou um pré-tratamento com alúmen de potássio (CO + AP + SB e CO_ptAP + SB), a atividade antioxidante mantém-se após os vários ciclos de lavagem. De realçar que, após 5 ciclos, ambas as amostras apresentaram uma atividade antioxidante idêntica à da solução de biocoloração ($88,66 \pm 0,39 \%$) (**Figura 17**). Estes resultados apontam para um papel crucial do mordente alúmen de potássio na durabilidade da funcionalidade dos têxteis tratados com própolis. Uma vez que ambas as condições de mordentagem apresentam um desempenho semelhante no que diz respeito à atividade antioxidante, a nível industrial será sempre mais favorável realizar tal processo em simultâneo com o tingimento, diminuindo o tempo, os gastos com a energia e os recursos humanos.

De modo a compreender se a adição de um agente de ligação confere aos têxteis coloridos/funcionalizados uma melhor ancoragem, submeteu-se o provete CO + 1%Gli-1%SA + SBa vários ciclos de lavagem. As amostras continuaram a ter uma atividade antioxidante igual ao provete não lavado (**Figura 24**). Porém, não se verificam efeitos positivos na utilização de glioxal em comparação com o alúmen de potássio, ou seja, o algodão tratado com glioxal e com a solução de biocoloração (CO + 1%Gli-1%SA + SB) exibe a mesma capacidade redutora que o têxtil tratado com alúmen de potássio e com a solução (CO + AP + SB). Assim, o alúmen de potássio será um melhor auxiliar na coloração/funcionalização, dada a menor toxicidade, diminuindo o impacto do posterior descarte das águas residuais geradas pela coloração/funcionalização (Vankar, 2017).

Dado que os resultados obtidos após 5 ciclos de lavagem foram bastante promissores em termos da funcionalidade têxtil, seria interessante, futuramente, testar a atividade antioxidante após a realização de mais ciclos de lavagem.

3.3.3. Potencial antibacteriano dos têxteis biocoloridos e funcionalizados

Com o intuito de oferecer aos consumidores cada vez mais conforto, higiene e bem-estar, a indústria têxtil tem trabalhado arduamente no desenvolvimento de têxteis técnicos e funcionais com propriedades diversas, entre as quais antimicrobianas. Estes produtos permitem controlar os maus odores e atrasar a degradação do artigo têxtil, problemas causados pelos microrganismos presentes na pele humana, bem como ajudar na mitigação de doenças cutâneas, estas causadas

por microrganismos patogénicos ou oportunistas. Nos últimos anos tem sido notório o interesse no desenvolvimento destes artigos, e com compostos funcionais mais sustentáveis, sobretudo de base natural. Vários estudos têm mostrado que as fibras celulósicas tratadas com agentes antibacterianos naturais, como extratos de aloé vera (Ali *et al.*, 2014; Khurshid *et al.*, 2015), tulsi (Sathianarayanan *et al.*, 2010), flor de joio espinhoso (Thilagavathi e Kannaian, 2008) e chá verde (Ibrahim *et al.*, 2017) apresentam boas atividades contra vários microrganismos. Estes estudos de algum modo suportam o presente trabalho, onde um dos objetivos é a utilização de própolis para funcionalização de têxteis com propriedades antibacterianas.

Após preparação das malhas 100 % algodão coloridas/funcionalizadas, foram efetuados testes qualitativos e quantitativos de avaliação de desempenho antimicrobiano, com recurso à bactéria *Staphylococcus aureus*, por demonstrar suscetibilidade à solução de biocoloração com própolis (subcapítulo 3.2.2). Considerando as metodologias disponíveis, optou-se por um ensaio de seguimento da curva de crescimento da bactéria, quando colocada em contacto com os têxteis tingidos com a solução de biocoloração. Realizou-se um controlo de crescimento, que consistiu apenas numa cultura de bactérias em meio líquido e condições de crescimento apropriadas, um controlo positivo, que consistiu na colocação do antibiótico ampicilina na cultura e vários controlos negativos, correspondentes a culturas em contacto com os têxteis sem tingimento/funcionalização.

Numa primeira fase, e tal como na análise da cor e da propriedade antioxidante, procedeu-se a um rastreio com o objetivo de selecionar os tratamentos mais promissores para prosseguir os estudos de avaliação da solidez da funcionalidade à lavagem. As curvas de crescimento da *Staphylococcus aureus* encontram-se nas **Figuras 25 a 30**. De modo a tornar a análise mais perceptível, alguns parâmetros foram compilados numa tabela, sendo eles a taxa específica de crescimento, que permite avaliar o aumento do número total de células durante a fase exponencial; a densidade ótica final, a duração da fase de latência, ou seja, o tempo que as células demoram a adaptar-se ao novo meio líquido e a percentagem de atividade antibacteriana (**Tabelas 7 a 12**).

No que diz respeito aos controlos, de forma geral, todos exibiram o perfil esperado. Nas curvas de crescimento de *Staphylococcus aureus* e de *Staphylococcus aureus* na presença da malha de algodão (CO) é possível observar uma diferença entre a densidade ótica final, a duração da fase de latência e a taxa específica de crescimento (**Figura 25, Tabela 7**). Estas diferenças poderão dever-se à retenção e adesão de microrganismos ao provete, reduzindo a quantidade de

bactérias livres em suspensão no meio líquido, devido à natureza rugosa das superfícies têxteis e à constante agitação durante o ensaio. Segundo Wang *et al.* (2018) a malha de algodão faz com que exista alguma redução no crescimento da bactéria, proporcionado pela adesão de bactérias à superfície da amostra. No entanto, o algodão sem qualquer tratamento (CO) não apresenta atividade antibacteriana, atingindo valores de D.O. final superiores a 1, mesmo quando tratado com alúmen de potássio (CO + AP), indicando que este mordente não apresenta atividade antibacteriana. Por sua vez, a curva de crescimento bacteriano na presença do mordente ácido tânico (CO + AT), por si só, é semelhante à da curva na presença ampicilina (controlo positivo), atingindo valores de D.O. próximos de zero, indicando neste caso que o mordente tem atividade antibacteriana.

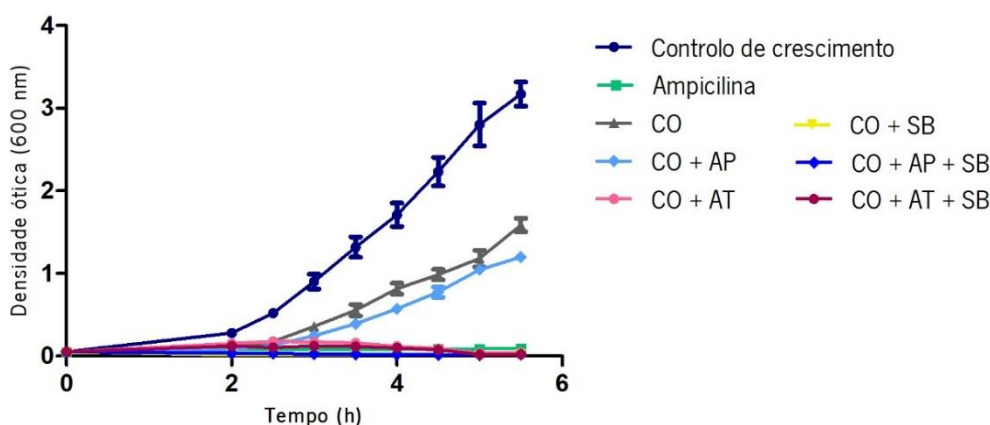


Figura 25. Curva de crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com malhas de algodão funcionalizadas com solução de biocoloração (SB) e os respetivos controlos. As amostras utilizadas foram algodão (CO), algodão tratado simultâneamente com alúmen de potássio (CO + AP) ou com ácido tânico (CO + AT). Os têxteis foram colocados numa cultura bacteriana em meio LB com uma D.O.₆₀₀ inicial de 0,05, sendo a incubação a 37 °C e 200 rpm. A D.O.₆₀₀ foi medida ao longo de 5,5 horas. Apresentam-se os valores médios de três réplicas efetuadas, para cada ponto, e respetivo desvio padrão.

Todos os têxteis coloridos/funcionalizados com a solução de biocoloração têm capacidade de inibir o crescimento bacteriano quando em contacto com a cultura líquida e a fase de latência mantém-se ao longo de todo o ensaio, o que não permite a determinação da taxa específica de crescimento. Em particular, destaca-se o algodão tratado apenas com a solução de biocoloração (CO + SB) - nestas condições, a fase de latência tem uma duração de pelo menos 5,5 h, a D.O. final é próxima de zero e a atividade antibacteriana praticamente 100 %. Os compostos bioativos da solução passados para os têxteis parecem inibir a multiplicação da bactéria, pelo menos durante o tempo do ensaio, um comportamento semelhante ao observado na presença de ampicilina.

Tabela 7. Parâmetros do crescimento - taxa específica de crescimento (h^{-1}), densidade ótica final, duração da fase de latência (h) e atividade antibacteriana (%) - de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com malhas de algodão (CO), algodão tratado simultaneamente com alúmen de potássio (C + AP) ou com ácido tânico (CO+ AT) não funcionalizadas e funcionalizadas com a solução de biocoloração (SB). “-” indica não determinável.

	Taxa específica de crescimento (h^{-1})	Densidade ótica final	Fase latência (h)	Atividade antibacteriana (%)*
Controlo de crescimento	1,17	3,18	2	
Ampicilina	-	0,09	5,5	100±0
CO	1,07	1,59	2,5	37,95±10,01
CO + AP	1,05	1,20	3	24,45±20,07
CO + AT	-	0,04	5,5	99,98±0,01
CO + SB	-	0,02	5,5	99,95±0,05
CO + AP + SB	-	0,02	5,5	99,86±0,20
CO + AT + SB	-	0,02	5,5	99,99±0,003

*Atividade antibacteriana expressa a % de redução de células viáveis observada na presença de ampicilina ou de um dado provete, calculada segundo a equação 5. Desta forma, valores iguais ou inferiores ao observado na presença da malha de algodão não traduzem atividade antibacteriana, mas apenas a interferência do provete no crescimento desta bactéria.

No que se refere aos dois processos de mordentagem - simultânea (**Figura 25, Tabela 7**) ou prévia (**Figura 26, Tabela 8**) - o perfil de crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus*, a D.O. final e a fase de latência são semelhantes, bem como quando é comparado com aplicação ou não de alúmen de potássio. De ressaltar que a análise do mordente ácido tânico não foi contabilizada, uma vez que o auxiliar por si só tem atividade (**Figura 27**). Tal como mencionado para a atividade antioxidante, a melhor opção a nível industrial será sempre a que se traduzir num menor tempo e menos gastos energéticos e de recursos humanos. Assim, a utilização da solução de biocoloração apenas (CO + SB) (**Figura 25**) afigura-se muito promissora, sendo, contudo, necessário ainda fazer uma análise da solidez da atividade à lavagem.

