

MSc

2.º
CICLO

FCUP
ICBAS
2020



Absorção, estabilidade e bioatividade de novos
derivados antociânicos para aplicação nas
indústrias cosmética e têxtil

Carolina da Silva Ribeiro



Absorção, estabilidade e bioatividade de novos derivados antociânicos para aplicação nas indústrias cosmética e têxtil

Carolina da Silva Ribeiro
Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e ao Instituto de
Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto
Bioquímica

2020





Absorção, estabilidade e bioatividade de novos derivados antociânicos para aplicação nas indústrias cosmética e têxtil

Carolina da Silva Ribeiro

Mestrado em Bioquímica

Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto
2020

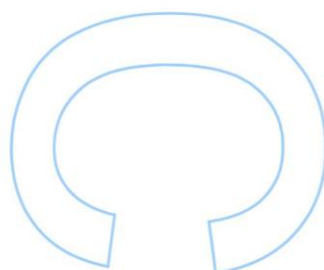
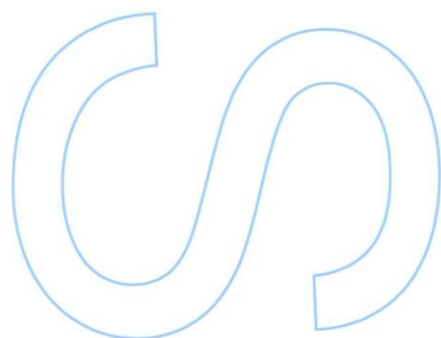
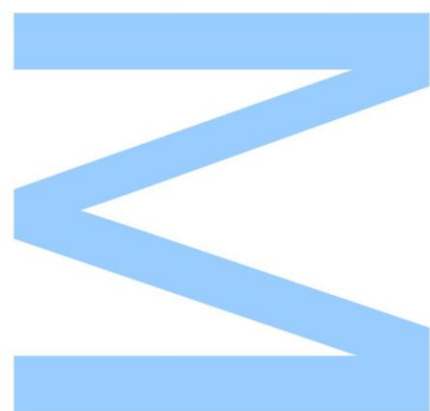
Orientador

Doutora Iva Fernandes, Professora Auxiliar Convidada,
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Coorientadores

Doutora Clara Pereira, Professora Auxiliar Convidada,
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Professor Doutor Nuno Mateus, Professor Associado,
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto



U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

U. PORTO

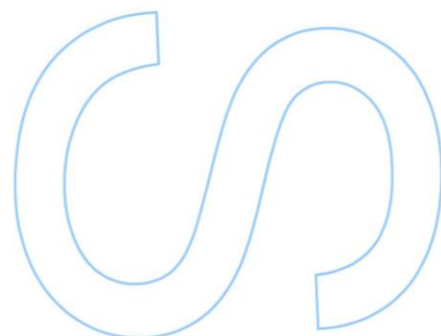
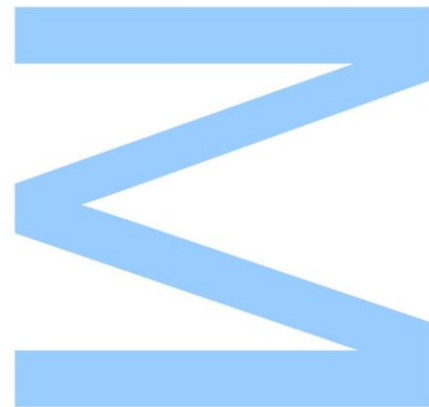


FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____ / ____ / ____





FCT

Fundação para a Ciência e a Tecnologia



UNIÃO EUROPEIA

Fundo Europeu de
Desenvolvimento Regional

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado graças ao apoio do Laboratório Associado para a Química Verde (LAQV) da Rede de Química e Tecnologia (REQUIMTE), no âmbito do projeto de investigação PTDC/QUI-OUT/29013/2017. Este projeto foi financiado através de fundos nacionais da Fundação para a Ciência e a Tecnologia e do Ministério da Educação e Ciência (FCT/MEC) e cofinanciado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) no âmbito do acordo PT2020 (UID/QUI/50006/2019 – POCI/01/0145/ FEDER/007265).

A execução deste trabalho não teria sido possível sem o contributo de várias pessoas e instituições, às quais estou profundamente grata. Por esse motivo, quero deixar o meu mais sincero agradecimento a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a sua realização.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Doutora Iva Fernandes, orientadora deste projeto, por toda a sua dedicação constante durante a realização deste trabalho. Agradeço toda a disponibilidade e generosidade reveladas ao longo destes meses, bem como todas as críticas e ensinamentos que me ajudaram a ultrapassar as dificuldades e a querer fazer sempre mais e melhor.

Também gostaria de agradecer à Doutora Clara Pereira, coorientadora deste trabalho, por ter sido tão bem recebida no seu laboratório. Agradeço todo o apoio e disponibilidade demonstrados durante este projeto, bem como todos os ensinamentos que me foram transmitidos e que me fizeram crescer profissionalmente.

Quero agradecer ainda ao Professor Doutor Nuno Mateus, coorientador deste trabalho por me ter dado a oportunidade de fazer parte deste projeto de investigação, por toda a confiança que depositou em mim e por ter estado sempre disponível para me ajudar.

Agradeço também ao Professor Doutor Victor Freitas pela sua dedicação ao laboratório de Química Orgânica, onde realizei grande parte deste projeto.

Aproveito para deixar um agradecimento muito especial a todos aqueles que trabalham nos laboratórios de Química Orgânica e de Química Inorgânica. Por serem muitos e para não correr o risco de me esquecer de alguém, não vou identificar ninguém. Estou grata por todo o carinho que sempre manifestaram e por me terem apoiado sempre ao longo destes meses de trabalho. A todos eles, sem exceção, agradeço todos os bons momentos que me proporcionaram e todos os conhecimentos que me transmitiram.

Gostaria de agradecer ainda à Doutora Natércia Brás por toda a dedicação a este projeto bem como pelos ensinamentos que me transmitiu na área da Química Computacional. Agradeço também ao Professor Pedro Oliveira da Herdade Experimental do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) pela cedência das amoras para a execução deste trabalho bem como à Doutora Carla Silva do Centro Tecnológico das Indústrias Têxtil e do Vestuário de Portugal (CITEVE) pela cedência das malhas de algodão e poliamida e por todos os conselhos que me deu e que foram essenciais para a realização do projeto. Aproveito para agradecer ainda à Doutora Alexandra Guedes pela cedência do colorímetro. Agradeço também aos laboratórios do Instituto de Física de Materiais Avançados, Nanotecnologia e Fotónica da Universidade do Porto (IFIMUP), ao Lab&Services e ao Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP) pela ajuda na execução de algumas tarefas, nomeadamente em técnicas de caracterização de materiais.

Agradeço ainda a todos os elementos da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto por me terem acolhido ao longo deste período e por terem contribuído de alguma forma para a realização deste projeto.

Queria agradecer a todos os meus professores que sempre me apoiaram e incentivaram a ser uma aluna cada vez melhor. Estou grata por todo o conhecimento que me transmitiram e por terem contribuído para a minha formação académica.

Gostaria de agradecer também à minha família e a todos os meus amigos pelo apoio que sempre me deram e por todos os bons momentos que passamos juntos. Obrigada por me terem ajudado a crescer enquanto pessoa e por me terem ajudado a ultrapassar os momentos menos bons.

Agradeço ao meu Avô e à minha Avó por tudo o que fizeram por mim. Obrigada pelas vossas sábias palavras e pelo vosso amor ao longo destes anos. Apesar de me terem deixado fisicamente durante este ano, guardá-los-ei para sempre no meu coração.

Por último, queria deixar um agradecimento muito especial aos meus Pais e à minha Irmã por estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida e por me incentivarem a seguir sempre os meus sonhos. Obrigada pelo amor e dedicação incondicionais. Agradeço-lhes todos os valores que me transmitiram e que fizeram de mim uma pessoa melhor.

Resumo

Atualmente, a população tem vindo a revelar um interesse crescente pelos produtos naturais em detrimento dos sintéticos, nomeadamente para aplicações cosméticas.

As antocianinas são compostos naturais pertencentes ao grupo dos polifenóis e à classe dos flavonóides. Estes compostos são responsáveis pelas cores vermelha, roxa e azul de muitas frutas, vegetais e flores, e apresentam diversas propriedades benéficas para a saúde humana, como atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e anticancerígena. Devido a essas propriedades, as antocianinas podem ser incorporadas em loções e cremes corporais com o objetivo de prevenir doenças de pele e evitar o envelhecimento precoce. No entanto, estes compostos apresentam baixa solubilidade em meio lipofílico e baixa estabilidade em relação ao pH, à temperatura e à luz, pelo que a sua aplicação em formulações cosméticas pode estar comprometida. Uma estratégia para ultrapassar este problema poderá ser através da sua imobilização em substratos têxteis, dando origem a novos cosmetotêxteis.

Assim, neste projeto, o principal objetivo foi produzir cosmetotêxteis a partir de antocianinas provenientes de resíduos agroalimentares e que pudessem ser utilizados para proteger a pele e para prevenir o envelhecimento.

Numa fase inicial do trabalho, as antocianinas foram extraídas de amoras e o extrato obtido foi caracterizado, no seu conteúdo fenólico, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espetrometria de massa (MS).

Numa segunda fase, o extrato de antocianinas foi imobilizado em têxteis de algodão e poliamida e foram testados vários fatores, como o efeito do pH, da temperatura, da concentração de antocianinas e da presença e concentração de mordente. As amostras obtidas foram caracterizadas, recorrendo a técnicas como a colorimetria, a espetroscopia de infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada (FTIR-ATR) e a espetroscopia fotoeletrónica de raios-X (XPS) e concluiu-se que o tingimento das mesmas foi realizado com sucesso. Verificou-se ainda que as condições ótimas de tingimento implicavam o uso de extrato sem ajuste de pH (a um pH ácido), uma temperatura de 90 °C e a presença prévia ou ausência de mordente.

Numa última fase deste trabalho avaliou-se o efeito das antocianinas provenientes do extrato de amora e dos substratos têxteis de algodão tingidos com este extrato em modelos celulares de pele. Foram realizados ensaios de libertação com suor

artificial para determinar a quantidade de antocianinas libertada. Foram também realizados ensaios de citotoxicidade, não tendo sido observada toxicidade para concentrações inferiores ou iguais a 125 $\mu\text{mol/L}$. Fizeram-se também ensaios de inibição enzimática com enzimas que são sobre-expressas durante o envelhecimento da pele (colagenase, elastase, tirosinase e hialuronidase) e ainda um estudo teórico com a enzima hialuronidase. Todas as enzimas estudadas foram inibidas pelo extrato, o que permitiu comprovar uma ação antienvelhecimento.

Este estudo revelou-se bastante promissor no que diz respeito à utilização das antocianinas como corantes naturais na indústria têxtil e como ingredientes cosméticos. Através deste projeto, foi possível obter têxteis visualmente atrativos que podem ser usados para prevenir o envelhecimento e promover a saúde da pele.

PALAVRAS-CHAVE:

Amora, antocianinas, algodão, poliamida, tingimento, citotoxicidade, colagenase, elastase, hialuronidase, tirosinase, pele, cosmetotêxteis, antienvelhecimento, saúde.

Abstract

Currently, the population has been showing an increasing interest in natural products over synthetic ones, namely for cosmetic applications.

Anthocyanins are natural compounds belonging to the group of polyphenols and the class of flavonoids. These compounds are responsible for the red, purple and blue colors of many fruits, vegetables and flowers and they have several beneficial properties for human health, such as antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and anticarcinogenic activity. Due to these properties, anthocyanins can be incorporated in body lotions and creams in order to prevent skin diseases and premature aging. However, these compounds have low solubility in lipophilic medium and low stability towards pH, temperature and light, so their application in cosmetic formulations may be compromised. A strategy to overcome this problem could be through their immobilization on textile substrates, giving rise to new cosmetotextiles.

Thus, in this project, the main objective was to produce cosmetotextiles using anthocyanins from agrifood residues that could be used to protect the skin and to prevent aging.

In an initial phase of this work, anthocyanins were extracted from blackberries and the obtained extract was characterized, in its phenolic content, by high-performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS).

In a second phase, anthocyanins extract was immobilized on cotton and polyamide textiles and several factors were tested, such as the effect of pH, temperature, anthocyanin concentration and the presence and concentration of a mordant. The obtained samples were characterized using techniques such as colorimetry, attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and it was concluded that their dyeing was carried out successfully. It was also observed that the optimal dyeing conditions implied the use of extract without pH adjustment (at an acidic pH), a temperature of 90 °C and the previous presence or absence of a mordant.

In the last phase of this work, the effect of anthocyanins from blackberries extract and of cotton textile substrates dyed with this extract on skin cell models was evaluated. Release tests were performed with artificial sweat to determine the amount of released anthocyanins. Cytotoxicity tests were also carried out and no toxicity was observed at concentrations lower than or equal to 125 µmol/L. Enzymatic inhibition tests with the enzymes that are overexpressed during skin aging (collagenase, elastase, tyrosinase

and hyaluronidase) and a theoretical study with the enzyme hyaluronidase were executed. All studied enzymes were inhibited by the extract, which allowed proving an anti-aging action.

This study was very promising regarding the use of anthocyanins as natural dyes in the textile industry and as cosmetic ingredients. Through this project, it was possible to obtain visually attractive textiles that can be used to prevent aging and promote skin health.

KEY WORDS:

Blackberry, anthocyanins, cotton, polyamide, dyeing, cytotoxicity, collagenase, elastase, hyaluronidase, tyrosinase, skin, cosmetotextiles, anti-aging, health.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	iii
Abstract	v
Índice.....	vii
Lista de Tabelas	xi
Lista de Figuras	xiii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xvii
1. Introdução.....	1
1.1. Compostos fenólicos	1
1.1.1. Flavonóides	2
1.1.1.1. Antocianinas.....	3
a) Estrutura e propriedades químicas das antocianinas.....	3
b) Ocorrência das antocianinas	5
c) Propriedades biológicas das antocianinas	6
1.2. Pele	8
1.2.1. Estrutura e função da pele.....	8
1.2.2. Envelhecimento da pele	9
1.3. Têxteis funcionais.....	12
1.3.1. Funcionalização dos têxteis.....	13
1.3.2. Cosmetotêxteis.....	16
2. Objetivos.....	19
3. Materiais e Métodos	21
3.1. Materiais, reagentes e solventes	21
3.2. Métodos.....	22
3.2.1. Purificação e caracterização estrutural do extrato de antocianinas de amora.....	22
3.2.1.1. Purificação do extrato de antocianinas	22
3.2.1.2. Caracterização do extrato de antocianinas.....	23
a) Determinação do conteúdo em antocianinas, polifenóis de baixo peso molecular e flavonóis	23

a.1) Análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de rede de díodos.....	23
a.2) Análise por cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de massa.....	26
b) Determinação do conteúdo total em fenóis.....	27
c) Determinação do teor em humidade.....	28
d) Determinação do teor em proteínas.....	28
e) Determinação da atividade antioxidante.....	29
f) Determinação da atividade antirradicalar.....	30
3.2.2. Ativação e tingimento dos substratos têxteis.....	30
3.2.2.1. Lavagem e ativação da malha de algodão.....	30
3.2.2.2. Ativação da malha de poliamida.....	31
3.2.2.3. Tingimento das malhas de algodão e poliamida.....	31
3.2.3. Caracterização dos substratos têxteis.....	35
3.2.3.1. Colorimetria.....	35
3.2.3.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada.....	37
3.2.3.3. Espectroscopia fotoeletrónica de raios-X.....	39
3.2.4. Ensaio de libertação.....	40
3.2.4.1. Ensaio de libertação com suor artificial.....	40
3.2.4.2. Determinação da quantidade de alumínio libertada.....	41
3.2.5. Ensaio de citotoxicidade.....	42
3.2.5.1. Cultura de células.....	42
3.2.5.2. Incubação com os compostos.....	43
3.2.5.3. Ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio.....	43
3.2.6. Efeito das antocianinas nas enzimas da pele.....	44
3.2.6.1. Atividade da collagenase.....	44
3.2.6.2. Atividade da elastase.....	45
3.2.6.3. Atividade da tirosinase.....	46
3.2.6.4. Atividade da hialuronidase.....	46
3.2.7. Análise estatística.....	48
3.2.8. Estudos de <i>docking</i> molecular com a hialuronidase.....	48

4.	Resultados e Discussão	51
4.1.	Caracterização estrutural do extrato de antocianinas de amora.....	51
4.1.1.	Determinação do conteúdo em antocianinas	51
4.1.2.	Determinação do conteúdo em polifenóis de baixo peso molecular.....	52
4.1.3.	Determinação do conteúdo em flavonóis	53
4.1.4.	Determinação do conteúdo total em fenóis.....	54
4.1.5.	Determinação do teor em humidade	55
4.1.6.	Determinação do teor em proteínas.....	55
4.1.7.	Determinação da atividade antioxidante	55
4.1.8.	Determinação da atividade antirradicalar.....	55
4.2.	Caracterização dos substratos têxteis	56
4.2.1.	Colorimetria.....	56
4.2.2.	Espetroscopia de infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada.....	81
4.2.3.	Espetroscopia fotoeletrónica de raios-X.....	87
4.3.	Ensaio de libertação	94
4.3.1.	Ensaio de libertação com suor artificial	94
4.3.2.	Determinação da quantidade de alumínio libertada	97
4.4.	Ensaio de citotoxicidade	98
4.5.	Efeito das antocianinas nas enzimas da pele	99
4.5.1.	Atividade da colagenase.....	99
4.5.2.	Atividade da elastase.....	101
4.5.3.	Atividade da tirosinase.....	102
4.5.4.	Atividade da hialuronidase.....	103
4.6.	Estudos de <i>docking</i> molecular com a hialuronidase.....	106
5.	Conclusões e Perspetivas Futuras.....	113
5.1.	Conclusões.....	113
5.2.	Perspetivas Futuras.....	114
6.	Referências bibliográficas.....	117

X

FCUP

Absorção, estabilidade e bioatividade de novos derivados antociânicos para aplicação nas indústrias cosmética e têxtil

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 - Conteúdo total em antocianinas de diversas frutas e vegetais. Adaptado de [33]	6
Tabela 1.2 - Diferentes tipos de têxteis funcionais e respetivas características. Adaptado de [90]	16
Tabela 3.1 - Condições utilizadas no tingimento por impregnação dos têxteis de algodão e poliamida com o extrato de amora	32
Tabela 3.2 - Condições utilizadas no tingimento por esgotamento dos têxteis de algodão com o extrato de amora	33
Tabela 3.3 - Condições utilizadas no tingimento por esgotamento dos têxteis de poliamida com o extrato de amora	34
Tabela 3.4 - Programa de aquecimento do forno do espectrómetro de absorção atómica	42
Tabela 4.1 - Identificação estrutural por HPLC-MS das antocianinas presentes no extrato de amora (estrutura das antocianinas, varrimentos MS^1 e MS^2 (m/z), λ de absorção máxima e tempo de retenção)	52
Tabela 4.2 - Identificação estrutural por HPLC-MS dos compostos presentes no extrato de amora que apresentam absorvância a $\lambda = 280$ nm (varrimentos MS^1 , MS^2 e MS^3 (m/z), λ de absorção máxima e tempo de retenção)	53
Tabela 4.3 - Identificação estrutural por HPLC-MS dos flavonóis presentes no extrato de amora (varrimentos MS^1 , MS^2 e MS^3 (m/z), λ de absorção máxima e tempo de retenção)	54
Tabela 4.4 - Composição do extrato de antocianinas de amora por mg de extrato.....	56
Tabela 4.5 - Substratos têxteis de algodão e poliamida não tingidos antes e após ativação	57
Tabela 4.6 - Substratos têxteis de algodão tingidos por impregnação à temperatura ambiente, antes e após a lavagem	57
Tabela 4.7 - Substratos têxteis de poliamida tingidos por impregnação à temperatura ambiente, antes e após a lavagem	58
Tabela 4.8 - Substratos têxteis de algodão tingidos por esgotamento, antes e após a lavagem	59
Tabela 4.9 - Substratos têxteis de poliamida tingidos por esgotamento, antes e após a lavagem	60
Tabela 4.10 - Efeito do uso de mordente no tingimento dos substratos têxteis de algodão, antes e após a lavagem	61
Tabela 4.11 - Efeito do uso de mordente no tingimento dos substratos têxteis de poliamida, antes e após a lavagem	62
Tabela 4.12 - Efeito do pH no tingimento por esgotamento dos substratos têxteis de algodão, com aplicação prévia do mordente sulfato de alumínio, antes e após a lavagem	63
Tabela 4.13 - Efeito do pH no tingimento por esgotamento dos substratos têxteis de poliamida, com aplicação prévia do mordente sulfato de alumínio, antes e após a lavagem	65
Tabela 4.14 - Efeito da temperatura no tingimento por esgotamento dos substratos têxteis de algodão e poliamida, com aplicação prévia do mordente sulfato de alumínio, antes e após a lavagem	66

Tabela 4.15 - Efeito da concentração de mordente no tingimento por esgotamento dos substratos têxteis de algodão, com aplicação prévia do mordente sulfato de alumínio, antes e após a lavagem.....	67
Tabela 4.16 - Efeito da concentração de mordente no tingimento por esgotamento dos substratos têxteis de poliamida, com aplicação prévia do mordente sulfato de alumínio, antes e após a lavagem.....	68
Tabela 4.17 - Efeito da abordagem <i>in situ</i> no tingimento por esgotamento dos substratos têxteis de algodão, na presença do mordente sulfato de alumínio, antes e após a lavagem.....	69
Tabela 4.18 - Efeito da abordagem <i>in situ</i> no tingimento por esgotamento dos substratos têxteis de poliamida, na presença do mordente sulfato de alumínio, antes e após a lavagem.....	70
Tabela 4.19 - Efeito da concentração de extrato no tingimento por esgotamento dos substratos têxteis de algodão, com aplicação prévia do mordente sulfato de alumínio, antes e após a lavagem.....	71
Tabela 4.20 - Efeito da concentração de extrato no tingimento por esgotamento dos substratos têxteis de poliamida, com aplicação prévia do mordente sulfato de alumínio, antes e após a lavagem.....	72
Tabela 4.21 - Efeito da ativação dos substratos têxteis de algodão no tingimento por esgotamento, com aplicação prévia dos mordentes sulfato de alumínio e sulfato de alumínio e potássio, antes e após a lavagem	73
Tabela 4.22 - Efeito da ativação dos substratos têxteis de poliamida no tingimento por esgotamento, com aplicação prévia dos mordentes sulfato de alumínio e sulfato de alumínio e potássio, antes e após a lavagem	74
Tabela 4.23 - Substratos têxteis de algodão testados nos ensaios biológicos tingidos pelo método de esgotamento, na ausência e na presença prévia do mordente sulfato de alumínio, antes e após a lavagem.....	75
Tabela 4.24 - Percentagens atômicas superficiais dos elementos químicos existentes na superfície das amostras Alg , Alg@am_sa , Pol e Pol@am_sa	87
Tabela 4.25 - Valores de BE e áreas associadas a cada banda resultante da deconvolução dos espectros de XPS associados a cada elemento para as amostras de Alg , Alg@am_sa , Pol e Pol@am_sa	91
Tabela 4.26 - Concentração de alumínio libertada dos têxteis de algodão	97
Tabela 4.27 - Valores para as melhores soluções de <i>docking</i> molecular obtidas para cada um dos ligandos testados; identificação do grupo de cada composto mais próximo do Glu113, assim como as respetivas distâncias.....	109

Lista de Figuras

Fig. 1.1 - Compostos fenólicos: exemplos de classes, subclasses e alguns compostos. Adaptado de [3].	1
Fig. 1.2 - Estrutura do núcleo flavânico e identificação dos respetivos anéis. Adaptado de [12].	2
Fig. 1.3 - Estrutura das principais antocianidinas presentes na Natureza. Adaptado de [19].	3
Fig. 1.4 - Diferentes formas estruturais das antocianinas em função do pH em meio aquoso. Adaptado de [23].	4
Fig. 1.5 - Estrutura da pele. Adaptado de [55]. Criado através de BioRender.com.	8
Fig. 1.6 - Envelhecimento da pele: esquema exemplificativo da destruição do colagénio, da elastina e do ácido hialurónico. Adaptado de [68].	11
Fig. 1.7 - Diferentes tipos de substratos têxteis e respetivos exemplos. Adaptado de [77].	13
Fig. 3.1 - Espaço de cor $L^* a^* b^*$. Adaptado de [113].	36
Fig. 3.2 - Princípio da técnica de FTIR-ATR. Adaptado de [120].	38
Fig. 3.3 - Representação esquemática do efeito fotoelétrico. Adaptado de [122].	39
Fig. 4.1 - Cromatograma representativo da análise por HPLC das antocianinas presentes no extrato de amora a $\lambda = 520$ nm.	51
Fig. 4.2 - Cromatograma representativo da análise por HPLC-MS dos polifenóis de baixo peso molecular presentes no extrato de amora a $\lambda = 280$ nm.	53
Fig. 4.3 - Cromatograma representativo da análise por HPLC dos flavonóis presentes no extrato de amora a $\lambda = 370$ nm.	54
Fig. 4.4 - Cromatogramas representativos da análise por HPLC do extrato de antocianinas de amora sem ajuste de pH antes (preto) e após o tingimento (rosa) da amostra Alg@am bem como do extrato após incubação a 90 °C durante 1 hora (azul) a $\lambda = 520$ nm.	77
Fig. 4.5 - Cromatogramas representativos da análise por HPLC do extrato de antocianinas de amora sem ajuste de pH antes (preto) e após o tingimento (rosa) da amostra Alg@am_sa bem como do extrato após incubação a 90 °C durante 1 hora (azul) e de uma solução aquosa de extrato misturada com sulfato de alumínio (1/1, V/V; castanho) a $\lambda = 520$ nm.	77
Fig. 4.6 - Cromatogramas representativos da análise por HPLC do extrato de antocianinas de amora a pH 8 antes (preto) e após o tingimento (rosa) da amostra Alg@am_pH8_sa bem como do extrato a pH 8 após incubação a 90 °C durante 1 hora (azul) e de uma solução aquosa de extrato a pH 8 misturada com sulfato de alumínio (1/1, V/V; castanho) a $\lambda = 520$ nm.	78
Fig. 4.7 - Cromatogramas representativos da análise por HPLC do extrato de antocianinas de amora sem ajuste de pH antes (preto) e após o tingimento (rosa) da amostra Alg@am_sap bem como do extrato após incubação a 90 °C durante 1 hora (azul) e de uma solução aquosa de extrato misturada com sulfato de alumínio e potássio (1/1, V/V; castanho) a $\lambda = 520$ nm.	79
Fig. 4.8 - Espetro de FTIR-ATR do extrato de antocianinas de amora.	82

Fig. 4.9 - Espectros de FTIR-ATR dos provetes Alg_na e Alg	83
Fig. 4.10 - Estrutura química do algodão. Adaptado de [155].	83
Fig. 4.11 - Espectros de FTIR-ATR das amostras Alg , Alg@am , Alg@am_sa e do extrato de antocianinas de amora. A preto, encontram-se assinaladas as bandas características dos substratos têxteis e, a vermelho, a do extrato de antocianinas.	84
Fig. 4.12 - Espectros de FTIR-ATR dos provetes Pol_na e Pol	85
Fig. 4.13 - Estrutura química da poliamida. Adaptado de [157].....	85
Fig. 4.14 - Espectros de FTIR-ATR das amostras Pol , Pol@am , Pol@am_sa e do extrato de antocianinas de amora. A preto, encontram-se assinaladas as bandas características dos substratos têxteis e, a vermelho, a do extrato de antocianinas.....	86
Fig. 4.15 - Espectros de XPS dos elementos C 1s e O 1s presentes nas amostras Alg e Alg@am_sa e respetivas deconvoluções (Nota: CPS - contagens por segundo).	89
Fig. 4.16 - Espectros de XPS dos elementos C 1s, N 1s e O 1s presentes nas amostras Pol e Pol@am_sa e respetivas deconvoluções.	90
Fig. 4.17 - Concentração de antocianinas libertadas dos substratos têxteis de algodão durante a incubação com suor artificial (Gráfico preliminar).	95
Fig. 4.18 - Concentração de antocianinas libertadas dos têxteis de algodão durante 2 horas de incubação com suor artificial. Os valores representam a média $\pm$ SEM (n=3), *** $p < 0,001$ (valores estatisticamente diferentes entre si).	96
Fig. 4.19 - Percentagens de células viáveis, relativamente a um controlo, após a incubação com a solução extraída das amostras Alg_na@am(4x) e Alg_na@am(4x)_sa . Os valores representam a média $\pm$ SEM (n=4).	98
Fig. 4.20 - Percentagens de inibição da collagenase, após a incubação com o extrato de antocianinas de amora e a cy-3-glc. Os valores representam a média $\pm$ SEM (n=9-10), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (todos os valores são estatisticamente diferentes entre si, exceto os assinalados com ns - valores sem diferenças significativas).	100
Fig. 4.21 - Percentagens de inibição da elastase, após a incubação com o extrato de antocianinas de amora e a cy-3-glc. Os valores representam a média $\pm$ SEM (n=10-19), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (todos os valores são estatisticamente diferentes entre si, exceto os assinalados com ns - valores sem diferenças significativas).	101
Fig. 4.22 - Percentagens de inibição da tirosinase, após a incubação com o extrato de antocianinas de amora e a cy-3-glc. Os valores representam a média $\pm$ SEM (n=9), *** $p < 0,001$ (todos os valores são estatisticamente diferentes entre si, exceto os assinalados com ns - valores sem diferenças significativas).	102
Fig. 4.23 - Percentagens de inibição da hialuronidase, após a incubação com o extrato de antocianinas de amora e a cy-3-glc. Os valores representam a média $\pm$ SEM (n=9-16), * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (todos os valores são estatisticamente diferentes entre si, exceto os assinalados com ns - valores sem diferenças significativas).	104
Fig. 4.24 - Estrutura da hialuronidase complexada com o tetrassacárido, evidenciando os resíduos mais importantes do centro ativo. Esta figura foi preparada com recurso ao programa VMD, a partir do código PDB 1FCV. A representação <i>New Cartoon</i> evidencia a estrutura da enzima, enquanto o tetrassacárido e os resíduos do centro ativo se encontram representados em paus (<i>Licorice</i>) e bolas-e-paus (<i>CPK</i>), respetivamente. Os	

átomos de hidrogénio não se encontram representados para simplificar a visualização.

..... 107

Fig. 4.25 - Representação esquemática do tetrassacárido e dos resíduos do centro ativo da hialuronidase que se encontram a menos de 4 Å do mesmo. A verde encontram-se evidenciados os resíduos mais importantes do centro ativo e que se mantiveram conservados na maioria das soluções obtidas durante a validação do processo de *docking* molecular (Asp - aspartato; Gln - glutamina; Glu - glutamato; Ile - isoleucina; Met - metionina; Phe - fenilalanina; Ser - serina; Trp - triptofano; Tyr - tirosina)..... 107

Fig. 4.26 - Estrutura da hialuronidase complexada com o tetrassacárido (cinzento) e com os ligandos estudados: quercetina (roxo), quercetina-3-glucósido (vermelho), cy-3-glc (amarelo), cy-3-glc na forma de chalcona (verde); luteolinidina (azul claro) e luteolinidina na forma de chalcona (azul escuro). Esta figura foi preparada com recurso ao programa *VMD*, a partir do código PDB 1FCV. A representação *New Cartoon* evidencia a estrutura da enzima e o tetrassacárido e os ligandos encontram-se na representação *paus (Licorice)*..... 108

Fig. 4.27 - Interações estabelecidas entre os diferentes ligandos e o centro ativo da hialuronidase, evidenciando a distância ao resíduo Glu113. Esta figura foi preparada com recurso ao programa *VMD*, a partir do código PDB 1FCV. A representação *New Cartoon* evidencia a estrutura da enzima, os ligandos encontram-se na representação *paus (Licorice)* e os resíduos do centro ativo, nomeadamente o Glu113, na representação *bolas-e-paus (CPK)*. Os átomos de hidrogénio não se encontram representados para simplificar a visualização. 110

Lista de Abreviaturas e Símbolos

a*	-	Coordenada CIELAB (verde/vermelho)
AAS	-	Espetroscopia de absorção atômica
API	-	Ionização à pressão atmosférica
Asp	-	Aspartato
ATR	-	Refletância total atenuada
b*	-	Coordenada CIELAB (azul/amarelo)
BE	-	Energia de ligação
BSA	-	Albumina de soro bovino
C18	-	Gel sílica de fase reversa RP-18 (40-63 µm) <i>LiChroprep</i>
CCD	-	Câmara com dispositivo de acoplamento de carga
CEMUP	-	Centro de Materiais da Universidade do Porto
CIE	-	Comissão Internacional de Iluminação
CITEVE	-	Centro Tecnológico das Indústrias Têxtil e do Vestuário de Portugal
CPS	-	Contagens por segundo
CTAB	-	Brometo de hexadeciltrimetilamónio
Cy-3-glc	-	Cianidina-3-glucósido
DAD	-	Detetor de rede de díodos
DMEM	-	Meio <i>Eagle</i> modificado por <i>Dulbecco</i>
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DPPH	-	2,2-Difenil-1-picril-hidrazil
ESI	-	Ionização por eletrospray
FALGPA	-	<i>N</i> -[3-(2-furil)acrilóil]-Leu-Gly-Pro-Ala (onde Leu - leucina; Gly - glicina; Pro - prolina e Ala - alanina)
FAO	-	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FBS	-	Soro bovino fetal
FTIR	-	Espetroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
GlcA	-	Ácido glucurónico
GlcNAc	-	<i>N</i> -Acetilglicosamina
Gln	-	Glutamina
Glu	-	Glutamato
Gly	-	Glicina
HPLC	-	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-DAD	-	Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de rede de díodos
HPLC-MS	-	Cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de massa
i.d.	-	Diâmetro interno
IC ₅₀	-	Concentração de inibidor necessária para reduzir a atividade enzimática em 50%
IFIMUP	-	Instituto de Física de Materiais Avançados, Nanotecnologia e Fotónica da Universidade do Porto
Ile	-	Isoleucina
INIAV	-	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
ISO	-	Organização Internacional de Normalização
L*	-	Coordenada CIELAB (luminosidade)
L-DOPA	-	3-(3,4-di-hidroxifenil)-L-alanina
Lys	-	Lisina
<i>m/m</i>	-	Razão massa/massa
<i>m/V</i>	-	Razão massa/volume
<i>m/z</i>	-	Razão massa/carga
Met	-	Metionina
mRNA	-	Ácido ribonucleico mensageiro

MS - Espectrometria de massa

MS^1 - Scan “full mass”

MS^2 - “Zoom scan” do ião mais intenso

MS^3 - Análise MS - MS do ião mais intenso usando a energia de colisão relativa de 45

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

NF- κ B - fator nuclear kappa B

N-Suc-Ala-Ala-Ala-*p*-NA - *N*-Succinil-Ala-Ala-Ala-*p*-Nitroanilido (onde Ala - Alanina)

OMS - Organização Mundial da Saúde

p - Nível descritivo

p.a. - Para análise

PBS - Tampão fosfato salino

PDB - *Protein Data Bank*

PFSP - Batata-doce de polpa roxa

Phe - Fenilalanina

ppb - Partes por bilhão

Pro - Prolina

rpm - Rotações por minuto

SCE - Componente especular excluída

SEM - Erro padrão da média

Ser - Serina

THGA - Tubos de grafite com aquecimento transversal e com plataformas integradas

TPTZ - 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina

Trp - Triptofano

Tyr - Tirosina

u.a. - Unidades arbitrárias

UV - Ultravioleta

V/V - Razão volume/volume

VdW - *Van der Waals*

VMD - *Visual Molecular Dynamics*

XPS - Espectroscopia fotoeletrônica de raios-X

ΔE - Diferença total de cor

ΔG_{lig} - Energia de Gibbs da ligação

λ - Comprimento de onda

1. Introdução

Neste capítulo, será realizada uma breve introdução a diversos conceitos importantes para a compreensão deste trabalho.