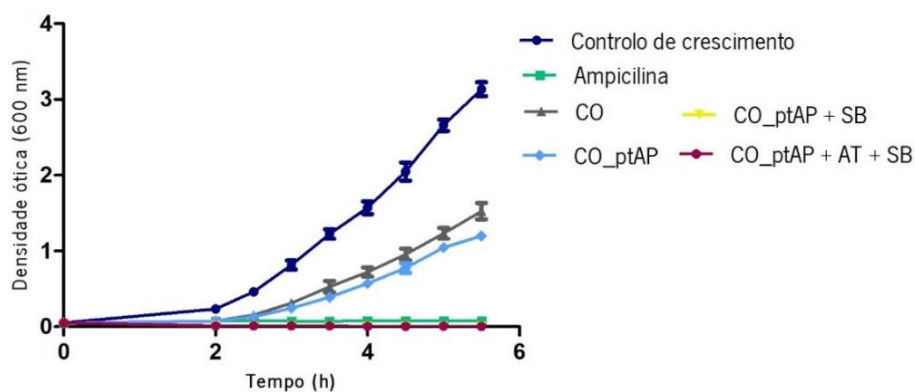


Figura 26. Curva de crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com malhas de algodão funcionalizadas com solução de biocoloração (SB). As amostras utilizadas foram algodão (CO), algodão pré-tratado com alúmen de potássio (CO_ptAP) e algodão pré-tratado com alúmen de potássio e simultaneamente com ácido tânico (CO_ptAP + AT). Os têxteis foram colocados numa cultura bacteriana em meio LB com uma D.O.₆₀₀ inicial de 0,05, sendo a incubação a 37 °C e 200 rpm. A D.O.₆₀₀ foi medida ao longo de 5,5 horas. Apresentam-se os valores médios de três réplicas efetuadas, para cada ponto, e respetivo desvio padrão.

Tabela 8. Parâmetros de crescimento - taxa específica de crescimento (h⁻¹), densidade ótica final, fase de latência (h) e atividade antibacteriana (%) - de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com malhas de algodão (CO), algodão pré-tratado com alúmen de potássio (CO_ptAP), algodão pré-tratado com alúmen de potássio simultaneamente com ácido tânico (CO_ptAP + AT) e funcionalizadas com a solução de biocoloração (SB). “-” indica não determinável.

	Taxa específica de crescimento (h ⁻¹)	Densidade ótica final	Fase latência (h)	Atividade antibacteriana (%)*
Controlo de crescimento	1,17	3,13	2	
Ampicilina	-	0,08	5,5	100±0
CO	1,07	1,53	2,5	17,29±4,30
CO_ptAP	1,05	1,20	2,5	24,45±20,01
CO_ptAP + SB	-	0,004	5,5	99,98±0,004
CO_ptAP+ AT + SB	-	0,005	5,5	99,98±0,03

*Atividade antibacteriana expressa a % de redução de células viáveis observada na presença de ampicilina ou de um dado provete, calculada segundo a equação 5. Desta forma, valores iguais ou inferiores ao observado na presença da malha de algodão não traduzem atividade antibacteriana, mas apenas a interferência do provete no crescimento desta bactéria.

Analisando as curvas de crescimento relativas aos controlos negativos com ácido tânico (CO_ptAT) (Figura 27, Tabela 9) e com glicoxal (CO + 1%Gli-1%SA e CO + 1,5%Gli-0,5%SA) (Figura 28, Tabela 10), é possível verificar que as curvas de crescimento na presença destes têxteis são semelhantes à observada na presença de ampicilina (controlo positivo), evidenciando que, quer a aplicação do ácido tânico quer a de glicoxal conferem atividade antibacteriana ao substrato têxtil. Resultados idênticos, em que o ácido tânico e o glicoxal, quando aplicados em algodão, permitem que este substrato tenha atividade contra *Staphylococcus aureus* foram já reportados anteriormente (Juntarapun e Satirapathkul, 2012; Silva *et al.*, 2018; Jawad *et al.*, 2019).

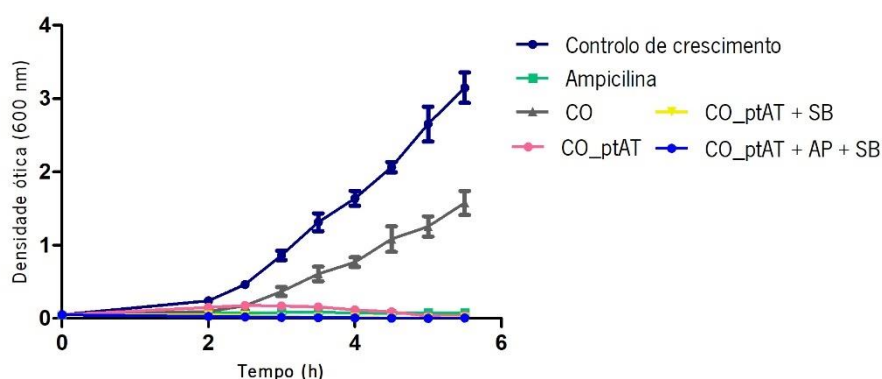


Figura 27. Curva de crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com malhas de algodão funcionalizadas com solução de biocoloração (SB). As amostras utilizadas foram algodão (CO), algodão pré-tratado com ácido tânico (CO_ptAT) e algodão pré-tratado com ácido tânico simultaneamente com alúmen de potássio (CO_ptAT + AP). Os têxteis foram colocados numa cultura bacteriana em meio LB com uma D.O.₆₀₀ inicial de 0,05, sendo a incubação a 37 °C e 200 rpm. A D.O.₆₀₀ foi medida ao longo de 5,5 horas. Apresentam-se os valores médios de três réplicas efetuadas, para cada ponto, e respetivo desvio padrão.

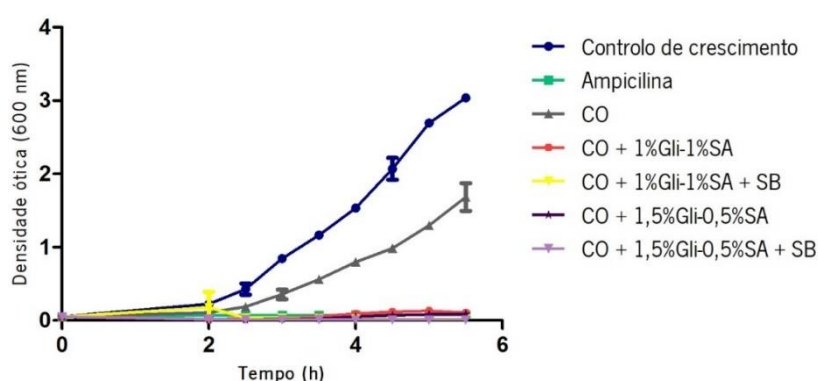


Figura 28. Curva de crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com malhas de algodão funcionalizadas com solução de biocoloração (SB). As amostras utilizadas foram algodão (CO), algodão tratado simultaneamente com glicoxal e sulfato de alumínio a 10 g/L (CO + 1%Gli-1%SA) e tratado simultaneamente com glicoxal e sulfato de alumínio a 15 g/L e 5 g/L, respetivamente (CO + 1,5%Gli-0,5%SA). Os têxteis foram colocados numa cultura bacteriana em meio LB com uma D.O.₆₀₀ inicial de 0,05, sendo a incubação a 37 °C e 200 rpm. A D.O.₆₀₀ foi medida ao longo de 5,5 horas. Apresentam-se os valores médios de três réplicas efetuadas, para cada ponto, e respetivo desvio padrão.

Tabela 9. Parâmetros do crescimento - taxa específica de crescimento (h^{-1}), densidade ótica final, duração da fase de latência (h) e atividade antibacteriana (%) - de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com malhas de algodão (CO), algodão pré-tratado com ácido tânico (CO_ptAT), algodão pré-tratado com ácido tânico simultaneamente com alúmen de potássio (CO_ptAT + AP) e funcionalizadas com a solução de biocoloração (SB). “-” indica não determinável.

	Taxa específica de crescimento (h^{-1})	Densidade ótica final	Fase latência (h)	Atividade antibacteriana (%)*
Controlo de crescimento	1,14	3,15	2	
Ampicilina	-	0,08	-	100±0
CO	1,01	1,58	2	17,30±4,26
CO_ptAT	-	0,04	5,5	99,98±0,01
CO_ptAT + SB	-	0,01	5,5	100±0,002
CO_ptAT + AP + SB	-	0,01	5,5	99,96±0,01

*Atividade antibacteriana expressa a % de redução de células viáveis observada na presença de ampicilina ou de um dado provete, calculada segundo a equação 5. Desta forma, valores iguais ou inferiores ao observado na presença da malha de algodão não traduzem atividade antibacteriana, mas apenas a interferência do provete no crescimento desta bactéria.

Tabela 10. Parâmetros do crescimento - taxa específica de crescimento (h^{-1}), densidade ótica final, duração da fase de latência (h) e atividade antibacteriana (%) - de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com malhas de algodão (CO), algodão tratado simultaneamente com glioxal e sulfato de alumínio a 10 g/L (CO + 1%Gli-1%SA) e tratado simultaneamente com glioxal e sulfato de alumínio a 15 g/L e 5 g/L, respetivamente (CO + 1,5%Gli-0,5%SA) e funcionalizadas com a solução de biocoloração (SB). “-” indica não determinável.

	Taxa específica de crescimento (h^{-1})	Densidade ótica final	Fase latência (h)	Atividade antibacteriana (%)*
Controlo de crescimento	1,22	2,83	2	
Ampicilina	-	0,082	5,5	100±0
CO	1,0	1,18	2,5	23,10±17,62
CO + 1%Gli-1%SA	-	0,11	5,5	95,75±0,45
CO + 1%Gli-1%SA + SB	-	0,02	5,5	98,23±1,83
CO + 1,5%Gli-0,5%SA	-	0,09	5,5	98,45±1,20
CO + 1,5%Gli-0,5%SA + SB	-	0,01	5,5-	94,52±6,35

*Atividade antibacteriana expressa a % de redução de células viáveis observada na presença de ampicilina ou de um dado provete, calculada segundo a equação 5. Desta forma, valores iguais ou inferiores ao observado na presença da malha de algodão não traduzem atividade antibacteriana, mas apenas a interferência do provete no crescimento desta bactéria.

Na análise da atividade antibacteriana os resultados anteriormente mencionados podem ser confirmados. Com efeito, para as amostras tratadas com ácido tânico (**Tabela 9**) e com glioxal (**Tabela 10**) foram registados valores de atividade antibacteriana próximos de 100%. Assim, estes tratamentos não serão vantajosos, uma vez que a funcionalidade poderá estar associada ao tratamento propriamente dito e não aos compostos ativos da solução de biocoloração.

No caso do algodão pré-tratado com quitosano (CO_ptQ) (**Figura 29**), ainda que se observe um aumento na D.O. final, aproximando-se do valor atingido pela cultura bacteriana na presença do provete de algodão sem tratamento (CO), a fase de latência tem uma duração bastante superior. Dada a menor sensibilidade do método espectrofotométrico utilizado neste ensaio, o potencial antibacteriano é melhor avaliado, nestes casos em concreto, através do parâmetro da atividade antibacteriana (**Tabela 11**), que permite concluir que este pré-tratamento com quitosano origina substratos têxteis com alguma atividade antibacteriana ($89,10 \pm 0,91 \%$), o que poderá dever-se à sua natureza policatiónica, bem como às cargas positivas da malha de algodão, interagindo ambas com a parede celular carregada negativamente levando à modificação da permeabilidade celular e, conseqüentemente, poderão interferir no metabolismo microbiano e levar à morte das células (Tayel *et al.*, 2011). Todos os têxteis tingidos/funcionalizados com a solução de biocoloração têm a capacidade de inibir o crescimento bacteriano, decorrendo esta inibição durante todo o tempo de ensaio. A cultura com o têxtil pré-tratado com quitosano (CO_ptQ) tem um comportamento bastante semelhante ao perfil das culturas com os têxteis funcionalizados até cerca das primeiras 4 h de ensaio, mas observa-se crescimento bacteriano a partir dessa altura (**Figura 29**), sugerindo que o efeito inibidor se torna menos intenso e deixa de ser detetável. Um controlo com os dois tratamentos, ou seja, o pré-tratamento com quitosano seguidamente com a mordentagem teria sido útil para verificar um eventual efeito sinérgico entre o pré-tratamento e o mordente, tal como para todas as amostras com dois tratamentos.