Este capítulo encontra-se dividido em três subsecções. Numa primeira parte, serão abordadas as principais características dos compostos fenólicos, principalmente as propriedades químicas e biológicas das antocianinas. Posteriormente, será realizada uma breve referência à estrutura e função da pele e proceder-se-á a uma explicação sobre o seu processo de envelhecimento. Por último, será abordada a temática dos têxteis funcionais, nomeadamente o processo de funcionalização dos têxteis bem como os últimos desenvolvimentos na área dos cosmetotêxteis.

1.1. Compostos fenólicos

Nos últimos anos, tem havido um grande interesse por parte dos cientistas num grande número de compostos naturais, designados de compostos fenólicos. Estes compostos caracterizam-se por possuírem um anel benzénico substituído por um ou mais grupos hidroxilo ($-OH$). Os compostos fenólicos encontram-se divididos em várias classes, tendo em conta o número de anéis fenólicos que contêm e os elementos estruturais que ligam esses anéis entre si (**Fig. 1.1**) [1,2].

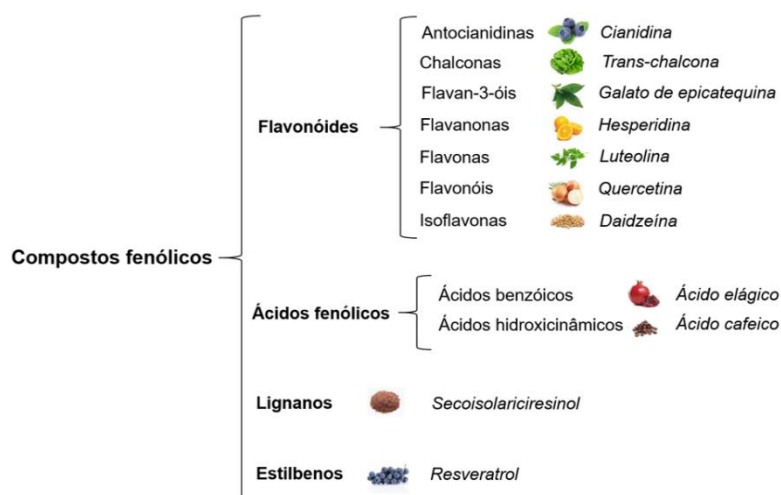


Fig. 1.1 - Compostos fenólicos: exemplos de classes, subclasses e alguns compostos. Adaptado de [3].

Existem mais de 8000 compostos fenólicos diferentes identificados na Natureza [4]. Estas moléculas são produzidas durante o metabolismo secundário das plantas e desempenham diversas funções, contribuindo para o seu aspeto físico e para as suas propriedades organoléticas (por exemplo, a pigmentação de algumas flores e frutos e a

adstringência associada a alguns frutos). Para além disso, estes compostos são importantes para o crescimento e reprodução das plantas e estão envolvidos na defesa contra predadores e seres vivos patogénicos. Os compostos fenólicos participam, ainda, na proteção contra a radiação ultravioleta (UV) e atuam como antioxidantes, sendo responsáveis pela eliminação de radicais livres e pela quelatação de metais [5].

Os compostos fenólicos não só são importantes para as plantas como também apresentam inúmeros benefícios para o ser humano. Diversos estudos mostram que o elevado consumo de polifenóis, característico da dieta mediterrânica, está associado a uma redução do risco de determinadas doenças e à melhoria da qualidade de vida [6,7]. Graças às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas e antimicrobianas, estes compostos são utilizados para a prevenção e tratamento de diversas patologias [4,8-10], sendo considerados ingredientes bastante atrativos para as indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética [11].

1.1.1. Flavonóides

Uma das principais classes de compostos fenólicos é a classe dos flavonóides. Os flavonóides caracterizam-se pela presença de um núcleo flavânico, que é constituído por dois anéis aromáticos (A e B) ligados por um anel heterocíclico (C) (C6-C3-C6) (**Fig. 1.2**) [12].

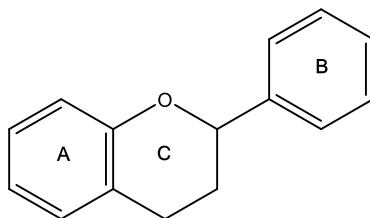


Fig. 1.2 - Estrutura do núcleo flavânico e identificação dos respetivos anéis. Adaptado de [12].

Os flavonóides dividem-se em várias subclasses de acordo com o nível de oxidação do anel C e com os substituintes dos seus anéis. Estes apresentam inúmeros benefícios para a saúde, nomeadamente a nível nutricional, medicinal e cosmético [12]. Devido aos seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e anticancerígenos, estes compostos são utilizados na prevenção e tratamento de determinadas doenças, como é o caso da doença de Alzheimer, da aterosclerose e de vários tipos de cancro [13].

Uma das principais subclasses de flavonóides é a subclasse das antocianidinas, que, quando ligadas a açúcares, se passam a designar de antocianinas [14]. As suas principais características irão ser abordadas na próxima secção.

1.1.1.1. Antocianinas

a) Estrutura e propriedades químicas das antocianinas

A palavra “antocianina” deriva do grego *anthos*, que significa “flor”, e *kianos*, que quer dizer “azul”. Estes compostos constituem os pigmentos mais importantes das plantas vasculares, sendo que uma das suas principais características é o facto de serem solúveis em água [15]. Apesar de estas moléculas poderem ser encontradas na natureza na forma de antocianidinas (agliconas), estas tendem a ligar-se a açúcares, o que aumenta a sua solubilidade em água e as torna mais estáveis [16].

Até aos dias de hoje, já foram identificadas mais de 700 antocianinas na Natureza, sendo que as mais frequentes são as derivadas das 6 antocianidinas principais: cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina e petunidina (**Fig. 1.3**) [17,18].

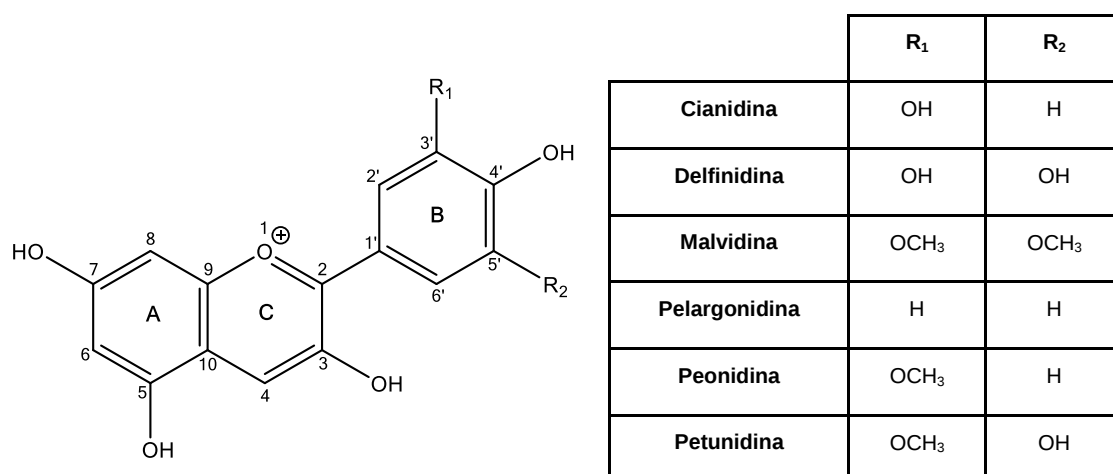


Fig. 1.3 - Estrutura das principais antocianidinas presentes na Natureza. Adaptado de [19].

As antocianinas são constituídas por um anel aromático (A) ligado a um anel heterocíclico (C) que contém oxigénio e que, por sua vez, se encontra ligado a um terceiro anel aromático (B), por uma ligação carbono-carbono. Um dos aspetos que distingue as antocianinas umas das outras é o padrão de metilação e hidroxilação do anel B. As diferentes substituições com grupos metilo e hidroxilo são responsáveis por pequenas diferenças nas propriedades físico-químicas destes compostos, nomeadamente a cor [20]. Outra característica importante é o padrão de glicosilação destes compostos. Os açúcares que se encontram ligados às antocianidinas podem ser mono-, di- ou trissacáridos, sendo que a glucose é um dos açúcares mais comuns. Geralmente, estes tendem a ligar-se nas posições C3 ou C5, no entanto, podem ligar-

se noutras posições. Estes substituintes podem, ainda, ser acilados por ácidos alifáticos (por exemplo, o ácido acético) ou por ácidos aromáticos (como é o caso do ácido *p*-cumárico, do ácido cafeico e do ácido ferúlico) [21].

As antocianinas possuem um máximo de absorção na região do UV, a um comprimento de onda (λ) compreendido entre $\lambda = 270$ e $\lambda = 280$ nm, e outro na zona do visível entre $\lambda = 465$ e $\lambda = 550$ nm. Deste modo, são responsáveis pelas cores vermelho, laranja, violeta e azul, que são características de muitas flores, frutas e legumes [22].

Em solução aquosa, as antocianinas encontram-se sob a forma de uma mistura de diferentes estruturas químicas em equilíbrio: o catião flavílio (cor vermelha), a pseudobase carbinol (incolor), a base quinoidal (cor azul) e a chalcona (cor amarela) [23] (**Fig. 1.4**).

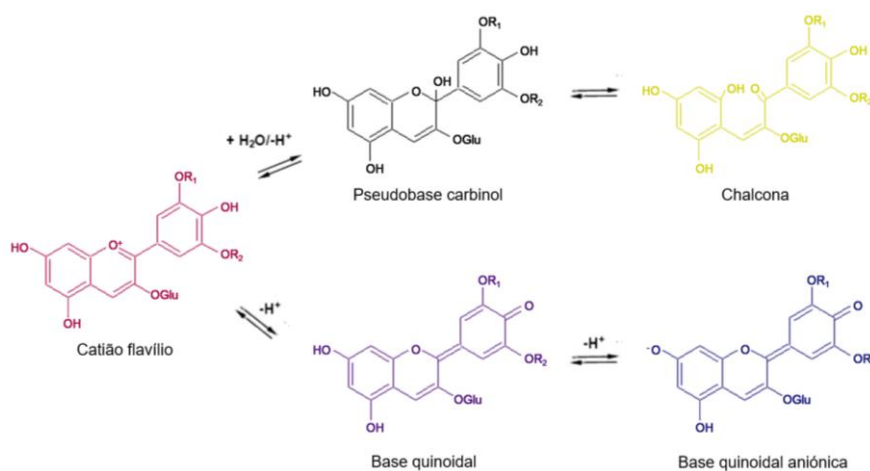


Fig. 1.4 - Diferentes formas estruturais das antocianinas em função do pH em meio aquoso. Adaptado de [23].

Em meio aquoso e a pH inferior a 2, a forma dominante é o catião flavílio, que constitui a forma mais estável deste pigmento. Devido à presença de oito ligações duplas conjugadas com uma carga positiva, este catião confere uma cor intensamente vermelha ou laranja ao meio. Contudo, a pH mais elevado, o catião dá origem às outras formas e a cor vermelha tende a desaparecer. Devido ao aumento do pH, ocorre uma desprotonação rápida do catião flavílio, formando-se, assim, a base quinoidal que confere uma cor violeta ou azul à solução. Em meio aquoso, pode também ocorrer a hidratação do catião flavílio por ataque nucleofílico da água, havendo um equilíbrio entre a pseudobase carbinol e a chalcona, o que torna a solução incolor ou com uma tonalidade amarelada, respetivamente [24].

As antocianinas são compostos muito instáveis e suscetíveis à degradação quando são extraídas da sua fonte natural. O núcleo flavânico possui uma estrutura que propicia a ocorrência de reações de degradação: o anel A possui duas regiões

nucleofílicas em C6 e C8 devido à presença dos grupos hidroxilo em C5 e C7; o anel B pode atuar como um agente redutor, dependendo do seu padrão de hidroxilação; e relativamente ao anel C, este tem uma carga positiva e, por isso, comporta-se como um agente eletrofílico [25]. Também a perda dos açúcares é um fenómeno bastante comum no processo de degradação das antocianinas.

Tal como já foi referido anteriormente, as antocianinas são capazes de alterar a sua estrutura química, como resposta a alterações de pH. Assim, o pH é um dos fatores que mais afeta a estabilidade das antocianinas, embora existam outros fatores que influenciam a sua estabilidade [26]. De acordo com a literatura, quando as antocianinas ficam expostas à luz ou são submetidas a uma temperatura elevada, o seu processo de degradação tende a tornar-se mais rápido [27]. Geralmente, o processo de degradação por ação da temperatura tem tendência a iniciar-se com a hidrólise da porção do açúcar e com a formação de agliconas. Posteriormente, as antocianinas podem continuar a sofrer degradação, originando a estrutura de chalcona [28]. Para além disso, a presença de oxigénio também contribui fortemente para a sua destruição. Este processo pode ocorrer através de um mecanismo de oxidação direta ou através da formação de radicais, que podem oxidar as antocianinas [29].

Por outro lado, também existem estratégias para melhorar a estabilidade das antocianinas. Quando estas moléculas se encontram na presença de catiões metálicos, como o alumínio(III), estas tendem a complexar e a formar produtos insolúveis, que apresentam maior estabilidade em relação à temperatura, luz e níveis de oxigénio [30]. Também a copigmentação das antocianinas com outros compostos é um processo que aumenta a sua estabilidade. É de notar que o aumento do grau de acilação das antocianinas também contribui significativamente para a sua estabilidade [31].

b) Ocorrência das antocianinas

As antocianinas estão presentes num grande número de plantas, frutas e vegetais. A maioria das antocianinas presentes nos alimentos é derivada das seis antocianidinas mais comuns (**Fig. 1.3**). A antocianina mais comum na Natureza é a cianidina-3-glucósido (cy-3-glc) [32].

As antocianinas mais frequentemente encontradas nas frutas, nomeadamente nas amoras, nas bagas de sabugueiro, nas cerejas, nas framboesas, nos morangos, entre outras, são os derivados mais simples da cianidina [14]. Por outro lado, as antocianinas presentes nos vegetais, como nas beringelas, nas cebolas vermelhas, na

batata-doce de polpa roxa (PFSP), nos rabanetes, entre outros, são mais complexas, apresentando um ou mais grupos acilo alifáticos ou aromáticos [33].

Na **Tabela 1.1**, está representado o conteúdo em antocianinas de algumas frutas e vegetais.

Tabela 1.1 - Conteúdo total em antocianinas de diversas frutas e vegetais. Adaptado de [33]

Fruta ou vegetal	Conteúdo total em antocianinas (mg de antocianinas/kg de alimento)
Ameixas	19-250
Amoras	820-1800
Bagas de sabugueiro	2000-15600
Beringelas	2500
Cebolas vermelhas	Até 250
Cerejas	3500-4500
Framboesas	100-600
Maçã (casca)	100-2160
Mirtilos	825-5300
Morangos	127-360
PFSP	180-1407
Rabanetes	110-600
Uvas	300-7500

Deste modo, é possível verificar que o teor de antocianinas nas frutas e nos vegetais é bastante variável. Cada espécie de plantas apresenta um perfil de antocianinas característico, com diferentes tipos de antocianinas e em diferentes proporções. Por vezes, pode haver diferenças entre perfis correspondentes à mesma espécie, devido a fatores genéticos, ao modo e condições de cultivo (como a luz, a temperatura e a humidade) e ao modo de extração dos compostos [34].

c) Propriedades biológicas das antocianinas

As antocianinas desempenham diversas funções no reino vegetal, nomeadamente a defesa contra alguns predadores e insetos bem como a atração de insetos polinizadores. Estas contribuem ainda para a pigmentação de muitas flores e frutos e para a proteção contra a radiação UV [35,36]. Para além disso, estes compostos são de extrema importância para o Homem. Tratam-se de compostos bioativos e, devido à sua baixa toxicidade, têm sido alvo de uma investigação extensa.

Graças às suas propriedades antioxidantes, as antocianinas possuem potenciais efeitos terapêuticos para diversas patologias [37]. A oxidação e a formação excessiva de espécies reativas de oxigénio são capazes de provocar danos às biomoléculas presentes nas células e, consequentemente, são responsáveis por vários mecanismos associados a múltiplas doenças, como o cancro e as doenças cardiovasculares [38]. Por isso, e graças às suas características, as antocianinas podem ser usadas neste contexto. A capacidade antioxidante das antocianinas pode ser explicada pela sua estrutura química, nomeadamente pelo catecol que pode estar presente no anel B e pelos grupos hidroxilo que poderão estar presentes nas posições C3 e C5. Contudo, nem todas as antocianinas têm a mesma capacidade antioxidante, pois esta depende do padrão de hidroxilação e metilação da molécula e, ainda, do seu grau de glicosilação. A glicosilação leva a que haja uma menor capacidade de deslocalização dos eletrões, diminuindo, assim, a atividade antioxidante das antocianinas [39,40]. Devido à sua estrutura, estas moléculas podem exercer o seu efeito antioxidante através do sequestro de radicais livres, da quelatação de metais e do favorecimento da expressão de enzimas antioxidantes [41,42].