Tal como já referido, uma alternativa mais sustentável ao mordente de alúmen para aumentar a reatividade do têxtil, será a tecnologia do plasma atmosférico. As amostras de algodão foram submetidas ao pré-tratamento com plasma e a um processo de mordentagem em simultâneo com alúmen de potássio (**Figura 30**), com o objetivo de analisar o efeito entre os dois tipos de tratamento. A curva de crescimento bacteriano é semelhante na presença do têxtil com modificação da superfície através da tecnologia do plasma (CO_ptP) e do algodão (CO), atingindo-se D.O. finais idênticas e o mesmo se verifica no parâmetro da percentagem de atividade

antibacteriana. Este era um resultado expectável já que o pré-tratamento com plasma apenas torna mais reativa a superfície têxtil, sem fornecer grupos funcionais (Zanini *et al.*, 2018).

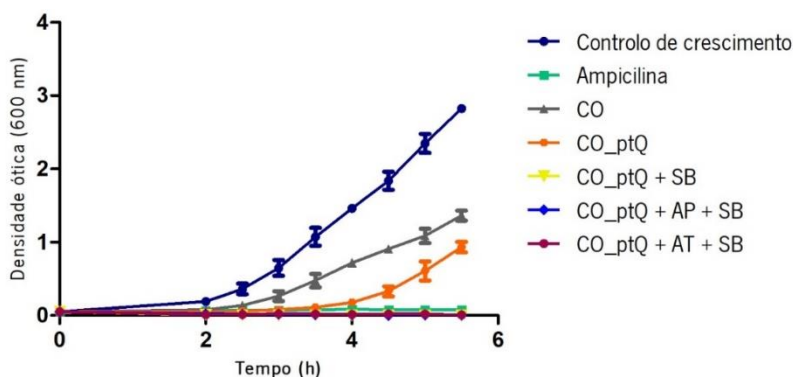


Figura 29. Curva de crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com malhas de algodão funcionalizadas com solução de biocoloração (SB). As amostras utilizadas foram algodão (CO), algodão pré-tratado com quitosano (CO_ptQ), algodão pré-tratado com quitosano simultaneamente com alumínio de potássio (CO_ptQ + AP) e algodão pré-tratado com quitosano simultaneamente com ácido tânico (CO_ptQ + AT). Os têxteis foram colocados numa cultura bacteriana em meio LB com uma D.O.₆₀₀ inicial de 0,05, sendo a incubação a 37 °C e 200 rpm. A D.O.₆₀₀ foi medida ao longo de 5,5 horas. Apresentam-se os valores médios de três réplicas efetuadas, para cada ponto, e respetivo desvio padrão.

Tabela 11. Parâmetros do crescimento - taxa específica de crescimento (h^{-1}), densidade ótica final, duração da fase de latência (h) e atividade antibacteriana (%) - de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com malhas de algodão (CO), algodão pré-tratado com quitosano (CO_ptQ), algodão pré-tratado com quitosano simultaneamente com alumínio de potássio (CO_ptQ + AP) e algodão pré-tratado com quitosano simultaneamente com ácido tânico (CO_ptQ + AT) e funcionalizadas com a solução de biocoloração (SB). “-” indica não determinável.

	Taxa específica de crescimento (h^{-1})	Densidade ótica final	Fase latência (h)	Atividade antibacteriana (%)*
Controlo de crescimento	1,19	2,83	2	
Ampicilina	-	0,08	5,5	100±0
CO	0,98	1,36	2,5	26,27±10,0
CO_ptQ	0,73	0,93	4	89,10±0,91
CO_ptQ + SB	-	0,003	5,5	99,97±0,02
CO_ptQ + AP + SB	-	0,005	5,5	99,13±0,72
CO_ptQ + AT + SB	-	0,009	5,5	99,99±0,008

*Atividade antibacteriana expressa a % de redução de células viáveis observada na presença de ampicilina ou de um dado provete, calculada segundo a equação 5. Desta forma, valores iguais ou inferiores ao observado na presença da malha de algodão não traduzem atividade antibacteriana, mas apenas a interferência do provete no crescimento desta bactéria.

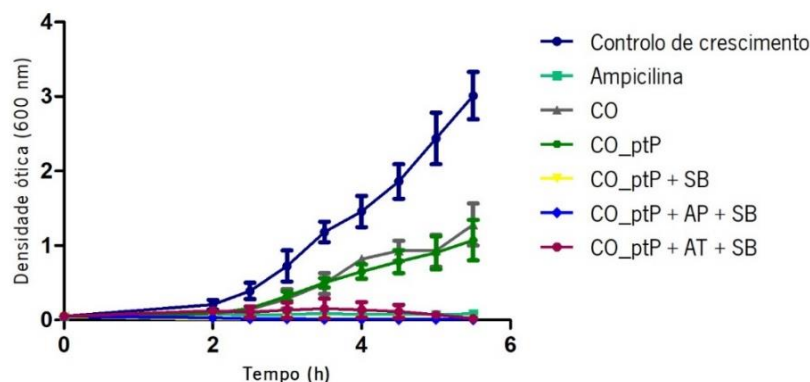


Figura 30. Curva de crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com malhas de algodão funcionalizadas com solução de biocoloração (SB). As amostras utilizadas foram algodão (CO), algodão pré-tratado com plasma (CO_ptP), algodão pré-tratado com plasma simultaneamente com alúmen de potássio (CO_ptP + AP) e algodão pré-tratado com plasma simultaneamente com ácido tânico (CO_ptP + AT). Os têxteis foram colocados numa cultura bacteriana em meio LB com uma D.O.₆₀₀ inicial de 0,05, sendo a incubação a 37 °C e 200 rpm. A D.O.₆₀₀ foi medida ao longo de 5,5 horas. Apresentam-se os valores médios de três réplicas efetuadas, para cada ponto, e respetivo desvio padrão.

Em relação aos têxteis sujeitos a uma pré-tratamento de plasma e com a solução de biocoloração, bem como com o mordente alúmen de potássio, observa-se que as amostras CO_ptP + SB e CO_ptP + AP + SB interferem no crescimento bacteriano, de forma semelhante à da ampicilina ou à da amostra CO + SB (**Figura 25, Tabela 7**). Este comportamento está em concordância com os resultados obtidos no ensaio de viabilidade, que se traduziu em praticamente 100 % de atividade antibacteriana ou inibição do crescimento para qualquer dos provetes tingidos/funcionalizados (**Tabela 12**). Constata-se ainda não existirem efeitos positivos na utilização deste pré-tratamento (CO_ptP + SB), bem como na utilização de dois tratamentos (CO_ptP + AP + SB), pois conduzem a uma D.O. final e a percentagens de atividade antibacteriana semelhantes às dos têxteis CO + SB ou CO + AP + SB, por exemplo, obtidos por metodologias mais rápidas. Acresce que o uso desta tecnologia a nível industrial ainda não é frequente, daí a exclusão desta condição dos ensaios que se seguiram.

Tabela 12. Parâmetros do crescimento - taxa específica de crescimento (h^{-1}), densidade ótica final, duração da fase de latência (h) e atividade antibacteriana (%) - de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com malhas de algodão (CO), algodão pré-tratado com plasma (CO_ptP), algodão pré-tratado com plasma simultaneamente com alúmen de potássio (CO_ptP + AP) e algodão pré-tratado com plasma simultaneamente com ácido tânico (CO_ptP + AT) e funcionalizadas com a solução de biocoloração (SB).
“-” indica não determinável.

	Taxa específica de crescimento (h^{-1})	Densidade ótica final	Fase latência (h)	Atividade antibacteriana (%)*
Controlo de crescimento	1,19	3,01	2	
Ampicilina	-	0,08	5,5	100±0
CO	0,84	1,28	2,5	17,30±4,26
CO_ptP	0,74	1,07	2,5	24,50±19,86
CO_ptP + SB	-	0,005	5,5	99,96±0,02
CO_ptP + AP + SB	-	0,006	5,5	99,13±0,72
CO_ptP + AT + SB	-	0,021	5,5	99,99±0,008

*Atividade antibacteriana expressa a % de redução de células viáveis observada na presença de ampicilina ou de um dado provete, calculada segundo a equação 5. Desta forma, valores iguais ou inferiores ao observado na presença da malha de algodão não traduzem atividade antibacteriana, mas apenas a interferência do provete no crescimento desta bactéria.

Para o estudo da solidez da funcionalidade antibacteriana dos têxteis a vários ciclos de lavagem com detergente, foram seleccionadas duas amostras: algodão tingido/funcionalizado com a solução de biocoloração (CO + SB) e algodão tratado simultaneamente com o mordente alúmen de potássio e a solução de biocoloração (CO + AP + SB), bem como os respetivos controlos. Não foi possível a determinação da curva de crescimento bacteriano na presença destas amostras uma vez que a malha 100 % algodão utilizada nos novos tingimentos apresentava atividade (**Figura A4, Apêndice III**) quando comparada com a malha anteriormente utilizada (**Figura 25**, por exemplo). Isto poderá dever-se à heterogeneidade da etapa de acabamento, já efetuado pelo fornecedor do substrato têxtil antes do processo de tingimento, consistindo este na preparação da malha para confeção e onde poderão ter sido usados compostos com propriedades antibacterianas que, mesmo após as lavagens, poderão ficar ainda retidos na malha. Desta forma, a malha utilizada para este novo tingimento foi sujeita a uma lavagem prévia com o detergente padrão, por se tratar de um detergente mais agressivo, permitindo a remoção de compostos que estivessem a provocar a atividade antibacteriana ao algodão sem qualquer tratamento. Mesmo assim, verificou-se que este algodão influencia o crescimento da cultura bacteriana de forma mais acentuada que a malha

utilizada no início do presente trabalho, mantendo-se em fase de latência cerca de 8 h, embora recupere e, após 24 h, se encontre na fase exponencial (**Figura A5, Apêndice III**). Nestas circunstâncias, dado que o tempo do ensaio antibacteriano era inferior a este período de latência, o estudo da funcionalidade antibacteriana passou a realizar-se através da avaliação da sobrevivência de *Staphylococcus aureus* após 24 h em contacto com os substratos, por meio de contagem de células viáveis (UFC). Após a otimização do protocolo para este novo ensaio, a atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* foi testada após 5 ciclos de lavagem numa máquina doméstica. Nesta fase, de modo diferente do ocorrido para a análise da atividade antioxidante, os têxteis foram submetidos a lavagens de processo com detergente padrão (40 °C durante 1,5 h) uma vez que se verificou alteração do perfil de crescimento bacteriano na presença dos controlos têxteis (**Figura A4, Apêndice III**), assemelhando-se ao perfil na presença de ampicilina (controlo positivo), bem como a um têxtil funcionalizado com atividade antibacteriana. Posteriormente às lavagens, os têxteis foram biocoloridos/ funcionalizados e de seguida sujeitos a 5 ciclos de lavagem numa máquina doméstica a 30 °C durante 1 h com detergente Soflan (**Tabela 13**).

Tabela 13. Análise da densidade ótica final e da atividade antibacteriana (%) após 24 h de crescimento em meio LB a 37 °C e 200 rpm de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 quando em contacto com algodão tingido/funcionalizado com a solução de biocoloração (SB), previamente às lavagens e após 5 ciclos.

	Densidade ótica final		Atividade antibacteriana (%)*	
	Ciclos de lavagem		Ciclos de lavagem	
	0	5	0	5
CO	2,67	4,23	55,95±16,35	44,42±10,40
CO + AP	2,63	4,04	45,92±14,71	46,51±1,84
CO + SB	0,005	2,24	99,97±0,001	78,35±1,94
CO + AP + SB	0,27	2,33	89,06±4,11	93,14±4,47
Controlo de crescimento	5,37			
Ampicilina	0,096		100	

*Atividade antibacteriana expressa a % de redução de células viáveis observada na presença de ampicilina ou de um dado provete, calculada segundo a equação 5.

Neste caso, apesar do controlo de algodão (CO) apresentar atividade antibacteriana elevada e próxima dos 45 %, a D.O. final é próxima do controlo de crescimento (**Tabela 13**). Adicionalmente, a atividade antibacteriana dos controlos têxteis (CO, CO_ptAP) parece manter-se após lavagens.

No que se refere ao teste de solidez para os têxteis funcionalizados, verifica-se, após 5 ciclos de lavagem, que houve incremento de crescimento bacteriano na presença de CO + SB, atingindo-se uma D.O. final superior à D.O. final obtida sem lavagens, consequentemente uma redução na atividade antibacteriana de, aproximadamente, 22 %. Este resultado vem comprovar novamente a já reconhecida limitação dos corantes naturais em termos da sua baixa durabilidade às lavagens. No entanto, comparando com o controlo negativo, a densidade ótica final é inferior e a redução da viabilidade bacteriana é maior ($78,35 \pm 1,94$ %), o que revela ainda alguma funcionalidade.

Por outro lado, relativamente ao têxtil com a solução de biocoloração e o mordente (CO + AP + SB), após 5 ciclos, e comparando com o controlo negativo (CO + AP), a D.O. final obtida é também inferior semelhante à registada na amostra sem mordentagem (CO + SB). No entanto, a atividade antibacteriana é semelhante à registada pela mesma amostra sem lavagens e superior à da amostra CO + SB, após 5 ciclos (**Tabela 13**). Este resultado permite inferir acerca do benefício da utilização do mordente alúmen de potássio na ancoragem da solução de biocoloração com própolis e na durabilidade da funcionalidade têxtil após as lavagens. Apesar desta condição de ensaio utilizar um mordente metálico, permite-nos igualmente obter um algodão biocolorido e funcional de material mais sustentável, uma vez que é produzido com baixo impacto ambiental. Suneeta *et al.* (2020) analisaram as propriedades antibacterianas de substratos têxteis de algodão tingidos com extratos de folhas de nim com o mordente alúmen de potássio e verificaram que os tecidos tratados apresentavam atividade após 5 ciclos de lavagem. Outro estudo realizado por Yusuf *et al.* (2012) analisou as propriedades antibacterianas de substratos têxteis de lã tingidos com *Lawsonia inermis* com e/ou sem alúmen de potássio. Os provetes coloridos apenas com o extrato apresentaram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, contudo, após 5 ciclos de lavagem, esta teve uma redução de, aproximadamente, 50 % da bioatividade inicial. No entanto, quando os autores adicionaram alúmen ao tingimento verificaram menor redução na atividade, como constatado no presente estudo.

Conforme mostrado na análise da cor, aumentar o número de ciclos de lavagem de 1 para 5 resulta numa diminuição no valor de K/s em CO + SB (**Figura 19, Tabela 6**), apresentando uma maior diferença de cor comparativamente à amostra não lavada, bem como uma diminuição da atividade antioxidante e da atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*. Porém, a aplicação do mordente alúmen de potássio no banho permite aumentar a ancoragem entre o corante e o algodão, exibindo o provete CO + AP + SB maior solidez nas lavagens e durabilidade das funcionalidades estudadas.

4. Conclusões e Perspetivas futuras

Este projeto foi desenvolvido com o objetivo de aproveitar e rentabilizar o própolis recolhido na localidade de Gerês, um produto natural que tem vindo a revelar bioatividades de interesse, e consequentemente um potencial de utilização para possíveis aplicações em várias indústrias. No âmbito deste projeto, cujo objetivo principal consistiu na exploração e valorização de novas funcionalidades, foi utilizada uma amostra recolhida em 2019, e testada na biocoloração e funcionalização têxtil.

Numa fase inicial do estudo, e após preparação do extrato etanólico de própolis (G19.EE), realizou-se a sua análise utilizando o método de DPPH e difusão em agar, para a avaliação das propriedades antioxidante e antibacteriana, respetivamente. Desta caracterização concluiu-se que amostra em estudo exibe um forte potencial antioxidante, equivalente ao do própolis do Gerês de 2013. Relativamente à avaliação da atividade antibacteriana, os espectros de atividade de G19.EE são relativamente idênticos aos das amostras recolhidas anualmente desde 2011, apresentando valores de CMI idênticos. A análise destes parâmetros permite constatar que o própolis do Gerês tem exibido um espectro de bioatividades relativamente constante ao longo dos anos.

G19.EE foi então utilizado para preparar uma solução de biocoloração e analisaram-se as atividades antioxidante e antibacteriana da mesma. Os resultados desta solução mostraram-se promissores para a propriedade antioxidante, bem como para a atividade antibacteriana contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Assim, na fase seguinte, procedeu-se à coloração e funcionalização dos substratos têxteis, recorrendo-se à técnica de esgotamento. Com o objetivo de melhorar a ancoragem da solução de biocoloração ao substrato têxtil, este foi submetido a processos de mordentagem (prévia e simultânea) com alúmen de potássio e com ácido tânico, a uma adição de um agente de ligação (glioxal) e a modificações da superfície do têxtil (equipamento de plasma atmosférico e utilização de quitosano).

De uma forma geral, a solução de própolis foi capaz de colorir todos os substratos de algodão, tendo-se obtido tonalidades diferentes consoante o mordente e a modificação de superfície utilizados. Além disso, também se verificou que os provetes biocoloridos apresentaram propriedades antioxidante e antibacterianas.

A malha de algodão colorida/funcionalizada com a solução de biocoloração (CO + SB), a tratada simultaneamente com alúmen de potássio e colorida/ funcionalizada com a solução de biocoloração (CO + AP + SB), a pré-tratada com alúmen de potássio e colorida/ funcionalizada com a solução de biocoloração (CO_ptAP + SB), a tratada simultaneamente com o glioxal e sulfato

de alumínio a 10 g/L e colorida/ funcionalizada com a solução de biocoloração (CO + 1%Gli-1%SA + SB) demonstraram-se as mais interessantes para serem analisadas quanto à solidez da cor e das funcionalidades às lavagens com detergente (Soflan). De uma forma geral, apresentaram, logo após a primeira lavagem, uma diminuição no valor de K/s e, conseqüentemente, uma perda de cor, continuando a diminuir com o aumento dos ciclos de lavagem. Verificou-se ainda que, com o aumento de número de ciclos, os valores de ΔE foram aumentando. Contudo, a amostra CO + AP +SB revelou ser ainda promissora, por se ter observado a obtenção de cores com tonalidades fortes, como também uma solidez da cor e força colorística elevadas, comparativamente ao têxtil tingido unicamente com a solução de biocoloração (CO + SB). Adicionalmente, esta amostra apresentou resultados muito satisfatórios no que diz respeito à durabilidade das atividades antioxidante e antibacteriana, após as lavagens.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi atingido, tendo-se alcançado um substrato têxtil tingido e funcionalizado com própolis (CO + AP + SB) onde se obteve uma cor amarela forte e valores de atividades antioxidante e antibacteriana interessantes, e com solidez à lavagem. Futuramente, e tendo em conta os resultados promissores obtidos ao longo desta investigação, seria interessante explorar novas técnicas e novos conceitos, tais como:

- Otimizar o processo de tingimento, de modo a contornar o problema da heterogeneidade da cor;
- Estudar a solidez das atividades testadas a outros fatores inerentes ao ciclo de vida de um produto têxtil, entre os quais: abrasão, luz solar, suor e secagem na máquina;
- Testar as atividades antioxidante e antibacteriana após a realização de mais ciclos de lavagem;
- Estudar a atividade antibacteriana dos têxteis biocoloridos contra micróbios patogênicos da área da dermatologia, por exemplo causadores da acne (*Propionibacterium acnes*);
- Avaliar a possível atividade dos têxteis biocoloridos contra leveduras e fungos, para além da propriedade antibacteriana;
- Utilizar uma maior diversidade de têxteis, com composições diferentes, explorando a possibilidade de uma maior impregnação e afinidade entre a solução de biocoloração e esses substratos têxteis;
- Explorar a eficácia destes têxteis funcionais *in vivo*, por exemplo, em animais com patologias dermatológicas, recorrendo à colocação de *patches* sobre a pele de voluntários.

Referências Bibliográficas

- Abdullah, N. A., Ja'afar, F., Yasin, H. M., Taha, H., Petalcorin, M. I., Mamit, M. H., Kustini, E., e Usman, A. (2019). Physicochemical analyses, antioxidant, antibacterial, and toxicity of propolis particles produced by stingless bee *Heterotrigona itama* found in Brunei Darussalam. *Heliyon*, 5(9), e02476.
- Abramiuc, D., Ciobanu, L., Muresan, R., Chiosac, M., e Muresan, A. (2013). Antibacterial finishing of cotton fabrics using biologically active natural compounds. *Fibers and Polymers*, 14(11), 1826–1833.
- Acharya, S., Abidi, N., Rajbhandari, R., e Meulewaeter, F. (2014). Chemical cationization of cotton fabric for improved dye uptake. *Cellulose*, 21(6), 4693–4706.
- Adeel, S., Zuber, M., e Zia, K. M. (2018). Microwave-assisted extraction and dyeing of chemical and bio-mordanted cotton fabric using harmal seeds as a source of natural dye. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(11), 11100–11110.
- Adomavičiūtė, E., Pupkevičiūtė, S., Juškaitė, V., Žilius, M., Stanys, S., Pavilonis, A., e Briedis, V. (2017). Formation and investigation of electrospun PLA materials with propolis extracts and silver nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Nanomaterials*, 2017.
- Ahmed, H. M., Ahmed, K. A., Mashaly, H. M., e El-Halwagy, A. A. (2017). Treatment of cotton fabric with dielectric barrier discharge (DBD) plasma and printing with cochineal natural dye. *Indian Journal of Science and Technology*, 10(10), 1–10.
- AL-Ani, I., Zimmermann, S., Reichling, J., e Wink, M. (2018). Antimicrobial activities of European propolis collected from various geographic origins alone and in combination with antibiotics. *Medicines*, 5(1), 2.
- Ali, A., Ali, S., Saleem, H., e Hussain, T. (2010). Effect of tannic acid and metallic mordants on the dyeing properties of natural dye extracted from *Acacia nilotica* bark. *Asian Journal of Chemistry*, 22(9), 7065–7069.
- Ali, S. W., Purwar, R., Joshi, M., e Rajendran, S. (2014). Antibacterial properties of Aloe vera gel-finished cotton fabric. *Cellulose*, 21(3), 2063-2072.
- Alonso, C., Martí, M., Martínez, V., Rubio, L., Parra, J. L., e Coderch, L. (2013). Antioxidant cosmeo-textiles: Skin assessment. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 84(1), 192–199.
- Anjum, S. I., Ullah, A., Khan, K. A., Attaullah, M., Khan, H., Ali, H., e Adgaba, N. (2019). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1695–1703.
- Ayele, M., Tesfaye, T., Alemu, D., Limeneh, M., e Sithole, B. (2020). Natural dyeing of cotton fabric with extracts from mango tree: A step towards sustainable dyeing. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 17, 100293.
- Baaka, N., Mahfoudhi, A., Haddar, W., Mhenni, M. F., e Mighri, Z. (2017). Green dyeing process of modified cotton fibres using natural dyes extracted from *Tamarix aphylla* (L.) Karst. leaves. *Natural Product Research*, 31(1), 22–31.