Além da sua capacidade antioxidante, também já se encontra descrito que as antocianinas possuem uma atividade antimicrobiana, sendo capazes de inibir o crescimento de algumas culturas de bactérias [43,44]. Estas moléculas também se caracterizam pelas suas propriedades anti-inflamatórias, uma vez que alguns estudos demonstraram que as antocianinas estão associadas a uma diminuição da expressão de mediadores pró-inflamatórios, através da modulação da via do fator nuclear kappa B (NF- κ B) [45,46]. Adicionalmente, existem estudos que comprovam que as antocianinas têm propriedades anticancerígenas, sendo capazes de bloquear várias fases do ciclo celular, através dos efeitos que podem exercer nas proteínas reguladoras do ciclo [47,48].

Por isso, as antocianinas são capazes de proteger contra diversas patologias (como o cancro, a diabetes, as doenças cardiovasculares e neurológicas, entre outras) e de prevenir o envelhecimento, melhorando a saúde e a qualidade de vida do Homem [14,48-52]. No entanto, para a aplicação das antocianinas como compostos bioativos, é importante ter em conta a sua biodisponibilidade no organismo. Esta propriedade pode ser influenciada pelo ambiente, pela composição bioquímica da matriz onde são aplicadas e pela metabolização que podem sofrer [53].

Deste modo, graças às potenciais propriedades das antocianinas e sobretudo graças ao seu efeito antienvelhecimento, neste trabalho será explorado o efeito das

antocianinas na pele. Na secção 1.2 serão abordadas as principais características da pele e do envelhecimento da mesma bem como vários estudos científicos que têm vindo a demonstrar os efeitos benéficos das antocianinas na pele.

1.2. Pele

1.2.1. Estrutura e função da pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, constituindo 16% da nossa massa corporal. Esta é constituída por três camadas diferentes, a epiderme, a derme e a hipoderme, e por estruturas anexas, como as glândulas sudoríparas, as glândulas sebáceas e os pelos (**Fig. 1.5**) [54].

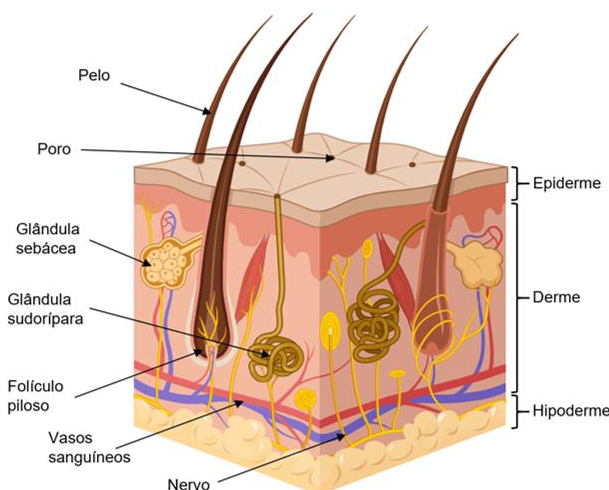


Fig. 1.5 - Estrutura da pele. Adaptado de [55]. Criado através de [BioRender.com](https://www.biorender.com).

A epiderme é a camada mais externa da pele. Esta é constituída por vários tipos de células, sendo que os queratinócitos são as que existem em maior quantidade. Para além destes, também é possível observar a presença de melanócitos, que são responsáveis pela produção de melanina, e de células de Langerhans, que são células do sistema imunitário. A epiderme pode ser dividida em cinco estratos distintos: o estrato córneo (mais superficial), o estrato lúcido, o estrato granuloso, o estrato espinhoso e o estrato basal (onde ocorre germinação de novas células). Assim, a epiderme caracteriza-se por ser uma estrutura bastante dinâmica, já que há uma renovação constante das células que a compõem (as células que surgem no estrato basal vão migrando para a superfície e substituindo as células que vão morrendo) [54,56].

A derme encontra-se abaixo da epiderme e acima da hipoderme. Esta camada é constituída por fibroblastos, que são células muito importantes para a manutenção da

matriz extracelular. Os fibroblastos sintetizam fibras de colagénio e elastina, que conferem resistência e elasticidade à pele. Para além disso, esta camada contribui para a fixação dos queratinócitos e para a sua diferenciação, através da libertação de fatores de crescimento por parte dos fibroblastos. Na derme localizam-se muitas estruturas anexas, nomeadamente, as glândulas sudoríparas, as glândulas sebáceas, os folículos pilosos, bem como os vasos sanguíneos e as terminações nervosas. Todas estas estruturas apresentam funções muito importantes para o bom funcionamento da pele [54,56,57].

A hipoderme é a camada mais interna e é constituída por tecido conjuntivo e por uma camada de tecido adiposo, cuja espessura varia de acordo com a região do corpo. A presença do tecido adiposo é muito importante, uma vez que este é responsável pela diminuição de um impacto perante um trauma, pela manutenção da temperatura corporal e pelo armazenamento de energia [54,56].

Em suma, a pele é um órgão essencial do nosso organismo, constituindo a principal barreira entre o interior e o exterior do mesmo. Esta apresenta diversas funções que são importantes para a nossa homeostasia corporal, como a proteção contra ameaças externas (microrganismos, substâncias tóxicas, danos mecânicos e radiação UV), a receção de informações do ambiente, a regulação térmica do organismo, a excreção de substâncias tóxicas, a função imunitária e a produção de vitamina D. Devido à sua importância, é essencial manter a barreira da pele saudável e ter vários cuidados diários [54,58].

1.2.2. Envelhecimento da pele

O envelhecimento da pele é um processo natural e espontâneo e caracteriza-se pelo aparecimento de rugas e manchas e pelo aumento da fragilidade da pele [59].

O aparecimento de rugas deve-se sobretudo à sobre-expressão de enzimas responsáveis pela destruição da matriz extracelular, nomeadamente a collagenase, a elastase e a hialuronidase. A matriz extracelular é constituída por moléculas que conferem suporte às células envolventes, daí que a sua destruição leve ao aparecimento de rugas e à diminuição da elasticidade da pele [60].

Uma das moléculas que existe na matriz extracelular e que confere firmeza à pele é o colagénio. Esta é a proteína que existe em maior quantidade no organismo humano e existem vários tipos de fibras de colagénio, sendo que as fibras do tipo I são as mais abundantes e as que se encontram presentes na derme. O colagénio é constituído essencialmente por glicina (Gly), prolina (Pro), hidroxiprolina e hidroxilisina.

A síntese de colagénio dá-se a partir de cadeias precursoras que são secretadas por fibroblastos. A renovação do colagénio é um processo muito lento e implica que este seja primeiramente degradado. A degradação do colagénio é realizada por enzimas específicas, as collagenases [54,61].

A elastina também está presente na matriz extracelular e confere elasticidade à pele. Esta proteína é constituída maioritariamente por Gly e Pro e por dois aminoácidos não comuns (desmosina e isodesmosina, ambos derivados da lisina (Lys)). A síntese de elastina é análoga à síntese do colagénio e esta molécula é degradada facilmente pela elastase, uma protease de serina [54,62].

Para além das fibras de colagénio e elastina, a matriz extracelular é preenchida por uma mistura bastante complexa de moléculas carregadas negativamente (glicosaminoglicanos e proteoglicanos) e glicoproteínas. Esta mistura contribui para a hidratação da pele e protege contra microrganismos invasores. Um dos constituintes da matriz é o ácido hialurónico, que é um biopolímero constituído por ácido glucurónico (GlcA) e *N*-acetilglicosamina (GlcNAc). O ácido hialurónico é o único glicosaminoglicano não sulfatado e é capaz de se associar a proteínas formando agregados moleculares. Esta molécula apresenta várias funções, sendo uma das principais responsáveis pela hidratação e volume da pele [63]. Na pele, esta molécula está continuamente a ser produzida e degradada, apresentando um tempo de semivida de, aproximadamente, 1 dia na pele. O ácido hialurónico pode ser hidrolisado por enzimas, designadas de hialuronidases, em fragmentos de tamanho variável, mas também pode ser degradado não enzimaticamente por um mecanismo que envolve a formação de radicais livres, na presença de agentes redutores [54,63].

A síntese de colagénio, elastina e ácido hialurónico tem tendência a diminuir com a idade e a sua degradação tem tendência a aumentar (**Fig. 1.6**). Apesar de serem essenciais ao normal funcionamento da pele, as enzimas collagenase, elastase e hialuronidase são sobre-expressas durante o envelhecimento [60]. Assim, para travar o envelhecimento da pele, têm sido efetuados vários estudos, nomeadamente, no sentido de aumentar os níveis destes componentes da matriz extracelular [64] e de inibir ou reduzir a atividade destas enzimas [65-67].

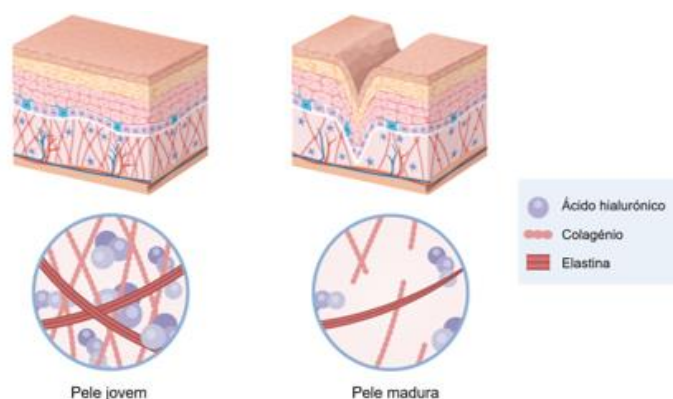


Fig. 1.6 - Envelhecimento da pele: esquema exemplificativo da destruição do colagénio, da elastina e do ácido hialurónico. Adaptado de [68].

Outra das características de uma pele envelhecida é o aparecimento de manchas irregulares de melanina, o que se deve sobretudo à sobre-expressão da enzima tirosinase. A melanina é sintetizada nos melanossomas, que são vesículas que existem nos melanócitos. O passo limitante da sua síntese é catalisado pela tirosinase. A melanina é muito importante, pois, para além de dar coloração à pele, ao cabelo e aos olhos, protege o organismo da radiação UV. Durante o envelhecimento, a tirosinase é sobre-expressa e, consequentemente, aparecem manchas irregulares na pele [54,69]. Por isso, também têm sido realizados estudos com intuito de inibir a atividade da tirosinase [70,71].

O envelhecimento pode ser acelerado por diversos fatores, quer endógenos, quer exógenos. Os fatores endógenos estão relacionados com a genética e o metabolismo de cada indivíduo. Os fatores exógenos podem estar associados a determinadas substâncias químicas e à radiação UV. Geralmente, estes fatores exógenos desencadeiam reações responsáveis pela formação de espécies reativas de oxigénio, que são capazes de provocar alterações em todas as biomoléculas celulares e alterar diversas vias de sinalização. Para se proteger do stresse oxidativo, o organismo produz enzimas com uma ação antioxidante (a catalase e a superóxido dismutase) e antioxidantes endógenos (como a glutathione). Contudo, quando envelhecemos, estas enzimas tendem a diminuir a sua atividade e os danos celulares têm tendência a aumentar [72].

Dada a atenção crescente que as pessoas dão à sua aparência e à saúde da sua pele, a prevenção do envelhecimento e a promoção do bem-estar da pele revelam-se bastante importantes. Assim, esta prevenção pode ser feita através do uso de inibidores da atividade de enzimas sobre-expressas durante o envelhecimento, de modeladores celulares ou de antioxidantes [73].

Deste modo, e devido às potenciais propriedades das antocianinas, estas poderão ser utilizadas para prevenir o envelhecimento e promover o bem-estar da pele (por exemplo, como inibidores da atividade das enzimas que são sobre-expressas, como moléculas antioxidantes e como agentes protetores contra a radiação UV). Vários estudos têm vindo a demonstrar o efeito benéfico das antocianinas neste órgão e em seguida, serão descritos alguns exemplos.

De acordo com um estudo realizado numa linha celular de fibroblastos da pele humana normal e em ratos ovariectomizados, o extrato de groselhas pretas rico em antocianinas levou a um aumento dos níveis de proteínas características da matriz extracelular (como o colagénio, a elastina e o ácido hialurónico) [64]. Por outro lado, o extrato de uvas tintas (bastante rico em polifenóis, nomeadamente em antocianinas) também mostrou ser capaz de inibir a collagenase e a elastase [66]. Relativamente à hialuronidase, polifenóis provenientes de amora foram capazes de inibir esta enzima e, no que diz respeito à tirosinase, antocianinas provenientes de feijão vermelho mostraram ter um efeito inibitório sobre esta enzima [71].

Para além disso, o extrato de antocianinas de PFSP também foi considerado um agente antienvelhecimento. Este foi capaz de atenuar o stresse oxidativo da pele causado pela radiação UV-B bem como reduzir a degradação do colagénio e a formação de rugas [74].

Tendo em conta os resultados promissores associados ao uso de extratos de antocianinas para o bem-estar da pele, uma primeira abordagem para a sua utilização poderia ser a sua incorporação em loções e cremes faciais. Contudo, a sua baixa solubilidade em meios lipofílicos e a sua baixa estabilidade ao longo do tempo de exposição a variações de pH, de temperatura e à luz poderão comprometer a sua aplicação em formulações cosméticas [26,27]. Assim, surge a necessidade de imobilizar estes compostos noutro tipo de matrizes, como é o caso dos substratos têxteis.

1.3. Têxteis funcionais

Nos últimos anos, tem havido uma grande evolução na área da indústria têxtil, com o objetivo de produzir têxteis funcionais. Nos primórdios da Humanidade, o vestuário era utilizado apenas com o propósito de cobrir o corpo e protegê-lo contra ameaças externas. Ao longo dos anos, foi surgindo uma preocupação com o conforto e aparência do mesmo, dando-se também importância à moda em vigor. Na atualidade, apesar destes aspetos serem considerados importantes, tem-se vindo a apostar em

têxteis com diversas funções úteis para o Homem, nomeadamente para fins medicinais e cosméticos [75,76].

1.3.1. Funcionalização dos têxteis

Existem diferentes tipos de substratos têxteis e estes podem ser divididos em dois grandes grupos: têxteis de origem natural e têxteis de origem sintética (**Fig. 1.7**) [77].

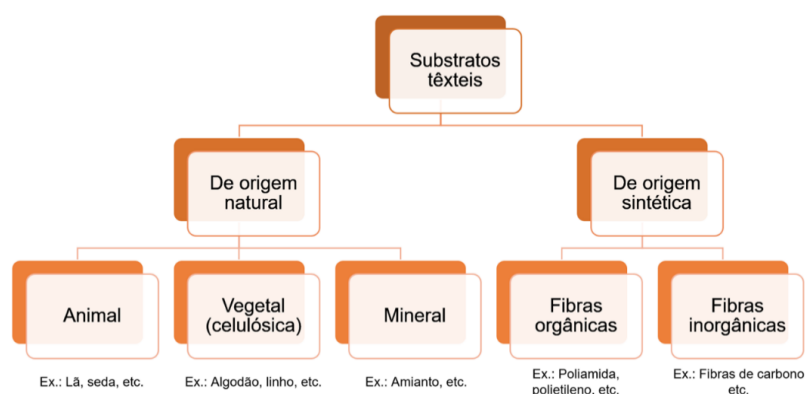


Fig. 1.7 - Diferentes tipos de substratos têxteis e respetivos exemplos. Adaptado de [77].

O tipo de têxtil utilizado, o diâmetro das fibras que constituem o têxtil e o processo de fiação influenciam bastante o tipo de funções que estes podem adquirir [76]. Para além disso, os têxteis podem adquirir as suas funções através da funcionalização das fibras durante a sua própria produção ou durante o acabamento têxtil, o que implica a modificação da sua superfície, por exemplo, através da deposição e fixação de determinados compostos [78,79].

A funcionalização das fibras durante a sua produção por processos de fiação (*spinning*) não é um processo muito frequente. Na maioria das situações, é o acabamento da superfície que confere a maioria das funcionalidades aos substratos, uma vez que este processo é mais simples, mais económico e diminui o tempo de produção na indústria têxtil [80].

Os têxteis podem ser funcionalizados através da incorporação de diversos compostos, como moléculas orgânicas, nanomateriais inorgânicos e materiais poliméricos [81]. A seleção dos compostos a imobilizar nos substratos têxteis e o modo de imobilização dos mesmos devem ser feitos tendo em conta a função que se pretende atribuir a esse mesmo substrato e também a preservação de algumas características originais do têxtil, como a flexibilidade, a durabilidade e a resistência mecânica [82]. A escolha do modo de aplicação dos compostos ativos em substratos têxteis também deve

ser feita tendo em conta um aspeto muito importante: em alguns casos, os compostos devem permanecer de uma forma mais duradoura nos têxteis e não devem ser libertados para a pele humana (por exemplo, os têxteis com ação antimicrobiana) e, noutras situações, os compostos ativos devem ser libertados para a pele de modo a exercerem o seu efeito (como é o caso dos têxteis com uma ação antienvelhecimento). Do ponto de vista económico e ambiental, também se deve promover a reutilização dos substratos têxteis. Por isso, o modo de incorporação dos compostos deve ser feito recorrendo a técnicas adequadas que permitam que estes têxteis tenham uma utilização mais duradoura e sejam mais resistentes às lavagens [83].