- Bahadur, N., e Bhargava, N. (2019). Novel pilot scale photocatalytic treatment of textile & dyeing industry wastewater to achieve process water quality and enabling zero liquid discharge. *Journal of Water Process Engineering*, 32, 100934.
- Balla, V. K., Kate, K. H., Satyavolu, J., Singh, P., e Tadimetri, J. G. D. (2019). Additive manufacturing of natural fiber reinforced polymer composites: Processing and prospects. *Engineering*, 174, 106956.
- Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1–2), 114–117.
- Bankova, V., Bertelli, D., Borda, R., Conti, B. J., da Silva, I. B. C., Danert, C., *et al.* (2016). Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research*, 58(2), 1–49.
- Bankova, V. S., de Castro, S. L., e Marcucci, M. C. (2000). Propolis recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3–15.
- Bechtold, T., Turcanu, A., Ganglberger, E., e Geissler, S. (2003). Natural dyes in modern textile dyehouses - How to combine experiences of two centuries to meet the demands of the future? *Journal of Cleaner Production*, 11(5), 499–509.
- Beldean-Galea, M. S., Copaciu, F. M., e Coman, M. V. (2018). Chromatographic analysis of textile dyes. *Journal of AOAC International*, 101(5), 1353–1370.
- Benkhaya, S., M' rabet, S., e El Harfi, A. (2020). A review on classifications, recent synthesis and applications of textile dyes. *Inorganic Chemistry Communications*, 115, 107891.
- Boisard, S., Le Ray, A. M., Aumond, M. C., Blanchard, P., Derbré, S., Flurin, C., e Richomme, P. (2014). Chemical composition, antioxidant and anti-AGEs activities of a French propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(6), 1344–1351.
- Bonvehí, J. S., e Gutiérrez, A. L. (2012). The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1351–1358.
- Borrelli, F., Izzo, A. A., Di Carlo, G., Maffia, P., Russo, A., Maiello, F. M., e Mascolo, N. (2002). Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. *Fitoterapia*, 73, 38–43.
- Boyanova, L., Kolarov, R., Gergova, G., e Mitov, I. (2006). In vitro activity of Bulgarian propolis against 94 clinical isolates of anaerobic bacteria. *Anaerobe*, 12(4), 173–177.
- Broadbent, A. D. (2001). Basic principles of textile coloration. *Color Research & Application*, 1–567.
- Burkinshaw, S. M. (2016). *Physico-chemical Aspects of Textile Coloration*. John Wiley & Sons.
- Carvalho, C., e Santos, G. (2015). Global communities, biotechnology and sustainable design – Natural / bio dyes in textiles. *Procedia Manufacturing*, 3, 6557–6564.
- Carvalho, C., e Santos, G. (2016). Sustainability and biotechnology – Natural or bio dyes resources in textiles. *Journal of Textile Science & Engineering*, 6, 1–5.

- Chakraborty, L., Pandit, P., e Roy Maulik, S. (2020). Acacia auriculiformis - A natural dye used for simultaneous coloration and functional finishing on textiles. *Journal of Cleaner Production*, 245, 118921.
- Chen, J., Long, Y., Han, M., Wang, T., Chen, Q., e Wang, R. (2008). Water-soluble derivative of propolis mitigates scopolamine-induced learning and memory impairment in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 90(3), 441–446.
- Chen, Y. J., Huang, A. C., Chang, H. H., Liao, H. F., Jiang, C. M., Lai, L. Y., Chan, J. T., Chen, Y. Y., e Chiang, J. (2009). Caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, protects peripheral blood mononuclear cells of competitive cyclists against hyperthermal stress. *Journal of Food Science*, 74(6), H162-H167.
- Chen, Y. W., Ye, S. R., Ting, C., e Yu, Y. H. (2018). Antibacterial activity of propolins from Taiwanese green propolis. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(2), 761–768.
- Cortez, R., Luna-Vital, D. A., Margulis, D., e Gonzalez de Mejia, E. (2017). Natural pigments: stabilization methods of anthocyanins for food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 180-198.
- Cruz, M., Antunes, P., Paulo, L., Ferreira, A. M., Cunha, A., Almeida-Aguiar, C., e Oliveira, R. (2016). Antioxidant and dual dose-dependent antigenotoxic and genotoxic properties of an ethanol extract of propolis. *RSC Advances*, 6(55), 49806–49816.
- Cukurel, B., Selcan, C., e Arts, T. (2012). Color theory perception of steady wide band liquid crystal thermometry. *Experimental Thermal and Fluid Science. Elsevier Inc.*, 39, 112–122.
- Cushnie, T. P. T., e Lamb, A. J. (2005a). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343–356.
- Cushnie, T. P. T. e Lamb, A. J. (2005b). Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *Journal of Ethnopharmacology*, 101(1–3), 243–248.
- de Castro, P. A., Savoldi, M., Bonatto, D., Malavazi, I., Goldman, M. H. S., Berretta, A. A., e Goldman, G. H. (2012). Transcriptional profiling of *Saccharomyces cerevisiae* exposed to propolis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 194.
- de Groot, A. C. (2013). Propolis: A review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. *Dermatitis*, 24(6), 263–282.
- Dias, L. G., Pereira, A. P., e Estevinho, L. M. (2012). Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity, *Food and Chemical Toxicology*, 50(12), 4246–4253.
- Direção Geral das Atividades Económicas (DGAE) (2018). Indústria Têxtil e Vestuário. Disponível em: <https://www.dgae.gov.pt/gestao-de-ficheiros-externos-dgae-ano-2019/sinopse-textil-vestuario-17-04-2019-pdf.aspx>.
- Dong, Y., Gu, J., Wang, P., e Wen, H. (2019). Developed functionalization of wool fabric with extracts of *Lycium ruthenicum* Murray and potential application in healthy care textiles. *Dyes and Pigments*, 163, 308–317.

Eid, B. M., e Ibrahim, N. A. (2020). Recent developments in sustainable finishing of cellulosic textiles employing biotechnology. *Journal of Cleaner Production*, 124701.

El-Guendouz, S., Aazza, S., Lyoussi, B., Bankova, V., Popova, M., Neto, L., Faleiro, M.L., e Miguel, M. D. G. (2018). Moroccan propolis: A natural antioxidant, antibacterial, and antibiofilm against *Staphylococcus aureus* with no induction of resistance after continuous exposure. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 1–19.

Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37(4), 277–285.

Falcão, S. I., Tomás, A., Vale, N., Gomes, P., Freire, C., e Vilas-Boas, M. (2013). Phenolic quantification and botanical origin of Portuguese propolis. *Industrial Crops and Products*, 49, 805–812.

Falcão, S. I., Vilas-Boas, M., Estevinho, L. M., Barros, C., Domingues, M. R., e Cardoso, S. M. (2010). Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: Usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(2), 887–897.

Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P., Vilas-Boas, M., e Barros, L. (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*, 100(4), 1511–1516.

Fokt, H., Pereira, A., Ferreira, A. M., Cunha, A., e Aguiar, C. (2010). How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1, 481–4493.

Freitas, A. S., Cunha, A., Cardoso, S. M., Oliveira, R., e Almeida-Aguiar, C. (2019). Constancy of the bioactivities of propolis samples collected on the same apiary over four years. *Food Research International*, 119, 622–633.

Freitas, A. S. P. (2015). Evaluation of bioactivities of a propolis sample (Gerês) of Portuguese origin. Tese de Mestrado em Genética Molecular. Universidade do Minho.

Gao, Y., e Cranston, R. (2008). Recent advances in antimicrobial treatments of textiles. *Textile Research Journal*, 78(1), 60–72.

Gargoubi, S., Tolouei, R., Chevallier, P., Levesque, L., Ladhari, N., Boudokhane, C., e Mantovani, D. (2016). Enhancing the functionality of cotton fabric by physical and chemical pre-treatments: A comparative study. *Carbohydrate Polymers*, 147, 28–36.

Gomes, A. J. P. (2019). Avaliação e caracterização de propriedades antifúngicas e antioxidantes de própolis portugueses. Tese de Mestrado em Bioquímica Aplicada. Universidade do Minho.

Gonçalves, R. B. (2017). Desenvolvimento de extratos de própolis português visando diferentes aplicações: o caso da aplicação oral. Tese de Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e Bioempreendedorismo em Plantas. Universidade do Minho.

Gorjanc, M., Mozetič, M., e Vesel, A. (2018). Natural dyeing and UV protection of plasma treated cotton. *The European Physical Journal D*, 72(3), 1-6.

Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, 1-65.

- Gupta, D., e Haile, A. (2007). Multifunctional properties of cotton fabric treated with chitosan and carboxymethyl chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 69(1), 164–171.
- Gürses, A. (2019). Sustainable colorants. *In the Impact and Prospects of Green Chemistry for Textile Technology*, 21-55. Woodhead Publishing.
- Haddar, W., Elksibi, I., Meksi, N., e Mhenni, M. F., (2014). Valorization of the leaves of fennel (*Foeniculum vulgare*) as natural dyes fixed on modified cotton: A dyeing process optimization based on a response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 52, 588–596.
- Haji, A. (2013). Eco-friendly dyeing and antibacterial treatment of cotton. *Cellulose Chemistry and Technology*, 47(3–4), 303–308.
- Haji, A. (2017). Improved natural dyeing of cotton by plasma treatment and chitosan coating; optimization by response surface methodology. *Cellulose Chemistry and Technology*, 51(9-10), 975-982.
- Haji, A., e Naebe, M. (2020). Cleaner dyeing of textiles using plasma treatment and natural dyes: A review. *Journal of Cleaner Production*, 121866.
- Haji, A., Qavamnia, S. S., e Bizhaem, F. K. (2016). Salt free neutral dyeing of cotton with anionic dyes using plasma and chitosan treatments. *Industrial Textiles*, 67, 109-113.
- Hoenich, N. A. (2006). Cellulose for medical applications: past, present, and future. *BioResources*, 1(2), 270-280.
- Hong, K. H., Bae, J. H., Jin, S. R., e Yang, J. S. (2012). Preparation and properties of multi-functionalized cotton fabrics treated by extracts of gromwell and gallnut. *Cellulose*, 19(2), 507–515.
- Hou, X., Chen, X., Cheng, Y., Xu, H., Chen, L., e Yang, Y. (2013). Dyeing and UV-protection properties of water extracts from orange peel. *Journal of Cleaner Production*, 52, 410–419.
- Hu, C., Mei, H., Guo, H., e Zhu, J. (2020). Color analysis of textile fibers by microspectrophotometry. *Forensic Chemistry*, 100221.
- Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G. Q., e Hu, F. L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 19(12), 19610–19632.
- Hussain, T., e Wahab, A. (2018). A critical review of the current water conservation practices in textile wet processing. *Journal of Cleaner Production*, 198, 806–819.
- Ibrahim, N. A., Eid, B. M., Youssef, M. A., El-Sayed, S. A., e Salah, A. M. (2012). Functionalization of cellulose-containing fabrics by plasma and subsequent metal salt treatments. *Carbohydrate Polymers*, 90(2), 908–914.
- Ibrahim, N. A., El-Gamal, A. R., Gouda, M., e Mahrous, F. (2010). A new approach for natural dyeing and functional finishing of cotton cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 82(4), 1205–1211.
- Ibrahim, N. A., El-Zairy, E. M. R., e Eid, B. M. (2017). Eco-friendly modification and antibacterial functionalization of viscose fabric. *Journal of the Textile Institute*, 108(8), 1406–1411.
- Jawad, A. H., Norrahma, S. S. A., Hameed, B. H., e Ismail, K. (2019). Chitosan-glyoxal film as a superior adsorbent for two structurally different reactive and acid dyes: Adsorption and mechanism study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 569-581.