Antes da funcionalização dos têxteis, por vezes, é necessária uma preparação prévia dos mesmos. O objetivo desta fase é remover a maioria das impurezas indesejáveis para que os compostos ativos possam depositar-se uniformemente nos substratos têxteis [84].

Os compostos ativos podem ser incorporados diretamente nos têxteis [85] ou podem ser usadas outras estratégias, como, por exemplo, a adição de outras substâncias (os mordentes) que facilitam a imobilização desses compostos ativos [85] ou a encapsulação dos mesmos em microcápsulas [86] e nanomateriais [80].

No caso da aplicação direta, os compostos escolhidos devem ser capazes de estabelecer interações favoráveis com os substratos têxteis, ou seja, devem ter grupos funcionais que tenham afinidade com os grupos funcionais do substrato têxtil. Geralmente, este tipo de imobilização ocorre em substratos têxteis como o algodão e a lã, que possuem grupos $-OH$ e $-NH_2$ na sua superfície que interagem facilmente com determinados compostos. A interação entre os compostos ativos e os substratos têxteis pode ser feita através de ligações covalentes, interações eletrostáticas, pontes de hidrogénio, interações hidrofílicas e hidrofóbicas, forças de *Van der Waals* (*VdW*) e por adsorção física [85,87].

Tal como já foi referido, para além da aplicação direta podem ser usados compostos fixadores que estabelecem pontes entre o composto ativo e o substrato têxtil, como é o caso dos mordentes. Geralmente estes são utilizados com corantes para promover a fixação da cor, quando esses compostos apresentam baixa estabilidade ou quando têm pouca afinidade para os substratos têxteis. Na maioria dos casos, esses mordentes são sais metálicos (como, por exemplo, sais de alumínio, de cobre, de ferro e de potássio) que podem formar complexos de coordenação com os corantes. Apesar de melhorarem significativamente a estabilidade dos compostos a imobilizar, o uso de sais metálicos como mordentes pode originar alguma toxicidade para o organismo se

estes forem libertados dos substratos têxteis em grande quantidade. Por outro lado, também podem ser utilizados biomordentes (por exemplo, compostos ricos em taninos) para substituir os mordentes de sais metálicos, uma vez que ao estabelecerem facilmente pontes de hidrogénio com os substratos têxteis contribuem para a imobilização dos compostos nos substratos [85,88].

A aplicação direta ou indireta dos compostos ativos em substratos têxteis pode ser realizada por tingimento, revestimento, laminação ou impressão da superfície dos têxteis [80]. Um dos processos mais utilizados na atualidade é o tingimento, uma vez que este processo é simples e aproveita o equipamento tradicional já utilizado nas indústrias têxteis para tingir os substratos e conferir-lhes cor. Existem duas estratégias de tingimento de têxteis: a impregnação e o esgotamento. A escolha de uma delas depende do tipo de têxtil e da afinidade do composto a imobilizar no têxtil [89]. Relativamente ao processo de esgotamento, o substrato têxtil é colocado no banho que contém o composto a imobilizar, durante 1 ou mais horas. Ao longo desse período de tempo, os compostos vão sendo transferidos do banho para o substrato têxtil, havendo, inicialmente uma adsorção à superfície e, posteriormente, estes difundem-se para o interior das fibras. Este processo requer que haja um controlo das condições de tingimento, como a temperatura, o tempo, o pH, a concentração dos compostos e a adição de agentes auxiliares que facilitem a imobilização dos compostos ativos, como é o caso dos mordentes. No final, o substrato têxtil deve ser seco e lavado [80]. No que diz respeito ao processo de impregnação, o têxtil é mergulhado no banho que contém os compostos a imobilizar e depois é espremido, através da passagem por rolos. Deste modo, os compostos ficam imobilizados no substrato têxtil e é removido o excesso de solução. Neste caso, é importante controlar a pressão e a velocidade dos rolos para além das condições do banho referidas anteriormente. Em seguida, o substrato têxtil é seco e é promovida a fixação dos compostos [67]. O método de esgotamento é o mais utilizado na indústria têxtil para o tingimento, pois permite uma melhor difusão do corante para o interior da fibra, já que o substrato têxtil se encontra mergulhado no banho. Por outro lado, o método de impregnação é o mais utilizado para a funcionalização dos substratos têxteis, uma vez que permite que o composto bioativo fique mais à superfície da fibra e fique distribuído de um modo uniforme [89].

Os têxteis funcionais apresentam propriedades peculiares, que são bastantes vantajosas para o indivíduo que os utiliza. Na **Tabela 1.2** são apresentados alguns exemplos de diferentes tipos de têxteis funcionais e as suas características.

Tabela 1.2 - Diferentes tipos de têxteis funcionais e respetivas características. Adaptado de [90]

Função	Características
Hidratação	Efeito hidratante na pele humana através, por exemplo, de uma camada de óleo para minimizar a perda de água da pele
Energética	Melhoria do nível de energia nos seres humanos
Emagrecimento	Propriedades que promovem o emagrecimento; efeito de compressão progressiva
Perfumar	Absorção de odores desagradáveis e libertação de perfumes agradáveis
Relaxamento	Libertação de compostos com um efeito relaxante para a pele (ex.: lavanda,...)
Revitalizante	Libertação de compostos revitalizantes (ex.: gengibre, mentol, laranja,...)
Proteção UV	Proteção contra a radiação UV
Antimicrobiana	Destruição de microrganismos patogénicos
Repelência de insetos	Libertação de compostos que repelem insetos
Antienvelhecimento	Melhoria da firmeza e da elasticidade da pele

1.3.2. Cosmetotêxteis

Os têxteis com propriedades cosméticas têm sido alvo de uma investigação crescente, uma vez que, de uma forma geral, a população preocupa-se cada vez mais com o bem-estar da pele e com a possibilidade de usar vestuário com efeitos cosméticos [90].

O uso de cosmetotêxteis pode constituir uma boa alternativa aos cremes e loções corporais, uma vez que a imobilização dos compostos ativos nos substratos têxteis poderá melhorar a sua estabilidade e permitir a sua libertação controlada para a pele. O controlo da taxa de composto libertada é muito importante, de modo a que não seja libertada uma quantidade tão elevada que possa ser prejudicial e para que seja libertada uma quantidade suficiente para que o produto tenha os efeitos pretendidos [91,92].

De acordo com a Diretiva Europeia [93], o termo cosmetotêxtil designa “qualquer produto têxtil que contém um composto ou preparação que se liberta, ao longo do tempo, em diferentes partes da superfície do corpo humano, especialmente na pele humana, e que contém funcionalidades especiais, como limpeza, perfume, mudança de aparência, proteção (física e química), manutenção de boas condições fisiológicas ou correção de odores corporais”. Assim, os cosmetotêxteis são capazes de proteger a

pele da ação de agentes externos prejudiciais e contribuem para a saúde e bem-estar da pele [90].

A investigação na área dos cosmetotêxteis teve início no final da década de 1980 no Japão e, só em 1995, é que a Europa se começou a destacar nessa área [94]. Nesse mesmo ano, a *Hermès* (França) introduziu os primeiros lenços perfumados com recurso a microcápsulas no mercado europeu [95]. Contudo, estes não tiveram muito sucesso e, apenas, em 2001, foi lançada a primeira marca registada de cosmetotêxteis, a *SKINTEX*[®], que foi patenteada pela *Cognis Textile Technology* (Alemanha). Estes cosmetotêxteis foram obtidos a partir da técnica de microencapsulação: os ingredientes bioativos (como o retinol e o extrato de algas vermelhas) foram encapsulados em microcápsulas de quitosano e estas foram imobilizadas nos têxteis. O calor do corpo e o atrito causado pelo uso da roupa levam a uma libertação lenta desses ingredientes para a pele e, deste modo, estes podem exercer o seu efeito anticelulite, antiestrias e antirrugas [91]. Atualmente, o número de empresas que produzem cosmetotêxteis e o número de diferentes ingredientes ativos que são incorporados em têxteis estão em constante crescimento [91]. Em 2004, a União Europeia decidiu criar um grupo para estudar métodos de validação de eficácia, toxicidade e durabilidade para cosmetotêxteis e, em 2009, o Comité Europeu de Normalização aprovou um relatório técnico que afirmava que os ingredientes incluídos nos cosmetotêxteis deveriam ser tão seguros como aqueles que são aplicados em meios convencionais [91].

Existem diferentes tipos de cosmetotêxteis. Estes podem ser classificados tendo em conta a forma como as fibras têxteis se encontram estruturadas em: cosmetotêxteis à base de tecido, cosmetotêxteis à base de malhas e cosmetotêxteis à base de tecido não tecido [94].

Para além disso, estes também podem ser classificados de acordo com o modo de incorporação dos compostos ativos em: cosmetotêxteis criados pela inserção dos aditivos nas fibras durante o processo de fiação, cosmetotêxteis criados por aplicação direta do composto ativo durante a fase de acabamento têxtil, cosmetotêxteis criados por aplicação indireta do composto ativo através de moléculas fixadoras e cosmetotêxteis criados por aplicação do composto ativo incorporado em microcápsulas (estes dois últimos modos de incorporação são realizados durante a fase de acabamento têxtil) [94].

Os cosmetotêxteis podem ainda ser classificados de acordo com o tipo de compostos incorporados nos mesmos em: cosmetotêxteis que contêm compostos orgânicos e cosmetotêxteis que contêm compostos inorgânicos. Os compostos

orgânicos podem ser de origem vegetal (como óleos essenciais, vitamina E, aloé vera) ou de origem animal (como o esqualeno e o quitosano). Alguns exemplos de compostos/nanomateriais inorgânicos são as nanopartículas de óxido de zinco e de óxido de titânio [94].

Por último, os cosmetotêxteis também podem ser classificados de acordo com a função que exercem no corpo humano: emagrecimento, hidratação, ação revitalizante, ação energética, libertação de aromas, relaxamento, proteção contra a radiação UV e melhoria da firmeza e da elasticidade da pele [94].

Apesar das antocianinas terem sido aplicadas em substratos têxteis, nunca foram aplicadas como ingredientes cosméticos. Até à atualidade, estes compostos têm sido usados como corantes naturais. Estudos realizados com antocianinas provenientes de mirtilo [85], de amora [87], de bagaço de uva [96] e de PFSP [97] em substratos de algodão mostraram que estes compostos foram utilizados com sucesso como corantes naturais. Para além do algodão, também já foram testados outros substratos têxteis, como a lã [96] e a seda [97]. Nestes estudos em que as antocianinas são utilizadas como corantes, foram testadas várias abordagens para melhorar a afinidade destes compostos pelos substratos têxteis, nomeadamente o uso de mordentes [85,87,96] e o uso de nanopartículas de prata e de dióxido de titânio [97,98].

Assim, este projeto pretende ir mais além dos estudos realizados anteriormente, uma vez que tem como objetivo a aplicação das antocianinas em têxteis para fins cosméticos.

2. Objetivos

Este projeto teve como principal objetivo a reciclagem de antocianinas provenientes de resíduos agroalimentares, de modo a produzir cosmetotêxteis que possam ser utilizados para prevenir o envelhecimento e contribuir para o bem-estar e saúde da pele.

Neste trabalho, foram estudadas as potenciais propriedades de um extrato de antocianinas proveniente de amora, no tingimento de substratos têxteis de algodão e poliamida e procedeu-se a uma avaliação do efeito desses substratos nas células da pele.

A primeira fase do projeto teve como principal propósito a purificação, caracterização estrutural e química do extrato e avaliação da sua atividade antioxidante.

Numa segunda fase, o objetivo foi imobilizar diretamente o extrato de antocianinas em substratos têxteis de algodão e poliamida, testando vários fatores que podem afetar o processo de tingimento, como o efeito do pH, da temperatura, da concentração de antocianinas e da presença e tipo de mordente.

A última fase deste trabalho teve como principal finalidade a avaliação do efeito das antocianinas provenientes do extrato de amora e dos substratos têxteis de algodão tingidos em modelos celulares de pele. Para tal, foram realizados ensaios de libertação com suor artificial, ensaios de citotoxicidade, ensaios de inibição enzimática e ainda um estudo teórico com a enzima hialuronidase.

Assim, este estudo destaca-se de outros trabalhos realizados anteriormente com extratos de antocianinas e substratos têxteis, pois, neste caso, as antocianinas não foram apenas utilizadas como corantes naturais mas também como ingredientes cosméticos. Deste modo, aproveitando o facto de as antocianinas serem compostos com cor e aliando esta característica às suas propriedades biológicas, foi possível obter têxteis visualmente atrativos que podem ser usados para combater o envelhecimento e promover o bem-estar da pele.

3. Materiais e Métodos

Este capítulo encontra-se dividido em duas subsecções. Numa primeira parte, serão mencionados os materiais, reagentes e solventes necessários à execução deste trabalho. Numa segunda fase, serão descritos todos os procedimentos experimentais realizados. Primeiramente, será referida a metodologia relacionada com a purificação e caracterização do extrato de antocianinas de amora. Posteriormente, serão apresentados os procedimentos referentes à imobilização das antocianinas nos substratos têxteis. Irão também ser descritas as técnicas utilizadas para a caracterização dos têxteis: colorimetria, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada (FTIR-ATR) e espectroscopia fotoeletrónica de raios-X (XPS). Na parte das técnicas, será efetuada uma breve referência aos seus fundamentos e princípios básicos e também será descrita a instrumentação bem como as condições utilizadas em cada uma delas. De seguida, será abordada a metodologia usada nos ensaios de libertação das antocianinas dos substratos têxteis para o suor artificial. Posteriormente, serão descritos os procedimentos referentes aos ensaios biológicos realizados, nomeadamente os ensaios de citotoxicidade e os que dizem respeito ao efeito das antocianinas na atividade das enzimas da pele. Por último, será abordado um estudo de *docking* molecular realizado com uma das enzimas estudadas, a hialuronidase.

3.1. Materiais, reagentes e solventes

O sulfato de alumínio e potássio dodecaidratado ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (99,5%), de qualidade para análise (p.a.), foi adquirido à *Acros Organics*. O *N*-[3-(2-furil)acrilóil]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) e o *N*-Succinil-Ala-Ala-Ala-*p*-Nitroanilido (*N*-Suc-Ala-Ala-Ala-*p*-NA) foram adquiridos à *Bachem*. O acetonitrilo ($\geq 99,9\%$), de qualidade para cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), o ácido acético ($\geq 99\%$) e o metanol ($\geq 99,8\%$), ambos de qualidade p.a., foram adquiridos à *Chem-Lab*. O meio *Eagle* modificado por *Dulbecco* (DMEM) foi adquirido à *Cell Lines Service*. O etanol absoluto ($\geq 99,8\%$) e o tolueno (99,98%), ambos de qualidade p.a., foram adquiridos à *Fisher Scientific*. A collagenase de *Clostridium histolyticum* do tipo I (255,00 U/mg) foi adquirida à *Gibco*. O ácido clorídrico ($\geq 37\%$) e o cloreto de sódio ($\geq 99,5\%$), ambos de qualidade p.a., foram adquiridos à *Honeywell Fluka*. O acetato de etilo ($\geq 99,5\%$), de qualidade p.a., foi adquirido à *LabChem*. O sulfato de alumínio(III) ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, $\geq 99\%$), de qualidade p.a., foi adquirido à *May & Baker Laboratory Chemicals*. O ácido nítrico concentrado (65%),

de qualidade p.a., e o gel sílica de fase reversa RP-18 (40-63 μm) *LiChroprep* (C18) foram adquiridos à *Merck*. O hidróxido de sódio ($\geq 98,0\%$), de qualidade p.a., e as pastilhas de tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4) foram adquiridos à *PanReac Applichem*. O acetato de sódio (99%), a albumina de soro bovino (BSA, $\geq 98\%$), o azul tripano, o brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT, 98%), o brometo de hexadeciltrimetilamónio (CTAB, $\geq 98\%$), o carbonato de sódio ($\geq 99,5\%$), o cloreto de ferro(III) ($>97\%$), o 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), o dimetilsulfóxido (DMSO, $\geq 99,5\%$), a elastase pancreática de porco (4 U/mg), o fosfato de sódio monobásico di-hidratado ($\geq 99,0\%$), a hialuronidase de testículos bovinos do tipo I-S (400-1000 U/mg), a L-glutamina, o monoclórato de L-histidina monoidratada (98,5-101,0%), o reagente de Bradford, o reagente de fenol de Folin-Ciocalteu, o sal de sódio do ácido hialurónico de crista de galo, a solução de antibiótico/antimicótico (100 unidades/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina e 0,25 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B), o soro bovino fetal (FBS), a tirosinase de cogumelo (7164 U/mg), a tripsina, a Tris-base ($\geq 99,9\%$) e o 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ, $\geq 99,0\%$) foram adquiridos à *Sigma-Aldrich*. A quercetina-3-galactósido ($>98\%$), de qualidade HPLC, foi adquirida à *TransMIT*. A 3-(3,4-di-hidroxifenil)-L-alanina (L-DOPA, $>98,0\%$) foi adquirida à *Tokyo Chemical Industry*. O ácido fórmico (99-100%), de qualidade p.a., foi adquirido à *VWR Chemicals*.

As amoras foram gentilmente cedidas pelo Professor Pedro Oliveira da Herdade Experimental do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, Fataca, Odemira).

As malhas de algodão e poliamida foram gentilmente cedidas pela Doutora Carla Silva do Centro Tecnológico das Indústrias Têxtil e do Vestuário de Portugal (CITEVE, Vila Nova de Famalicão, Portugal).

As linhas celulares de queratinócitos (HaCat) foram adquiridas à *Cell Lines Service*.