- Joshi, M., Ali, S. W., Purwar, R., e Rajendran, S. (2009). Ecofriendly antimicrobial finishing of textiles using bioactive agents based on natural products. *Indian Journal of Fibre and Textile Research*, 34(3), 295–304.
- Juntarapun, K., e Satirapipathkul, C. (2012). Antimicrobial activity of chitosan and tannic acid on cotton fabrious materials. *RMUTP International Conference, Bangkok Thailand*, 1–6.
- Kamel, M. M., El Zawahry, M. M., Helmy, H., e Eid, M. A. (2011). Improvements in the dyeability of polyester fabrics by atmospheric pressure oxygen plasma treatment. *The Journal of the Textile Institute*, 102(3), 220–231.
- Karamian, R., e Ghasemlou, F. (2013). Screening of total phenol and flavonoid content, antioxidant and antibacterial activities of the methanolic extracts of three Silene species from Iran. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 5(3), 305–312.
- Karolia, A., e Mendapara, S. (2007). Imparting antimicrobial and fragrance finish on cotton using chitosan with silicon softener. *Indian Journal of Fibre and Textile Research*, 32(1), 99–104.
- Khurshid, M. F., Ayyoob, M., Asad, M., e Shah, S. N. H. (2015). Assessment of eco-friendly natural antimicrobial textile finish extracted from aloe vera and neem plants. *Fibres and Textiles in Eastern Europe*, 23(6), 120–123.
- Khurshid, Z., Naseem, M., Zafar, M. S., Najeeb, S., e Zohaib, S. (2017). Propolis: A natural biomaterial for dental and oral health care. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*, 11(4), 265–274.
- King, J. A. (2017). Colour in fashion design. *In Colour Design*, 299-315. Woodhead Publishing.
- Koh, E., e Hong, K. H. (2014). Gallnut extract-treated wool and cotton for developing green functional textiles. *Dyes and Pigments*, 103, 222–227.
- Koh, E., e Hong, K. H. (2017). Functional fabric treatment using tannic acid and extract from purple-fleshed sweet potato. *Textile Research Journal*, 87(7), 790–798.
- Kubiliene, L., Laugaliene, V., Pavilonis, A., Maruska, A., Majiene, D., Barcauskaite, K., Kubilius, R., kasparaviciene, G., e Savickas, A. (2015). Alternative preparation of propolis extracts: Comparison of their composition and biological activities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 1–7.
- Kumar, A., e Konar, A. (2011). Dyeing of Textiles with Natural Dyes. *Natural Dyes*.
- Kumar, M. N. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), 1–27.
- Kundal, J., Singh, S. V., e Purohit, M. C. (2016). Extraction of natural dye from *Ficus cunia* and dyeing of polyester cotton and wool fabric using different mordants, with evaluation of colour fastness properties. *Natural Products Chemistry & Research*, 4, 214.
- Lee, Y. H., Hwang, E. K., e Kim, H. D. (2009). Colorimetric assay and antibacterial activity of cotton, silk, and wool fabrics dyed with peony, pomegranate, clove, coptis chinensis and gallnut extracts. *Materials*, 2(1), 10–21.
- Lellis, B., Fávaro-Polonio, C. Z., Pamphile, J. A., e Polonio, J. C. (2019). Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. *Biotechnology Research and Innovation*, 3(2), 275–290.

- Li, Y. D., Guan, J. P., Tang, R. C., e Qiao, Y. F. (2019). Application of natural flavonoids to impart antioxidant and antibacterial activities to polyamide fiber for health care applications. *Antioxidants*, 8(8), 301.
- Liew, O. W., Chong, P. C. J., Li, B., e Asundi, A. K. (2008). Signature optical cues: emerging technologies for monitoring plant health. *Sensors*, 8(5), 3205-3239.
- Mahlting, B., Haufe, H., e Böttcher, H. (2005). Functionalisation of textiles by inorganic sol-gel coatings. *Journal of Materials Chemistry*, 15(41), 4385–4398.
- Manhita, A., Ferreira, V., Vargas, H., Ribeiro, I., Candeias, A., Teixeira, D., Ferreira, T., e Dias, C. B. (2011). Enlightening the influence of mordant, dyeing technique and photodegradation on the colour hue of textiles dyed with madder - A chromatographic and spectrometric approach. *Microchemical*, 98(1), 82–90.
- Mašek, T., Perin, N., Racané, L., Cindric, M., Paljetak, H. C., Peric, M., e Starcevic, K. (2018). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activity of different extracts of poplar type propolis. *Croatica Chemica Acta*, 91(1), 81–88.
- Mello, B. C. B. S., Petrus, J. C. C., e Hubinger, M. D. (2010). Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. *Journal of Food Engineering*, 96(4), 533–539.
- Miguel, M. G., Nunes, S., Dandlen, S. A., Cavaco, A. M., e Antunes, M. D. (2010). Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12), 3418–3423.
- Mitra, K., e Uddin, N. (2014). Total phenolics, flavonoids, proanthocyanidins, ascorbic acid contents and *in-vitro* antioxidant activities of newly developed isolated soya protein. *Discourse Journal of Agriculture and Food Sciences*, 2(5), 160–168.
- Monier, M., e Abdel-Latif, D. A. (2013). Modification and characterization of PET fibers for fast removal of Hg (II), Cu (II) and Co (II) metal ions from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials*, 250, 122-130.
- Moreira, L., Dias, L.G., Pereira, J.A., e Estevinho, L. (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 46(11), 3482–3485.
- Moura, S. A. L. D., Negri, G., Salatino, A., Lima, L. D. D. C., Dourado, L. P. A., Mendes, J. B., Andrade, S. P. Ferreira, M. A. N. D., e Cara, D. C. (2011). Aqueous extract of Brazilian green propolis: Primary components, evaluation of inflammation and wound healing by using subcutaneous implanted sponges. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1–8.
- Munoz, V., Gonzalez, J. S., Martinez, M. A., e Alvarez, V. A. (2017). Functional textiles for skin care by active substance encapsulation. *Journal of Textile Engineering & Fashion Technology*, 2(6), 538–545.
- Murugesh Babu, K., e Ravindra, K. B. (2015). Bioactive antimicrobial agents for finishing of textiles for health care products. *The Journal of The Textile Institute*, 106(7), 706-717.

- Nobre, C. G. (2018). Utilização de produtos naturais na coloração e funcionalização de têxteis. Tese de Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e Bioempreendedorismo em Plantas. Universidade do Minho.
- Nunes, L. J. R., Matias, J. C. O., e Catalão, J. P. S. (2015). Analysis of the use of biomass as an energy alternative for the Portuguese textile dyeing industry. *Energy*, 84, 503–508.
- Oliveira, A. V., Ferreira, A. L., Nunes, S., Dandlen, S. A., Miguel, M. D. G., e Faleiro, M. L. (2017). Antibacterial activity of propolis extracts from the south of Portugal. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(1).
- Oryan, A., Alemzadeh, E., e Moshiri, A. (2018). Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 98, 469–483.
- Pan, H., Zhao, T., Xu, L., Shen, Y., Wang, L., e Ding, Y. (2019). Preparation of novel chitosan derivatives and applications in functional finishing of textiles. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- Pan, Y., Yang, X., Xu, M., e Sun, G. (2017). Preparation of mud-coated silk fabrics with antioxidant and antibacterial properties. *Materials Letters*, 191, 10–13.
- Pannala, A. S., Chan, T. S., O'Brien, P. J., e Rice-Evans, C. A. (2001). Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282(5), 1161–1168.
- Park, Y. K., Ikegaki, M., Abreu, J. A. D. S., e Alcici, N. M. F. (1998). Study of the preparation of propolis extracts and its applications. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 18(3), 313–318.
- Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., e Gan, S. H. (2017). Honey, propolis, and royal jelly: A comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017.
- Patel, B. H. (2011). Natural dyes. *Handbook of Textile and Industrial Dyeing*, 395–424.
- Patino, A., Canal, C., Rodríguez, C., Caballero, G., Navarro, A., e Canal, J. M. (2011). Surface and bulk cotton fibre modifications: plasma and cationization. Influence on dyeing with reactive dye. *Cellulose*, 18(4), 1073–1083.
- Pensupa, N., Leu, S. Y., Hu, Y., Du, C., Liu, H., Jing, H., e Lin, C. S. K. (2017). Recent trends in sustainable textile waste recycling methods: current situation and future prospects. *Topics in Current Chemistry*, 375(5), 1–40.
- Pereira, A. D. S., Seixas, F. R. M. S., e Aquino Neto, F. R. D. (2002). Própolis: 100 Anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*, 25(2), 321–326.
- Pisitsak, P., Hutakamol, J., Thongcharoen, R., Phokaew, P., Kanjanawan, K., e Saksaeng, N. (2016). Improving the dyeability of cotton with tannin-rich natural dye through pretreatment with whey protein isolate. *Industrial Crops and Products*, 79, 47–56.
- Pobiega, K., Kraśniewska, K., e Gniewosz, M. (2019). Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review. *Trends in Food Science and Technology*, 83, 53–62.

- Prysiashnyi, V., Kramar, A., Dojcinovic, B., Zekic, A., Obradovic, B. M., Kuraica, M. M., e Kostic, M. (2013). Silver incorporation on viscose and cotton fibers after air, nitrogen and oxygen DBD plasma pretreatment. *Cellulose*, 20(1), 315–325.
- Purwar, R. (2019). Antimicrobial textiles. In *the Impact and Prospects of Green Chemistry for Textile Technology*, 281-306. Woodhead Publishing.
- Rahman, M. M., Richardson, A., e Sofian-Azirun, M. (2010). Antibacterial activity of propolis and honey against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *African Journal of Microbiology Research*, 4(18), 1872–1878.
- Ramanauskienė, K., Inkenienė, A. M., Savickas, A., Masteikova, R., e Brusokas, V. (2009). Analysis of the antimicrobial activity of propolis and lysozyme in semisolid emulsion systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 66(6), 681–688.
- Ramos, A. F. N., e Miranda, J. L. (2007). Propolis: A review of its anti-inflammatory and healing actions. *Review Literature And Arts Of The Americas*, 13(4), 697–710.
- Rani, K. V, Sarma, B., e Sarma, A. (2018). Plasma treatment on cotton fabrics to enhance the adhesion of reduced graphene oxide for electro-conductive properties. *Diamond and Related Materials*, 84, 77–85.
- Rather, L. J., Akhter, S., Padder, R. A., Hassan, Q. P., Hussain, M., Khan, M. A., e Mohammad, F. (2017). Colorful and semi durable antioxidant finish of woolen yarn with tannin rich extract of *Acacia nilotica* natural dye. *Dyes and Pigments*, 139, 812–819.
- Ratnapandian, S. (2013). Application of natural dyes by padding technique on textiles. *School of Fashion and Textiles Design and Social Context Portfolio RMIT University*, 1–120.
- Rattanaphani, S., Chairat, M., Bremner, J. B., e Rattanaphani, V. (2007). An adsorption and thermodynamic study of lac dyeing on cotton pretreated with chitosan. *Dyes and Pigments*, 72(1), 88–96.
- Ristić, T., Zemljič, L. F., Novak, M., Kunčič, M. K., Sonjak, S., Cimerman, N. G., e Strnad, S. (2011). Antimicrobial efficiency of functionalized cellulose fibres as potential medical textiles. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 6, 36–51.
- Roh, J., e Kim, K. R. (2018). Antimicrobial activity of Korean propolis extracts on oral pathogenic microorganisms. *Journal of Dental Hygiene Science*, 18(1), 18–23.
- Rossi, T., Silva, P. M. D. S., De Moura, L. F., Araújo, M. D. C., Brito, J. O., e Freeman, H. S. (2017). Waste from eucalyptus wood steaming as a natural dye source for textile fibers. *Journal of Cleaner Production*, 143, 303–310.
- Sadeghi-Kiakhani, M., Gharanjig, K., e Arami, M. (2015). Grafting of prepared chitosan-poly(propylene) imines dendrimer hybrid as a biopolymer onto cotton and its antimicrobial property. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 28, 78–85.
- Samsami, S., Mohamadi, M., Sarrafzadeh, M. H., Rene, E. R., e Firoozbahr, M. (2020). Recent advances in the treatment of dye-containing wastewater from textile industries: Overview and perspectives. *Process Safety and Environmental Protection*, 143, 138-163.
- Sathianarayanan, M. P., Bhat, N. V., Kokate, S. S., e Walunj, V. E. (2010). Antibacterial finish for

- cotton fabric from herbal products. *Indian Journal of Fibre and Textile Research*, 35(1), 50–58.
- Saxena, S., e Raja, A. S. M. (2015). Natural dyes: sources, chemistry, application and sustainability issues. *In Roadmap to Sustainable Textiles and Clothing*, 37-80. Springer, Singapore.
- Sebaugh, J. L. (2011). Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical Statistics*, 10(2), 128–134.
- Selvaraj, V., Karthika, T. S., Mansiya, C., e Alagar, M. (2020). An over review on recently developed techniques, mechanisms and intermediate involved in the advanced azo dye degradation for industrial applications. *Journal of Molecular Structure*, 129195.
- Sforcin, J. M. (2007). Propolis and the immune system: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(1), 1–14.
- Sforcin, J. M., e Bankova, V. (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 253–260.
- Sforcin, J. M., Fernandes Jr, A., Lopes, C. A. M., Bankova, V., e Funari, S. R. C. (2000). Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(1–2), 243–249.
- Shabbir, M., Rather, L. J., e Mohammad, F. (2018). Economically viable UV-protective and antioxidant finishing of wool fabric dyed with *Tagetes erecta* flower extract: Valorization of marigold. *Industrial Crops and Products*, 119, 277-282.
- Shahid, M., Shahid-UI-Islam e Mohammad, F. (2013). Recent advancements in natural dye applications: A review. *Journal of Cleaner Production*, 53, 310–331.
- Shahid, M., Zhou, Y., Tang, R. C., Chen, G., e Wani, W. A. (2017). Colourful and antioxidant silk with chlorogenic acid: Process development and optimization by central composite design. *Dyes and Pigments*, 138, 30–38.
- Shahidi, S., Wiener, J., e Ghoranneviss, M. (2013). Surface modification methods for improving the chemical modification of fabrics. *Eco-Friendly Textile Dyeing and Finishing*, 34–50.
- Shahid-ul-Islam, Butola, B. S., e Roy, A. (2018). Chitosan polysaccharide as a renewable functional agent to develop antibacterial, antioxidant activity and colourful shades on wool dyed with tea extract polyphenols. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1999–2006.
- Shanmugam, L., Naikawadi, V. B., Ahire, M. L., e Nikam, T. D. (2018). Decolorization and detoxification of reactive azo dyes using cell cultures of a memory tonic herb *Evolvulus alsinoides* L. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(5), 6479-6488.
- Sharaf, S., Higazy, A., e Hebeish, A. (2013). Propolis induced antibacterial activity and other technical properties of cotton textiles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 408–416.
- Sheng, J., Zhou, J., Wang, L., Xu, J., e Hu, Q. (2007). Antioxidant activity of ethanol and petroleum ether extracts from Brazilian propolis. *European Food Research and Technology*, 225(2), 249–253.
- Silva, J. C., Rodrigues, S., Feás, X., e Estevinho, L. M. (2012). Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5), 1790–1795.

- Silva, M. G., de Barros, M. A. S., de Almeida, R. T. R., Pilau, E. J., Pinto, E., Soares, G., e Santos, J. G. (2018). Cleaner production of antimicrobial and anti-UV cotton materials through dyeing with eucalyptus leaves extract. *Journal of Cleaner Production*, 199, 807–816.
- Silva-Carvalho, R., Baltazar, F., e Almeida-Aguiar, C. (2015). Propolis: A complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1–29.
- Silva-Carvalho, R., Miranda-Gonçalves, V., Ferreira, A. M., Cardoso, S. M., Sobral, A. J., Almeida-Aguiar, C., e Baltazar, F. (2014). Antitumoural and antiangiogenic activity of Portuguese propolis in *in vitro* and *in vivo* models. *Journal of Functional Foods*, 11, 160–171.
- Simoncic, B., e Tomsic, B. (2010). Structures of novel antimicrobial agents for textiles - A review. *Textile Research Journal*, 80(16), 1721–1737.
- Sinclair, R. (2014). Textiles and fashion materials, design and technology. *Elsevier*.
- Singh, R., Jain, A., Panwar, S., Gupta, D., e Khare, S. K. (2005). Antimicrobial activity of some natural dyes. *Dyes and Pigments*, 66(2), 99–102.
- Sinha, K., Aikat, K., Das, P., e Datta, S. (2016). Dyeing of modified cotton fiber with natural Terminalia arjuna dye: Optimization of dyeing parameters using response surface methodology. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 35(3), 719–728.
- Sinha, K., Saha, P. D., e Datta, S. (2012). Extraction of natural dye from petals of Flame of forest (Butea monosperma) flower: Process optimization using response surface methodology (RSM). *Dyes and Pigments*, 94(2), 212–216.
- Siva, R. (2007). Status of natural dyes and dye-yielding plants in India. *Current Science*, 916-925.
- Son, Y.-A., Kim, B.-S., Ravikumar, K., e Kim, T.-K. (2007). Berberine finishing for developing antimicrobial nylon 66 fibers: % Exhaustion, colorimetric analysis, antimicrobial study, and empirical modeling. *Journal of Applied Polymer Science*, 103(2), 1175–1182.
- Suneeta, Harlapur, S., e Harlapur, S. F. (2020). Enhancement of antibacterial properties of cotton fabric by using neem leaves extract as dye. *Materials Today: Proceedings*, 1016–1019.
- Tabasum, B., Dhagale, P. R., Nitnaware, K. M., Nikule, H. A., e Nikam, T. D. (2019). New chemical products formation from textile dye degradation, chitinolytic and antioxidant activity in new strain nbpc5–18 of *Cellulosimicrobium* sp. TH-20. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(3), 103114.
- Tang, C. Y., Yu, P., Tang, L. S., Wang, Q. Y., Bao, R. Y., Liu, Z. Y., e Yang, W. (2018). Tannic acid functionalized graphene hydrogel for organic dye adsorption. *Ecotoxicology and environmental safety*, 165, 299-306.
- Tayel, A. A., Moussa, S. H., Wael, F., Elguindy, N. M., e Opwis, K. (2011). Antimicrobial textile treated with chitosan from Aspergillus niger mycelial waste. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(2), 241-245.
- Thilagavathi, G., e Kannaian, T. (2008). Application of Prickly chaff (Achyranthes aspera Linn.) leaves as herbal antimicrobial finish for cotton fabric used in healthcare textiles. *Natural Product Radiance*, 7(4), 330–334.

- Ticha, M. B., Haddar, W., Meksi, N., Guesmi, A., e Mhenni, M. F. (2016) Improving dyeability of modified cotton fabrics by the natural aqueous extract from red cabbage using ultrasonic energy. *Carbohydrate Polymers*, 154, 287–295.
- Tiwari, B. K., Valdramidis, V. P., O'Donnell, C. P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., e Cullen, P. J. (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 5987–6000.
- Tsatsaroni, E., Liakopoulou-Kyriakides, M., e Eleftheriadis, I. (1998). Comparative study of dyeing properties of two yellow natural pigments - Effect of enzymes and proteins. *Dyes and Pigments*, 37(4), 307–315.
- Uzel, A., Önçağ, Ö., Çoğulu, D., e Gençay, Ö. (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research*, 160(2), 189–195.
- Vankar, P. S., e Shanker, R. (2008). Ecofriendly ultrasonic natural dyeing of cotton fabric with enzyme pretreatments. *Desalination*, 230(1–3), 62–69.
- Wang, Y., Yin, M., Li, Z., Liu, Y., Ren, X., e Huang, T. S. (2018). Preparation of antimicrobial and hemostatic cotton with modified mesoporous particles for biomedical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 165, 199–206.
- Yaman, N., Özdoğan, E., Seventekin, N., e Ayhan, H. (2009). Plasma treatment of polypropylene fabric for improved dyeability with soluble textile dyestuff. *Applied Surface Science*, 255(15), 6764–6770.
- Ye, W., Leung, M. F., Xin, J., Kwong, T. L., Lee, D. K. L., e Li, P. (2005). Novel core-shell particles with poly(n-butyl acrylate) cores and chitosan shells as an antibacterial coating for textiles. *Polymer*, 46(23), 10538–10543.
- Yi, E., e Cho, J. Y. (2008). Color analysis of natural colorant-dyed fabrics. *Color Research and Application*, 33(2), 148–157.
- Yusuf, M., Ahmad, A., Shahid, M., Khan, M. I., Khan, S. A., Manzoor, N., e Mohammad, F. (2012). Assessment of colorimetric, antibacterial and antifungal properties of woollen yarn dyed with the extract of the leaves of henna (*Lawsonia inermis*). *Journal of Cleaner Production*, 27, 42–50.
- Yusuf, M., Shahid-ul-Islam, Khan, M. A., e Mohammad, F. (2016). Investigations of the colourimetric and fastness properties of wool dyed with colorants extracted from Indian madder using reflectance spectroscopy. *Optik*, 127(15), 6087–6093.
- Zanini, S., Citterio, A., Leonardi, G., e Riccardi, C. (2018). Characterization of atmospheric pressure plasma treated wool/cashmere textiles: Treatment in nitrogen. *Applied Surface Science*, 427, 90–96.
- Zemljič, L. F., Volmajer, J., Ristić, T., Bracic, M., Sauperl, O., e Kreže, T. (2014). Antimicrobial and antioxidant functionalization of viscose fabric using chitosan–curcumin formulations. *Textile Research Journal*, 84(8), 819–830.
- Zerin, I., Farzana, N., Muhammad Sayem, A., Anang, D. M., e Haider, J. (2019). Potentials of natural dyes for textile applications. *Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials*.

- Zhang, Q., Wang, N., Zhao, L., Xu, T., e Cheng, Y. (2013). Polyamidoamine dendronized hollow fiber membranes in the recovery of heavy metal ions. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5(6), 1907-1912.
- Zhang, W., Yang, Z. Y., Cheng, X. W., Tang, R. C., e Qiao, Y. F. (2019). Adsorption, antibacterial and antioxidant properties of tannic acid on silk fiber. *Polymers*, 11(6), 970.
- Zhou, C. E., e Kan, C. W. (2013). Review of antibacterial finishing processes with plasma for cotton. *Research Journal of Textile & Apparel*, 17(4), 12-24.
- Zhou, Q., Rather, L. J., Ali, A., Wang, W., Zhang, Y., Haque, Q. M. R., e Li, Q. (2020). Environmental friendly bioactive finishing of wool textiles using the tannin-rich extracts of Chinese tallow (*Sapium sebiferum* L.) waste/fallen leaves. *Dyes and Pigments*, 176, 108230.
- Zhou, Y., Zhang, J., Tang, R. C., e Zhang, J. (2015). Simultaneous dyeing and functionalization of silk with three natural yellow dyes. *Industrial Crops and Products*, 64(1), 224–232.
- Zille, A., Oliveira, F. R., e Souto, A. P. (2015). Plasma treatment in textile industry. *Plasma Processes and Polymers*, 12(2), 98–131.