3.2. Métodos

3.2.1. Purificação e caracterização estrutural do extrato de antocianinas de amora

3.2.1.1. Purificação do extrato de antocianinas

A extração de antocianinas de amora foi realizada de acordo com a literatura [99], com algumas modificações. O extrato rico em antocianinas de amora foi obtido a

partir de 1,0 kg de amoras congeladas. Realizou-se uma primeira extração com 2,0 L de solução 50% de metanol acidificado com HCl 0,1 mol/L, durante 1 hora e com agitação, e, posteriormente, procedeu-se a uma segunda extração com 5,0 L da mesma solução, durante 24 horas, também com agitação. A solução obtida foi colocada no evaporador rotativo, a uma temperatura de 40 °C e a 210 rotações por minuto (rpm), para evaporar o solvente metanol. Aplicou-se a fase aquosa num funil de Büchner que continha gel de fase reversa C18, para retirar açúcares que ainda estavam presentes na solução e efetuou-se a eluição das antocianinas do gel com recurso a 50% de metanol acidificado com HCl 0,7 mol/L. Para a purificação da cy-3-glc, a antocianina maioritária do extrato de antocianinas de amora, procedeu-se da mesma forma, exceto a eluição do gel que, neste caso, foi realizada apenas com 10% de metanol acidificado. Em ambos os casos, o metanol foi evaporado e a solução obtida foi concentrada e liofilizada. A cy-3-glc foi purificada com o objetivo de estudar a contribuição desta antocianina para as propriedades biológicas do extrato.

3.2.1.2. Caracterização do extrato de antocianinas

Com o objetivo de compreender a composição química do extrato de antocianinas de amora, foi avaliado o seu conteúdo em antocianinas, polifenóis de baixo peso molecular, flavonóis, fenóis totais, água e proteínas. Para além disso, foi determinado o seu poder antioxidante e antirradicalar.

a) Determinação do conteúdo em antocianinas, polifenóis de baixo peso molecular e flavonóis

a.1) Análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de rede de díodos

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de rede de díodos (HPLC-DAD) é um método de separação de substâncias químicas em solução. Esta técnica utiliza uma fase móvel líquida para separar os componentes da amostra, que são forçados a passar por uma coluna a alta pressão que contém a fase estacionária. Neste trabalho foi utilizada a cromatografia de fase reversa, que apresenta esta designação, pois, ao contrário da cromatografia líquida de fase normal (a primeira a ser desenvolvida), possui uma fase estacionária apolar e uma fase móvel polar. Assim, a cromatografia de fase reversa recorre a uma fase estacionária constituída por materiais empacotadores, tais como a sílica gel conjugada com uma cadeia carbonada

de 18 carbonos, que são mais hidrofóbicos do que a fase móvel (geralmente, solventes como o metanol, o acetonitrilo e a água) [100]. Como os compostos em estudo possuem diferentes estruturas moleculares, estes terão diferentes afinidades pela fase estacionária e pela fase móvel e, por isso, serão eluídos da coluna cromatográfica em instantes diferentes (tempos de retenção), o que permitirá a sua separação. A aquisição de dados pode ser realizada com recurso a diferentes tipos de detetores, tais como o detetor de rede de díodos (DAD), que permite medir, em simultâneo, a intensidade de radiação UV e visível a vários comprimentos de onda e registar, deste modo, o espectro de absorção da amostra.

O extrato de antocianinas de amora foi caracterizado, no que diz respeito à composição em antocianinas, e o grau de pureza da cy-3-glc foi avaliado, utilizando condições experimentais descritas na literatura [101], com algumas modificações. No caso do extrato de amora, procedeu-se a uma quantificação do conteúdo em antocianinas em equivalentes de cy-3-glc (a antocianina maioritária do extrato). Para tal, foram preparadas soluções aquosas de extrato de antocianinas de amora a uma concentração de 0,5 mg/mL em triplicado. Para além disso, foram preparadas soluções padrão de cy-3-glc com concentrações conhecidas (0,125; 0,250; 0,500 e 0,750 mg/mL) também em triplicado. As amostras e as soluções padrão foram analisadas por cromatografia líquida (Dionex Ultimate 3000, *Thermo Scientific*) de fase reversa em coluna de gel C18 (comprimento da coluna: 250 mm; diâmetro interno (i.d.): 4,6 mm; tamanho do poro: 5 μ m, *Thermo Scientific*). Os solventes usados foram (A) água/ácido fórmico 9/1 (razão volume/volume - V/V) e (B) água/acetonitrilo/ácido fórmico 6/3/1 (V/V/V), com o seguinte gradiente: 80-15% de A e 20-85% de B durante 70 minutos e 15-0% de A e 85-100% de B dos 70 aos 70,1 minutos, com um fluxo de 1,0 mL/minuto. A coluna cromatográfica foi lavada com 100% de B durante 10 minutos e depois foi estabilizada com as condições iniciais durante 10 minutos. A deteção foi realizada com recurso a um detetor DAD, tendo sido efetuado um varrimento entre os comprimentos de onda $\lambda = 200$ e $\lambda = 600$ nm, com obtenção do cromatograma a $\lambda = 280$ e a $\lambda = 520$ nm. Para a análise de resultados, foi utilizado o *software Chromeleon 7.2.*, tendo sido determinadas as áreas dos picos presentes nos cromatogramas obtidos. A partir das soluções padrão com concentrações conhecidas e das respetivas áreas dos picos, traçou-se uma curva de calibração ($y = 2363,8x + 69,404$, $R^2 = 0,9973$) e, desse modo, calculou-se a concentração de antocianinas presentes no extrato de amora.

Para determinar o conteúdo em polifenóis de baixo peso molecular e flavonóis presentes no extrato de amora, foram também usadas soluções de extrato de

antocianinas de amora a uma concentração de 0,5 mg/mL. Este ensaio foi realizado em microtubos e foram feitos triplicados. A cada microtubo, foram adicionados 600 µL de amostra, 600 µL de acetato de etilo e 300 µL de acetonitrilo. Posteriormente, as amostras foram misturadas num agitador durante 10 segundos e centrifugadas durante 5 minutos a 8000 rpm. Após a centrifugação, a fase orgânica foi retirada e o procedimento foi repetido para a fase aquosa. As fases orgânicas obtidas foram combinadas e evaporadas num concentrador a vácuo. O precipitado foi ressuspenso em 60 µL de água e 60 µL de metanol.

Relativamente ao seu conteúdo em polifenóis de baixo peso molecular em equivalentes de ácido gálico, foram ainda preparadas soluções padrão de ácido gálico com concentrações conhecidas (0,0001; 0,0017; 0,0034; 0,0085; 0,0170; 0,0340 e 0,1701 mg/mL) em triplicado. As amostras de extrato e as soluções padrão foram avaliadas, utilizando condições experimentais descritas na literatura [102], com algumas modificações. Estas foram analisadas por cromatografia líquida (Dionex Ultimate 3000, *Thermo Scientific*) de fase reversa em coluna de gel C18 (comprimento da coluna: 150 mm; i.d.: 4,6 mm; tamanho do poro: 5 µm, *Thermo Scientific*). Os solventes usados foram (A) água/ácido acético (99/1) (V/V) e (B) água/acetonitrilo/ácido acético 79/20/1 (V/V/V), com o seguinte gradiente: 80-20% de A e 20-80% de B durante 55 minutos, 20-10% de A e 80-90% de B dos 55 aos 70 minutos e 10-0% de A e 90-100% de B dos 70 aos 90 minutos, a um fluxo de 0,3 mL/minuto. A coluna cromatográfica foi lavada com 100% de B durante 10 minutos e depois foi estabilizada com as condições iniciais durante 15 minutos. A deteção foi realizada com recurso a um detetor DAD, tendo sido efetuado um varrimento entre os comprimentos de onda $\lambda = 200$ e $\lambda = 600$ nm, com obtenção do cromatograma a $\lambda = 280$ nm. Para a análise de resultados, foi utilizado o *software Chromeleon 7.2.* e foram determinadas as áreas dos picos presentes nos cromatogramas obtidos. Foi traçada uma curva de calibração ($y = 1932,4x + 0,180$, $R^2 = 0,9999$) a partir das soluções padrão com concentrações conhecidas e das respetivas áreas dos picos, e, desse modo, calculou-se a concentração de polifenóis de baixo peso molecular presentes no extrato de antocianinas.

Com o objetivo de determinar a quantidade de flavonóis, em equivalentes de quercetina, presentes no extrato de amora, foram preparadas soluções padrão de quercetina-3-galactósido com concentrações conhecidas (0,050; 0,100; 0,150 e 0,200 mg/mL) também em triplicado. As amostras de extrato e as soluções padrão foram avaliadas, utilizando condições experimentais descritas na literatura [103], com algumas modificações. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida (Dionex Ultimate

3000, *Thermo Scientific*) de fase reversa em coluna de gel C18 (comprimento da coluna: 150 mm; i.d.: 4,6 mm; tamanho do poro: 5 μ m, *Thermo Scientific*). Os solventes usados foram (A) água/ácido fórmico 99/1 (V/V) e (B) acetonitrilo, com o seguinte gradiente: 90-50% de A e 10-50% de B durante 50 minutos, 50-0% de A e 50-100% de B dos 50 aos 70 minutos, 0% de A e 100% de B durante 10 minutos e depois foi estabilizada com as condições iniciais durante 10 minutos, com um fluxo de 0,5 mL/minuto. A detecção foi realizada com recurso a um detetor DAD, tendo sido efetuado um varrimento entre os comprimentos de onda $\lambda = 200$ e $\lambda = 600$ nm, com obtenção do cromatograma a $\lambda = 370$ nm. O *software Chromeleon 7.2* foi utilizado para a análise de resultados. Para esta quantificação, foram determinadas as áreas dos picos presentes nos cromatogramas obtidos. A partir das soluções padrão com concentrações conhecidas e das respetivas áreas dos picos, traçou-se uma curva de calibração ($y = 2530,6x + 53,190$, $R^2 = 0,9933$) e, desse modo, foi calculada a concentração de flavonóis presentes no extrato de antocianinas de amora.

a.2) Análise por cromatografia líquida de alta eficiência com espetrometria de massa

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com espetrometria de massa (HPLC-MS) é uma técnica que combina a capacidade de separação de compostos em solução por HPLC com a capacidade de confirmar a sua identidade molecular por espetrometria de massa (MS). Inicialmente, os componentes da amostra são separados por HPLC. Após a separação, estes são convertidos em iões na fase gasosa, através da remoção ou adição de eletrões ou prótons e podem ou não ser fragmentados. Existem diferentes fontes de ionização, nomeadamente a ionização por eletrospray (ESI), que é realizada à pressão atmosférica, e em que a amostra líquida é bombeada por um vaporizador que utiliza um gás nebulizador ou de revestimento, o azoto. Este gás também pode ser utilizado como gás auxiliar para ajudar a diminuir a humidade na fonte de iões. No vaporizador é aplicada uma tensão alta, formando-se um aerossol. Dependendo do sinal da tensão aplicada, as gotículas que saem do eletrospray poderão ter carga positiva (modo positivo) ou carga negativa (modo negativo). As gotículas carregadas que constituem o aerossol passam por um orifício de um capilar aquecido (que é mantido sob alto vácuo e que pode conter um gás auxiliar de secagem). Devido à evaporação do solvente, estas gotículas vão diminuindo de tamanho até serem obtidos os iões isolados na fase gasosa, que são direcionados para o detetor. Posteriormente, os iões são analisados no espectrómetro de massa, de acordo com sua razão

massa/carga (m/z). Deste modo, e comparando com bibliotecas de dados, é possível separar e identificar os constituintes da amostra em estudo [104,105].

O extrato de antocianinas de amora foi caracterizado no que diz respeito à sua composição em antocianinas, polifenóis de baixo peso molecular e flavonóis utilizando as condições experimentais descritas na literatura [101-103], com algumas modificações. Foi usado um equipamento de HPLC *Finnigan Surveyor*, com uma coluna de fase reversa C18 (comprimento da coluna: 150 mm; i.d.: 4,6 mm; tamanho do poro: 5 μ m, Hypersil Gold, *Thermo Finnigan*) termostaticada a 25 °C. Foram usados os mesmos solventes, nas mesmas condições, que nas análises de HPLC descritas na secção 3.2.1.2.a.1) (à exceção do método das antocianinas em que a concentração de ácido fórmico que, neste caso, era apenas de 1%). Este equipamento estava acoplado a um detetor de massa LCQ DECA XP MAX (*Finnigan Corp.*), equipado com uma fonte de ESI, uma fonte de ionização à pressão atmosférica (API). As voltagens do vaporizador e do capilar foram de 5 kV e 4,0 V, respetivamente. A temperatura do capilar foi de 325 °C. O azoto foi usado como gás de revestimento (ou nebulizador) e como gás auxiliar com fluxos de 40 e 15 (em unidades arbitrárias (u.a.)), respetivamente. A deteção foi feita por espectrofotometria com um fotodíodo e por MS. Os espectros foram obtidos nos modos positivo e negativo com o intervalo de m/z entre 100 e 2000. O espectrómetro de massa foi programado para fazer uma série de varrimentos: scan “full mass” (MS^1), um “zoom scan” do ião mais intenso (MS^2) e uma análise MS-MS do ião mais intenso usando a energia de colisão relativa de 45 (MS^3). Para a análise de resultados foi utilizado o *software X-Calibur 2.2*.

b) Determinação do conteúdo total em fenóis

Com o objetivo de determinar o conteúdo total em fenóis presentes na amostra, foi realizado o ensaio de Folin-Ciocalteu. Este ensaio permite medir a capacidade redutora de uma amostra, baseando-se na interação entre as substâncias redutoras e o reagente de Folin-Ciocalteu. Este reagente é constituído por ácido fosfotúngstico e ácido fosfomolibdico, que conferem cor amarela ao mesmo. Esta reação é realizada em meio alcalino para que as substâncias fenólicas libertem um protão e deem origem ao anião fenolato. Este anião é capaz de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu, originando óxido de tungsténio e óxido de molibdénio. Os óxidos possuem coloração azul que é detetável através da leitura da absorvância a $\lambda = 750$ nm [106].

Para este ensaio, foram preparadas soluções aquosas de extrato de antocianinas de amora a uma concentração de 0,5 mg/mL em triplicado. Para além

disso, foram preparadas soluções padrão de cy-3-glc com concentrações conhecidas (0,30; 0,60; 0,90; 1,20; 1,50 e 2,00 mg/mL) também em triplicado.

O ensaio foi realizado conforme descrito na literatura [107], com algumas modificações. Neste caso, a experiência foi realizada em microtubos e foram feitos triplicados para cada triplicado real. A cada microtubo, foram adicionados 15 µL de amostra (à exceção dos triplicados correspondentes ao branco, onde o volume de amostra foi substituído por água destilada), 75 µL de reagente de Folin-Ciocalteu e 500 µL de água destilada. Posteriormente, as soluções foram misturadas num agitador. Em seguida, foram adicionados 300 µL de uma solução aquosa de 20% de carbonato de sódio e 600 µL de água destilada a cada microtubo. As soluções foram novamente misturadas e ficaram a repousar à temperatura ambiente durante 30 minutos. Ao fim desse período, foram transferidos 350 µL de cada tubo para cada poço de uma placa de 96 poços e procedeu-se à leitura da absorvância a $\lambda = 750$ nm num leitor de placas (*Biotek Powerwave XS*). A partir dos resultados obtidos para as soluções padrão com concentrações conhecidas, traçou-se uma curva de calibração ($y = 0,3784x + 0,002$, $R^2 = 0,9963$) e calculou-se a concentração total de fenóis presentes em cada amostra.

c) Determinação do teor em humidade

Para determinar o teor em humidade do extrato de antocianinas de amora, quantificou-se a perda de massa consequente da evaporação da água através da secagem numa estufa a 37 °C. Para tal, pesaram-se 5,00 mg de amostra, que foram espalhados numa placa de Petri e foram realizadas pesagens ao longo de 15 dias até serem obtidos valores de massa constantes ao longo de 4 dias. Para calcular o teor em humidade, utilizou-se a **Equação 3.1**:

$$\text{Teor em humidade} = \frac{(P2 - P3) \times 100}{P2 - P1} \quad (3.1)$$

onde, P1 representa a massa da placa de Petri, P2 corresponde à massa da placa de Petri com a amostra e P3 representa a massa da placa de Petri com a amostra após secagem.

d) Determinação do teor em proteínas

Para quantificar as proteínas presentes no extrato de antocianinas de amora, recorreu-se ao método de Bradford [108]. Neste método, é utilizado o corante azul brilhante de Coomassie, que ao interagir com as proteínas, altera o seu máximo de absorvância. Em condições ácidas, o corante encontra-se protonado e tem uma cor

vermelha e, quando interage com as proteínas através de interações hidrofóbicas e eletrostáticas (estabelecidas com os aminoácidos aromáticos e básicos), há um deslocamento do equilíbrio do corante para a forma não protonada que tem cor azul e que absorve fortemente a $\lambda = 595$ nm.

O ensaio de Bradford foi realizado conforme descrito na literatura [108], com algumas modificações. Para este ensaio, foram preparadas soluções aquosas de extrato de antocianinas de amora a uma concentração de 0,5 mg/mL em triplicado. Para além disso, foram preparadas soluções padrão de BSA com concentrações conhecidas (0,010; 0,015; 0,020; 0,025; 0,030; 0,040 e 0,050 mg/mL) também em triplicado.

Neste caso, a experiência foi realizada em placas de 96 poços, tendo sido realizados triplicados. Em cada poço, foram colocados 100 μ L de cada amostra ou solução padrão e 200 μ L do reagente de Bradford. No branco da amostra, a amostra foi substituída por água destilada. A placa ficou a repousar à temperatura ambiente durante 10 minutos, ao abrigo da luz. Ao fim desse período, procedeu-se à leitura da absorvância a $\lambda = 595$ nm num leitor de placas (*Biotek Powerwave XS*). A partir dos resultados obtidos para as soluções padrão com concentrações conhecidas, traçou-se uma curva de calibração ($y = 9,153x + 0,012$, $R^2 = 0,9988$) e calculou-se a concentração de proteínas presentes em cada amostra.

e) Determinação da atividade antioxidante

O ensaio de poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) foi realizado para determinar o poder antioxidante do extrato de antocianinas de amora. Este ensaio baseia-se na redução do ferro(III) presente no TPTZ e, na consequente, produção de ferro(II), através da ação de um composto antioxidante a pH ácido. A redução do composto férrico leva a um aumento da absorvância, levando à formação de um composto ferroso de cor azul intensa, cuja absorvância pode ser medida a $\lambda = 593$ nm [109].

O ensaio de FRAP foi realizado conforme a literatura [102], com algumas modificações. Para este ensaio, foram preparadas soluções aquosas de extrato de antocianinas de amora a uma concentração de 0,5 mg/mL em triplicado. Para além disso, foi preparada a solução de FRAP: 1000 μ L de TPTZ, 1000 μ L de cloreto de ferro(III) e 10,0 mL de tampão acetato (300 mmol/L, pH 3,6). A mistura foi colocada na estufa a 37 °C durante 10 minutos e, em seguida, diluíram-se 10,0 mL desta mistura em 20,0 mL de tampão acetato. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços e foram feitas 5 réplicas para cada triplicado real. A cada poço, foram adicionados 270 μ L de solução

FRAP e 30 μL de amostra (à exceção dos triplicados correspondentes ao branco, onde o volume de amostra foi substituído por água destilada). A absorvância foi lida a $\lambda = 593$ nm a 37 °C aos tempos 0 e 4 minutos num leitor de placas (*Biotek Powerwave XS*). Os resultados foram expressos em equivalentes de Trolox.

f) Determinação da atividade antirradicalar

O ensaio para a determinação da atividade antirradicalar foi realizado com recurso ao DPPH. A presença de compostos antioxidantes leva à redução deste radical e, conseqüentemente, à mudança de cor da solução de roxo para amarelo. Esta reação induz uma diminuição na absorvância medida a $\lambda = 515$ nm, pelo que quanto maior for a diminuição maior é o poder antirradicalar dos compostos [102].

O ensaio do DPPH foi realizado conforme a literatura [102], com algumas modificações. Foram preparadas soluções aquosas de extrato de antocianinas de amora a uma concentração de 0,5 mg/mL em triplicado e foi preparada uma solução de DPPH em metanol a uma concentração de 24,2 $\mu\text{g/mL}$. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços e foram feitas 5 réplicas para cada triplicado real. A cada poço, foram adicionados 270 μL de solução de DPPH e 30 μL de amostra (à exceção dos triplicados correspondentes ao branco, onde o volume de amostra foi substituído por água destilada). A absorvância foi lida a $\lambda = 515$ nm a cada 5 minutos, durante 20 minutos, num leitor de placas (*Biotek Powerwave XS*). Os resultados foram expressos em equivalentes de Trolox.

3.2.2. Ativação e tingimento dos substratos têxteis

3.2.2.1. Lavagem e ativação da malha de algodão

A lavagem e ativação da malha de algodão foram realizadas conforme descrito na literatura [110], com algumas modificações. A lavagem do algodão permite a remoção da goma de amido. A ativação do têxtil com NaOH possibilita a sua desprotonação e a utilização do CTAB facilita a remoção de impurezas (como é o caso de bactérias), uma vez que este constitui um agente antibacteriano [111]. Todo este conjunto de procedimentos facilita a imobilização dos extratos de antocianinas nos substratos têxteis de algodão.

A malha de algodão foi cortada em quadrados de 10,0 cm $\times$ 10,0 cm. Os quadrados obtidos foram lavados com 100 mL de tolueno à temperatura ambiente, durante 15 minutos e com agitação magnética. Posteriormente, repetiu-se o processo

com etanol, seguindo-se com água *Millipore*. Por fim, secaram-se os substratos têxteis durante 20 horas numa estufa a 60 °C.

Para a ativação dos substratos têxteis, os quadrados previamente lavados foram pesados e colocados num balão, juntamente com uma solução aquosa de NaOH 5,0 g/L e de CTAB 1,0 g/L, numa proporção de 1/50 - massa de substrato têxtil (g)/volume de solução (mL). Procedeu-se a um aquecimento e reação a 90 °C, durante 1 hora, com agitação magnética. De seguida, os substratos têxteis foram lavados com água *Millipore* (usando as mesmas proporções massa de substrato têxtil/volume de solução) a 60 °C, durante 1 hora, com agitação magnética, para remover resíduos de NaOH e para reduzir o pH. Os têxteis foram ainda lavados com 100 mL de água *Millipore*, à temperatura ambiente, durante 15 minutos e com agitação magnética e foi realizado um controlo do pH das águas de lavagem, tendo-se verificado que estas possuíam um pH compreendido entre 6 e 7. Por fim, secaram-se os substratos têxteis durante 20 horas numa estufa a 60 °C. Os substratos têxteis não tingidos serão designados com os seguintes códigos: algodão não ativado – **Alg_na** e algodão ativado – **Alg**.

3.2.2.2. Ativação da malha de poliamida

A malha de poliamida foi cortada em quadrados de 10,0 cm × 10,0 cm e a sua ativação foi realizada conforme a ativação do algodão, cujo procedimento se encontra descrito na secção anterior. Os substratos têxteis não tingidos serão designados com os seguintes códigos: poliamida não ativada – **Pol_na** e poliamida ativada – **Pol**.

3.2.2.3. Tingimento das malhas de algodão e poliamida

Os substratos têxteis de algodão e poliamida foram tingidos com o extrato de antocianinas de amora por um processo que mimetiza o tingimento por esgotamento [110]. Todos os substratos têxteis foram previamente cortados em quadrados de 5,0 cm × 5,0 cm.

No caso das malhas de algodão e poliamida, foi realizado um teste inicial de tingimento por impregnação à temperatura ambiente (1 a 3 impregnações), em que os substratos têxteis foram mergulhados em 50 mL de uma solução aquosa de extrato de antocianinas de amora com uma concentração de 1,0 mg/mL e foram posteriormente espremidos por ação mecânica. Entre as impregnações, foram realizadas secagens durante 10 minutos a 100 °C na estufa do Instituto de Física de Materiais Avançados, Nanotecnologia e Fotónica (IFIMUP) do Departamento de Física e Astronomia da FCUP.

Os códigos das amostras tingidas por este método e as condições de tingimento são apresentados na **Tabela 3.1**.

Tabela 3.1 - Condições utilizadas no tingimento por impregnação dos têxteis de algodão e poliamida com o extrato de amora

Código da amostra	Ativação prévia	[Extrato] (mg/mL)	Temperatura (°C)	pH
Alg@am_i1_pH2 ^a	Ativado	1,0	Temperatura ambiente	2
Alg@am_i1 ^a				3
Alg@am_i2 ^a				
Alg@am_i3 ^a				
Pol@am_i1_pH2 ^a				2
Pol@am_i2_pH2 ^a				3
Pol@am_i1 ^a				
Pol@am_i2 ^a				

^a **Alg** representa o algodão, **Pol** corresponde à poliamida, **am** representa o extrato de antocianinas de amora, **ix** corresponde ao número de impregnações e **pHx** representa o pH utilizado (nos casos em que não houve ajuste de pH, essa condição não consta no código da amostra).

Como o tingimento por impregnação revelou-se ineficaz, procedeu-se ao tingimento por esgotamento. Este último foi otimizado, tendo sido testadas diferentes condições que se encontram descritas nas **Tabelas 3.2 e 3.3**, nomeadamente: ativação e não ativação dos substratos têxteis, concentração de extrato (1,0, 2,0 e 4,0 mg/mL), temperatura (60 e 90 °C), pH (2, 3 (sem ajuste de pH), 6, 8, 10 e 12), uso prévio, em simultâneo e ausência de mordente (sulfato de alumínio ou sulfato de alumínio e potássio) e concentração de mordente (0,5 e 1,0 mg/mL). Os ajustes de pH foram feitos com recurso a soluções aquosas de HCl e de NaOH 0,1 mol/L.

Os têxteis foram mergulhados em 50 mL de uma solução aquosa de extrato de antocianinas de amora com uma concentração previamente definida, durante 1 hora e com agitação magnética, a uma temperatura e a um pH estabelecidos (**Tabelas 3.2 e 3.3**). Nas situações onde foram utilizados mordentes para promover a imobilização das antocianinas, os têxteis foram previamente mergulhados em 50 mL de solução aquosa do mordente com uma concentração definida, a uma temperatura de 90 °C, durante 30 minutos e com agitação magnética. Posteriormente, os têxteis foram mergulhados na solução aquosa de extrato e tingidos de acordo com as condições descritas nas **Tabelas 3.2 e 3.3**. Nos casos em que foi realizada uma abordagem *in situ*, ou seja, em que o mordente foi utilizado durante o tingimento com o extrato, os substratos têxteis foram mergulhados em 50 mL de uma solução aquosa de extrato de antocianinas e mordente.

No final, todos os têxteis foram secos numa estufa a 60 °C, durante 20 horas. O tingimento das amostras **Alg_na@am(2x)**, **Alg_na@am(2x)_sa**, **Alg_na@am(4x)** e **Alg_na@am(4x)_sa** foi realizado em maior quantidade com o objetivo de obter mais substratos têxteis tingidos para testar nas células. Utilizaram-se têxteis não ativados e maiores concentrações de extrato (2,0 mg/mL e 4,0 mg/mL) para aumentar a quantidade de antocianinas libertadas nos ensaios biológicos.

Na **Tabela 3.2** são apresentados os códigos de identificação das amostras de algodão tingidas por esgotamento bem como as condições utilizadas no seu tingimento.

Tabela 3.2 - Condições utilizadas no tingimento por esgotamento dos têxteis de algodão com o extrato de amora

Código da amostra	Ativação prévia	[Extrato] (mg/mL)	Temperatura (°C)	pH	Mordente	[Mordente] (mg/mL)
Alg@am_pH2 ^a	Ativado	1,0	90	2	-	-
Alg@am ^a				3		
Alg@am_pH2_sa ^a				2	Al ₂ (SO ₄) ₃	0,5
Alg@am_sa ^a				3		
Alg@am_pH6_sa ^a				6		
Alg@am_pH8_sa ^a				8		
Alg@am_pH10_sa ^a				10		
Alg@am_pH12_sa ^a				12		
Alg@am_T60_pH8_sa ^a			60	8		
Alg@am_sa(2x) ^a			90	3	1,0	
Alg@am_pH8_sa(2x) ^a		8				
Alg@am_sa_situ ^a		3		Al ₂ (SO ₄) ₃ (<i>in situ</i>)	0,5	
Alg@am_pH8_sa_situ ^a		8				
Alg@am(2x)_sa ^a		3		Al ₂ (SO ₄) ₃		
Alg@am(2x)_pH8_sa ^a		8				
Alg@am_sap ^a		1,0	90	3	KAl(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	
Alg_na@am(2x) ^a	2,0	-			-	
Alg_na@am(4x) ^a	4,0					
Alg_na@am_sa ^a	1,0	8		Al ₂ (SO ₄) ₃	0,5	
Alg_na@am_pH8_sa ^a	2,0					
Alg_na@am(2x)_sa ^a	4,0	3				
Alg_na@am(4x)_sa ^a	1,0					
Alg_na@am_sap ^a	1,0			KAl(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O		

^a **Alg** representa o algodão, **na** corresponde ao têxtil não ativado, **am** representa o extrato de antocianinas de amora, **T60** corresponde a uma temperatura de tingimento de 60 °C, **pHx** representa o pH utilizado, **sa** e **sap** correspondem aos mordentes sulfato de alumínio e sulfato de alumínio e potássio, respetivamente, **2x** equivale ao dobro da concentração de extrato ou mordente (**am(2x)** ou **sa(2x)**, respetivamente), **4x** equivale ao quádruplo da concentração de extrato (**am(4x)**) e **situ** representa a abordagem *in situ*.

Na **Tabela 3.3** são apresentados os códigos de identificação das amostras de poliamida tingidas nas mesmas condições que o algodão bem como as condições usadas no seu tingimento.

Tabela 3.3 - Condições utilizadas no tingimento por esgotamento dos têxteis de poliamida com o extrato de amora

Código da amostra	Ativação prévia	[Extrato] (mg/mL)	Temperatura (°C)	pH	Mordente	[Mordente] (mg/mL)
Pol@am_pH2 ^a	Ativado	1,0	90	2	-	-
Pol@am ^a				3		
Pol@am_pH2_sa ^a				2	Al ₂ (SO ₄) ₃	0,5
Pol@am_sa ^a				3		
Pol@am_pH6_sa ^a				6		
Pol@am_pH8_sa ^a				8		
Pol@am_pH10_sa ^a				10		
Pol@am_pH12_sa ^a				12		
Pol@am_T60_pH8_sa ^a			60	8		
Pol@am_sa(2x) ^a			90	3		1,0
Pol@am_pH8_sa(2x) ^a		8				
Pol@am_sa_situ ^a		3		Al ₂ (SO ₄) ₃	0,5	
Pol@am_pH8_sa_situ ^a		8		(<i>in situ</i>)		
Pol@am(2x)_sa ^a		2,0	3	Al ₂ (SO ₄) ₃		
Pol@am(2x)_pH8_sa ^a			8			
Pol@am_sap ^a		Não ativado	1,0	3		KAl(SO ₄) ₂ · 12H ₂ O
Pol_na@am_sa ^a	8			Al ₂ (SO ₄) ₃		
Pol_na@am_pH8_sa ^a	2,0		3	KAl(SO ₄) ₂ · 12H ₂ O		
Pol_na@am(2x)_sa ^a					1,0	

^a **Pol** representa a poliamida, **na** corresponde ao têxtil não ativado, **am** representa o extrato de antocianinas de amora, **T60** corresponde a uma temperatura de tingimento de 60 °C, **pHx** representa o pH utilizado, **sa** e **sap** correspondem aos mordentes sulfato de alumínio e sulfato de alumínio e potássio, respetivamente, **2x** equivale ao dobro da concentração de extrato ou mordente (**am(2x)** ou **sa(2x)** respetivamente) e **situ** representa a abordagem *in situ*.

Para avaliar a eficiência da imobilização das antocianinas nos substratos têxteis, as soluções aquosas de extrato de antocianinas obtidas antes e depois dos tingimentos e após incubação a 90° durante 1 hora foram caracterizadas recorrendo à técnica de HPLC-DAD (método das antocianinas), cuja metodologia se encontra descrita em 3.2.1.2.a.1). Nos casos em que foi utilizado mordente, foi ainda preparada uma solução aquosa de extrato de antocianinas e mordente 1/1 (V/V). Esta também foi caracterizada por HPLC-DAD de modo a avaliar a possível estabilização das antocianinas presentes

no extrato pelo mordente. Todas as amostras foram devidamente acidificadas a pH 1, de modo a que todas as antocianinas em solução estivessem sob a forma de catião flavílio (detetável a $\lambda = 520$ nm no HPLC-DAD).

Com o objetivo de estudar a resistência da cor à lavagem, foi realizado um teste preliminar, no qual os substratos têxteis tingidos foram cortados a meio e uma das metades foi lavada com 25 mL de água *Millipore*, a 40 °C, durante 15 minutos e com agitação magnética.

3.2.3. Caracterização dos substratos têxteis

3.2.3.1. Colorimetria

As amostras foram caracterizadas por colorimetria, utilizando um dos espaços de cor estabelecidos pela Comissão Internacional de Iluminação (CIE), o espaço de cor $L^*a^*b^*$ [112].

É importante exprimir a cor de uma forma objetiva através de números, uma vez que, por vezes, diferentes indivíduos percecionam a cor de um objeto de forma distinta e expressam a mesma cor usando palavras muito diversificadas. Assim, a utilização de coordenadas de cor revela-se bastante útil para garantir uma maior uniformidade e precisão na caracterização colorimétrica de um determinado produto.

O espaço de cor $L^*a^*b^*$ (**Fig. 3.1**) é muito usado, uma vez que relaciona as coordenadas de cor com a perceção visual [112]. Este espaço de cor consiste num sistema tridimensional com as coordenadas CIELAB luminosidade (L^*), verde/vermelho (a^*) e azul/amarelo (b^*). A coordenada L^* permite avaliar a intensidade da cor e varia entre 0 (preto - mais escuro) e 100 (branco - mais claro). Por outro lado, as outras duas coordenadas exprimem a tonalidade (tom de cor) e a cromaticidade (saturação da cor). O eixo correspondente à coordenada a^* indica uma variação entre verde ($-a^*$) e vermelho ($+a^*$). O eixo correspondente à coordenada b^* revela uma variação entre azul ($-b^*$) e amarelo ($+b^*$).

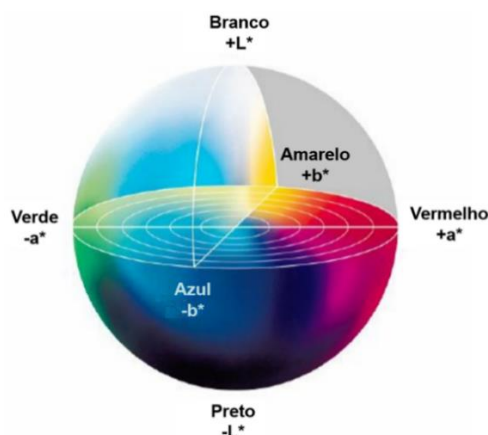


Fig. 3.1 - Espaço de cor $L^* a^* b^*$. Adaptado de [113].