Apêndices

Apêndice I

Na figura que se segue, a reta representa a absorvância do ácido gálico em função da concentração. Este estudo foi feito com o objetivo de se utilizar este composto como padrão para os ensaios da atividade antioxidante do extrato G19.EE, descritos na secção 2.4.1.1.

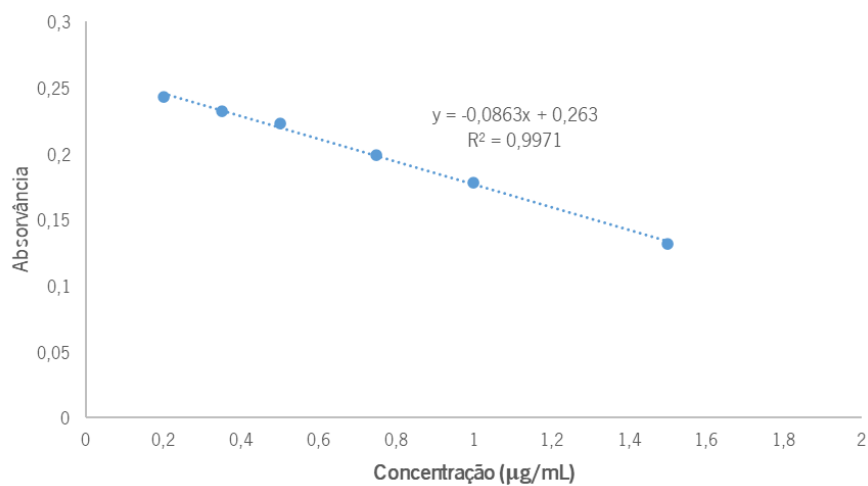


Figura A1. Percentagem de redução de DPPH • ($\lambda = 517$ nm) em função da concentração de ácido gálico.

Apêndice II

O gráfico representado na **Figura A2** apresenta o espectro obtido na preparação da solução de trabalho de ABTS, de modo a verificar qual o pico máximo entre 700 nm e 800 nm e a absorvância correspondente.

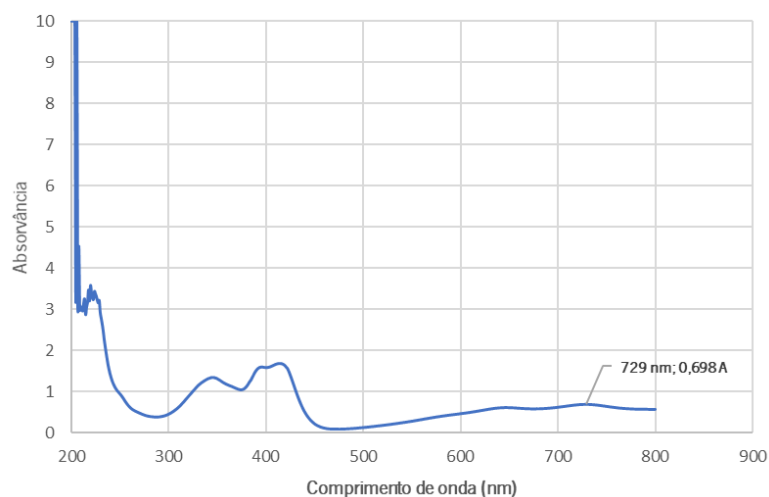


Figura A2. Scan da solução de trabalho de ABTS realizado no UV-Vis.

Na **Figura A3** a reta representa a absorvância de uma solução de L-cisteína em função da concentração, estudo realizado para selecionar a concentração ideal a utilizar no controlo positivo dos ensaios da atividade antioxidante pelo método de ABTS.

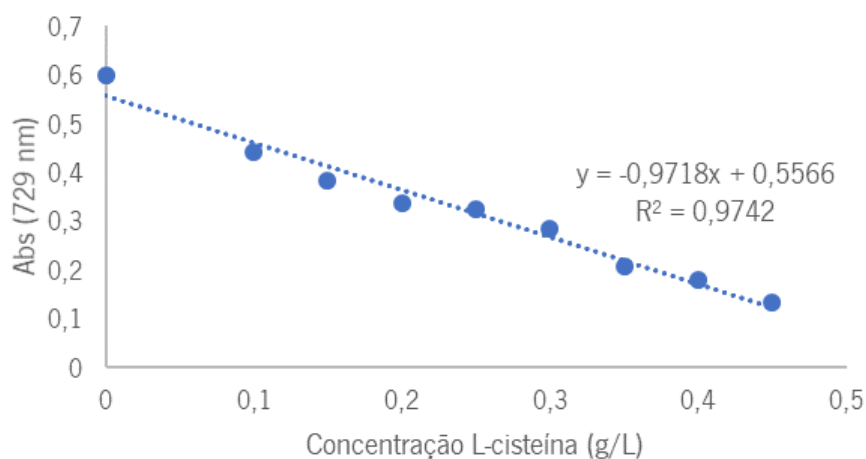


Figura A3. Reta de calibração com L-cisteína, o composto padrão utilizado na avaliação da atividade antioxidante pelo método de ABTS.

Apêndice III

O gráfico apresenta os perfis de crescimento de *Staphylococcus aureus* quando os têxteis de controlo do novo ensaio foram comparados com a malha de algodão do rastreio. Este estudo foi feito com o objetivo de verificar a atividade antimicrobiana do algodão, mostrando simultaneamente a heterogeneidade entre lotes de malha.

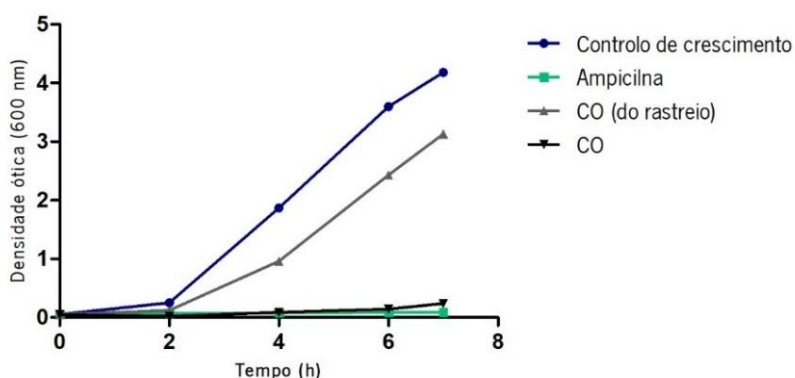


Figura A4. Curva de crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com a malha de algodão usada no rastreio inicial (CO do rastreio) e uma nova malha de algodão utilizada nos últimos ensaios (CO). Os têxteis foram colocados numa cultura bacteriana em meio LB com uma D.O.₆₀₀ inicial de 0,05, sendo a incubação a 37 °C e 200 rpm. A D.O.₆₀₀ foi medida periodicamente ao longo de 6,5 horas.

O gráfico apresenta os perfis de crescimento para *Staphylococcus aureus* quando os têxteis de controlo (CO da **Figura A4**) foram submetidos a uma lavagem com água ou com o detergente padrão. Este estudo foi feito com o objetivo de verificar se a lavagem com o detergente permitiria retirar algum composto que estivesse a influenciar a atividade antibacteriana do algodão (CO).

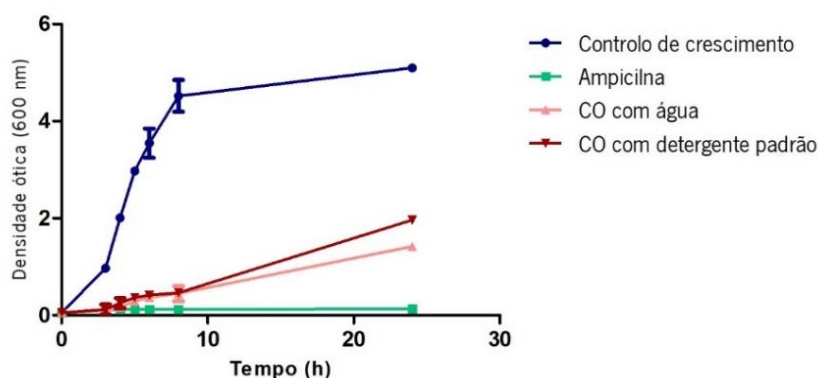


Figura A5. Curva de crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contacto com a nova malha de algodão após lavagem com água e com detergente padrão. Os têxteis foram colocados numa cultura bacteriana em meio LB com uma D.O.₆₀₀ inicial de 0,05, sendo a incubação a 37 °C e 200 rpm. A D.O.₆₀₀ foi medida periodicamente ao longo de 6,5 horas. Apresentam-se os valores médios de duas réplicas efetuadas, para cada ponto, e respetivo desvio padrão.

Anexos

Anexo I

As tabelas seguintes apresentam as atividades antioxidante (**Tabela A1**) e antibacteriana (**Tabela A2**) de extratos etanólicos preparados com amostras de própolis do Gerês recolhidas em anos anteriores à data da amostra utilizada no presente trabalho.

Tabela A1. Capacidade de captura do radical livre DPPH•, apresentada em valores de IC₅₀ (µg/ mL), dos extratos etanólicos preparados com amostras de própolis do Gerês (G.EEs) recolhidas entre 2011 a 2016, 2018 e 2019. Os valores são apresentados na forma de média ± desvio padrão. Realizou-se o teste *One-way* ANOVA (letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste *Tukey* ($p \leq 0,05$)).

Extratos etanólicos de Própolis	IC50 (µg/mL)	Referência
G11.EE	17,77±0,78 ^a	Freitas <i>et al.</i> (2019)
G12.EE	14,41±0,56 ^b	
G13.EE	25,24±2,45 ^c	
G14.EE	16,46±0,75 ^{a, b}	
G15.EE	10,70±0,69 ^d	(Gonçalves, 2017)
G16.EE	5,46±0,35 ^e	Freitas A., comunicação pessoal
G18.EE	10,78±0,48 ^d	
G19.EE	24,29±0,07 ^c	Este projeto

Tabela A2. Atividade antibacteriana dos extratos etanólicos preparados com amostras de própolis do Gerês recolhidas entre 2011 e 2016, 2018 e 2019. A atividade antibacteriana foi expressa em valores de CMI ($\mu\text{g/mL}$).

Bactéria	CMI ($\mu\text{g/mL}$)							
Gram-positiva	G11.EE	G12.EE	G13.EE	G14.EE	G15.EE	G16.EE	G18.EE	G19.EE
<i>Bacillus megaterium</i>	50	50	50	50	50	50	50	100
<i>Bacillus subtilis</i>	50	50	50	50	50	50	50	100
<i>Bacillus cereus</i>	50	50	50	50	50	50	50	100
<i>Propionibacterium acnes</i>	X	X	X	X	50	100	500	500
Methicillin susceptible <i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA)	200	200	200	200	750	750	500	500
Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>1000	>2000	>2000
Gram-negativa								
<i>Escherichia coli</i>	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>1000	>2000	>2000
Referência	(Freitas <i>et al.</i> , 2019)				(Gonçalves, 2017)	Freitas A., comunicação pessoal		Este projeto