A diferença total de cor (ΔE) entre duas amostras pode ser calculada usando a **Equação 3.2** [113]:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (3.2)$$

onde $\Delta L^* = L^*_{\text{amostra1}} - L^*_{\text{amostra2}}$, $\Delta a^* = a^*_{\text{amostra1}} - a^*_{\text{amostra2}}$ e $\Delta b^* = b^*_{\text{amostra1}} - b^*_{\text{amostra2}}$, em que a amostra 1 é a amostra de referência, que é o substrato têxtil não tingido, e a amostra 2 corresponde à amostra em estudo.

Todos os substratos têxteis de algodão e poliamida foram caracterizados recorrendo a um colorímetro CM-2600d (*Konica Minolta*), que foi gentilmente cedido pela Professora Doutora Alexandra Guedes, docente do Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento do Território da FCUP. As condições utilizadas nesta técnica foram adaptadas da literatura [114]. Foram usadas as condições do iluminante padrão D65 (luz do dia média, com uma temperatura de cor de 6504 K) e do campo de visão do observador padrão 10° . A área de iluminação utilizada foi de 8 mm de diâmetro e, em todas as medições, o colorímetro permaneceu encostado aos substratos têxteis. Os dados foram obtidos no modo de componente especular excluída (SCE), ou seja, excluindo a luz refletida especular, para que a avaliação da cor se relacione o mais possível com a percepção visual que um indivíduo tem de um objeto.

A calibração do colorímetro foi realizada com um padrão de referência branco, de acordo com as instruções do fabricante. A caracterização dos substratos têxteis foi realizada medindo as 3 coordenadas de cor mencionadas anteriormente, e o aparelho foi ajustado para realizar 3 medições sequenciais em 4 pontos diferentes de cada substrato têxtil. Para obter os valores finais das coordenadas de cor para cada têxtil, foi calculada uma média dos valores das medições obtidas pelo aparelho nos diferentes locais do têxtil. Foram, ainda, determinados os valores de ΔE para todas as amostras e

foi calculada a percentagem de lixiviação (perda de cor após a lavagem), utilizando a **Equação 3.3:**

$$\% \text{ lixiviação} = \frac{\Delta E_{\text{não lavado}} - \Delta E_{\text{lavado}}}{\Delta E_{\text{não lavado}}} \times 100 \quad (3.3)$$

onde $\Delta E_{\text{não lavado}}$ corresponde à diferença de cor entre a amostra não lavada e o provete não tingido e ΔE_{lavado} corresponde à diferença de cor entre a amostra lavada e o provete não tingido.

Para análise de resultados, foi utilizado o *software Spectra Magic NX – Color Data Software CM-S100w 1.7*.

3.2.3.2. Espetroscopia de infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica muito útil na caracterização de compostos orgânicos e de vários compostos inorgânicos, uma vez que permite realizar análises qualitativas e quantitativas dos primeiros e determinar a estrutura química dos segundos, utilizando radiação infravermelha. Para que este tipo de radiação seja absorvida por um composto, é necessário que a energia dessa radiação seja igual à energia necessária para que ocorra uma transição de eletrões entre níveis vibracionais e que a vibração resultante dessa absorção resulte numa variação não nula do momento dipolar. Como cada ligação química possui modos de vibração específicos (como estiramentos simétrico e assimétrico, flexão angular, torção, balanço e rotação), cada um deles terá frequências de vibração características. Por isso, irão ser absorvidas energias com valores específicos, o que leva a que, num espectro de infravermelho, surjam bandas/picos em determinadas frequências. Deste modo, é possível detetar a presença de um grupo funcional num determinado composto e investigar a estrutura química desse mesmo composto. A região do infravermelho mais utilizada nesta técnica corresponde ao intervalo compreendido entre os 400 e os 4000 cm^{-1} , devido à existência de muitos modos vibracionais associados a grupos funcionais que absorvem nessa região do espectro [115,116].

Na técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), um feixe de radiação infravermelha passa por um interferómetro antes de incidir na amostra e é dividido em duas partes, uma que é refletida por um espelho fixo e outra que é refletida por um espelho móvel. Quando essas ondas se voltam a recombinar, uma delas irá sofrer um atraso em relação à outra, surgindo assim uma onda modulada pela interferência das duas ondas, que irá atravessar a amostra. A partir da radiação

que chega ao detetor, é gerado um interferograma. Posteriormente, é utilizada a transformada de Fourier para gerar o espectro que representa a quantidade de radiação detetada em função do número de onda [117].

A utilização do módulo de refletância total atenuada (ATR) é bastante vantajosa, uma vez que permite obter, de forma eficaz, rápida, simples e não destrutiva, informações acerca da estrutura química de uma amostra, que pode estar no estado sólido ou líquido e que não necessita de preparação prévia. O módulo de ATR utiliza a reflexão interna total de um feixe de radiação no interior de um cristal constituído por um material com um índice de refração elevado, como o diamante, para analisar a amostra em contacto com o cristal. O feixe de radiação incidente é refletido no interior do cristal e quando interage com a amostra é atenuado, pois uma componente desse feixe é absorvida pela amostra sob a forma de uma onda evanescente. A absorção ocorre em determinados comprimentos de onda na região do infravermelho que são característicos de cada amostra. Após várias reflexões, o feixe atenuado é direcionado para o detetor e é utilizado para gerar um espectro de infravermelho da amostra, que permite obter informação sobre a sua estrutura química (**Fig. 3.2**) [118,119].

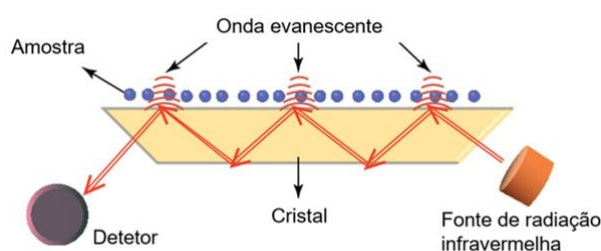


Fig. 3.2 - Princípio da técnica de FTIR-ATR. Adaptado de [120].

Os espectros de FTIR-ATR do extrato de antocianinas de amora e dos substratos têxteis de algodão e poliamida não tingidos (**Alg_na**, **Alg**, **Pol_na** e **Pol**) e tingidos (**Alg@am**, **Alg@am_sa**, **Pol@am** e **Pol@am_sa**) foram obtidos com recurso a um espectrómetro Spectrum Two (*Perkin-Elmer*) equipado com um acessório ATR, no Laboratório *Lab&Services* do Departamento de Química e Bioquímica da FCUP. O extrato de antocianinas de amora e os têxteis não necessitaram de qualquer tipo de preparação prévia, tendo sido colocados sobre o cristal de diamante do acessório de ATR do espectrómetro e pressionados por um parafuso de pressão. Para a obtenção dos espectros, foram efetuados 4 varrimentos no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} . O *software* utilizado para obtenção e análise dos resultados foi o *PerkinElmer Spectrum 10.5.3*.

3.2.3.3. Espectroscopia fotoeletrónica de raios-X

A técnica de XPS permite identificar e quantificar os elementos presentes na superfície de uma amostra, os seus números de oxidação e a sua vizinhança química, baseando-se no efeito fotoelétrico (**Fig. 3.3**). Quando um material é exposto a um feixe de raios-X, os eletrões do cerne dos átomos da amostra são ejetados, sendo determinada a quantidade de eletrões ejetados bem como a sua energia cinética. A partir destes valores e recorrendo à **Equação 3.4**, é determinada a energia de ligação dos eletrões (BE) dada por:

$$BE = h\nu - E_{\text{cin}} - \phi_{\text{esp}} \quad (3.4)$$

onde, $h\nu$ corresponde à energia do fotão da radiação incidente, E_{cin} representa a energia cinética do eletrão ejetado e ϕ_{esp} corresponde à função-trabalho do espectrómetro, ou seja, à energia necessária para que os eletrões sejam analisados no espectrómetro [121].

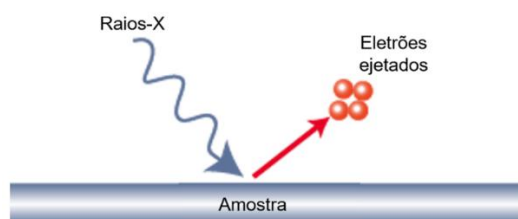


Fig. 3.3 - Representação esquemática do efeito fotoelétrico. Adaptado de [122].

Dado que as energias de ligação dos eletrões do cerne são características de cada átomo, a análise por XPS permite identificar o elemento presente. A soma das áreas das bandas presentes no espectro de um determinado elemento é proporcional à quantidade de átomos desse elemento na região analisada pelo que, recorrendo a fatores de sensibilidade, é possível obter uma análise quantitativa da superfície da amostra. Os desvios químicos das bandas num espectro de XPS permitem identificar o número de oxidação do elemento e conhecer a sua vizinhança química. A profundidade média de análise por XPS é de 10 nm [123,124].

A caracterização dos têxteis não tingidos (**Alg** e **Pol**) e tingidos (**Alg@am_sa** e **Pol@am_sa**) foi realizada no Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP). Os provetes de algodão e poliamida foram colocados numa fita condutora de carbono de dupla face colada a suportes de cobre, que foram dispostos no equipamento para a análise. A aquisição e análise dos dados foi realizada com recurso a um espectrómetro Axis Ultra HSA – VISION (Kratos). As medições de XPS foram realizadas com uma fonte de raios-X monocromática de alumínio (Al K α , com uma energia de 1486,6 eV),

operando a 15 kV no modo híbrido, com uma energia de passagem de 80 eV para o varrimento rápido (*Survey*) e de 40 eV para as regiões de interesse. A correção de efeito de carga da superfície foi realizada admitindo que a banda C 1s de mais baixa energia equivale ao valor de referência (banda C 1s a 284,6 eV corresponde a ligações C–H e C–C). Os efeitos da carga eletrostática foram corrigidos usando um neutralizador de carga. O *software Vision* foi utilizado para a aquisição de dados. Os espectros foram deconvoluídos com o *software CasaXPS 2.3.23*, usando o método iterativo não linear de Shirley para definir a linha de base. As percentagens atômicas dos diferentes elementos à superfície foram calculadas a partir das áreas das respectivas bandas deconvoluídas e usando os fatores de sensibilidade fornecidos pelo fabricante.

3.2.4. Ensaio de libertação

3.2.4.1. Ensaio de libertação com suor artificial

Para avaliar a quantidade de antocianinas libertada dos têxteis, foram realizados ensaios de libertação com suor artificial. Estes ensaios foram baseados em informação descrita na literatura [125].

O suor artificial utilizado foi preparado de acordo com a norma ISO 105-E04 - Testes de solidez da cor - Solidez da cor à transpiração, da Organização Internacional de Normalização (ISO) [126]. Para a preparação da solução de suor ácida (pH 5,5), foram dissolvidos num litro de água desionizada: 0,5 g de monoclórato de *L*-histidina monohidratada, 5,0 g de cloreto de sódio e 2,2 g de fosfato de sódio monobásico di-hidratado. O pH foi acertado com recurso a uma solução aquosa de NaOH 0,1 mol/L.

As amostras de algodão **Alg**, **Alg@am**, **Alg@am_sa**, **Alg@am_pH8_sa**, **Alg@am_sap** e **Alg_na@am(2x)_sa** foram cortadas em quadrados de 0,5 cm × 0,5 cm. Cada quadrado foi mergulhado em 1,0 mL de suor artificial. As experiências foram realizadas em microtubos a 37 °C com agitação. Num primeiro ensaio, foram recolhidas frações de 100 µL de suor aos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 e 1440 minutos. Os volumes recolhidos foram sendo repostos com a solução de suor artificial previamente preparada para que o volume de suor no interior dos microtubos fosse sempre constante. Os ensaios foram repetidos 2 vezes; no entanto, nessas repetições apenas foram recolhidas frações de 100 µL de suor aos tempos 0, 60 e 120 minutos (o instante em que se verificou a concentração máxima de antocianinas libertadas, na maioria das situações). Os volumes recolhidos também foram sendo repostos para que o volume de suor no interior dos microtubos fosse sempre constante.

Foram também preparadas soluções padrão de cy-3-glc com concentrações conhecidas (0,005; 0,010; 0,020; 0,050; 0,080; 0,200 e 0,530 mg/mL) em triplicado.

As frações recolhidas e as soluções padrão foram caracterizadas recorrendo à técnica de HPLC-DAD (método das antocianinas), cuja metodologia se encontra descrita em 3.2.1.2.a.1). Para análise de resultados, foi utilizado o *software Chromeleon* 7.2 e foram determinadas as áreas dos picos presentes nos cromatogramas obtidos. A partir da reta de calibração ($y = 3076x$, $R^2 = 0,9985$), foi possível calcular a concentração de antocianinas libertadas de cada amostra para o suor em cada um dos tempos de recolha.

3.2.4.2. Determinação da quantidade de alumínio libertada

A espectroscopia de absorção atômica (AAS) é uma técnica muito utilizada na determinação da concentração de determinados elementos, nomeadamente de metais. Esta técnica baseia-se no princípio de que átomos livres no estado gasoso gerados num atomizador podem absorver radiação com uma frequência específica. Assim, na AAS, uma fonte de radiação externa incide sobre o vapor do analito. Se esta radiação tiver uma frequência apropriada, poderá ser absorvida pelos átomos do analito e promovê-los a estados excitados. Através da medição da quantidade de radiação absorvida, pode-se determinar a concentração do elemento em estudo. A AAS apresenta uma elevada sensibilidade, o que a torna um método bastante adequado para a análise de elementos vestigiais que estejam presentes em amostras [127].

Dado que o alumínio foi utilizado como mordente e este pode apresentar alguma toxicidade para os seres humanos, procedeu-se à determinação da quantidade de alumínio libertada pelos substratos têxteis para o suor artificial recorrendo à AAS.

A determinação do teor de alumínio foi realizada no Laboratório *Lab&Services* do Departamento de Química e Bioquímica da FCUP e foi baseada em informação descrita na literatura [128]. As medições foram feitas com recurso a um espectrómetro de absorção atômica com forno de grafite PinAAcle 900Z equipado com um amostrador automático AS900 (*PerkinElmer*). Foi utilizada uma lâmpada de cátodo oco de alumínio com um $\lambda = 309,27$ nm e uma intensidade de corrente igual a 25 mA, bem como uma largura de fenda de 0,7 nm. A correção de fundo foi realizada recorrendo ao efeito de Zeeman longitudinal. Foram utilizados tubos de grafite com aquecimento transversal e com plataformas integradas (THGA).

O programa de aquecimento do forno está apresentado na **Tabela 3.4**.

Tabela 3.4 - Programa de aquecimento do forno do espectrómetro de absorção atômica

Etapa	Temperatura (°C)	Período de aquecimento (s)	Período de tempo à temperatura definida (s)	Fluxo do gás árgon (mL/min)
1ª Secagem	110	1	30	250
2ª Secagem	130	15	30	250
Pirólise	1200	10	20	250
Atomização	2300	0	5	0
Limpeza	2450	1	3	250

O sistema foi controlado pelo *software WinLab32™ AA*.

Foram utilizadas soluções padrão com concentrações conhecidas de alumínio (25, 30, 36, 40 e 50 µg/L) e com uma concentração de 0,2% de ácido nítrico.

As amostras a analisar correspondem ao suor recolhido 2 horas depois da incubação com os têxteis **Alg**, **Alg@am**, **Alg@am_sa**, **Alg@am_pH8_sa**, **Alg@am_sap** e **Alg_na@am(2x)_sa**. A estas amostras foi adicionada a mesma quantidade de ácido presente nos padrões. Durante a análise, foram realizadas 3 medições para as soluções padrão e para as amostras e o resultado final corresponde à média das 3 medições. A partir das soluções padrão com concentrações conhecidas e das respetivas áreas dos picos, foi possível traçar uma reta de calibração ($y = 0,0035x + 0,0344$, $R^2 = 0,9782$) e, desse modo, calcular a concentração de alumínio libertada para o suor em cada uma das amostras estudadas.

3.2.5. Ensaaios de citotoxicidade

Com o objetivo de avaliar a toxicidade dos substratos de algodão para as células foram realizados ensaios biológicos com células HaCat, uma linha celular de queratinócitos imortais aneuploides de pele humana adulta.

3.2.5.1. Cultura de células

Uma linha celular de queratinócitos (HaCat) foi cultivada em monocamada com passagens entre 35 e 55. Como manutenção de rotina, as células foram inoculadas em placas de Petri de 25 cm² e deixadas em cultura até à confluência, em meio DMEM. Os meios foram suplementados com 10% de FBS (inativado a 56 °C) e com 1% de solução de antibiótico/antimicótico (percentagens volúmicas). As culturas celulares foram mantidas a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5% de CO₂ [129]. As células foram

tripsinizadas com uma solução 0,25% tripsina - EDTA-4Na (razão massa/volume; *m/V*) duas vezes por semana.

3.2.5.2. Incubação com os compostos

As células HaCat foram inoculadas em placas de 96 poços a uma densidade de $4,0 \times 10^5$ células/mL (100 μ L/poço), usando meio de cultura DMEM suplementado com 10% de FBS (inativado por calor) e com 1% de solução de antibiótico/antimicótico (percentagens volúmicas), e permitiu-se a sua adesão e crescimento durante 24 horas.

Foi realizado um estudo com as amostras de algodão **Alg_na@am(4x)** e **Alg_na@am(4x)_sa**. Estas amostras foram cortadas em quadrados de 3,0 cm $\times$ 3,0 cm e cada quadrado foi mergulhado em 9,0 mL de meio DMEM sem FBS e sem solução de antibiótico/antimicótico a pH 7,4. As experiências foram realizadas em microtubos a 37 °C com agitação. Ao fim de 2 horas, foram recolhidas frações, de onde foram retiradas alíquotas para serem caracterizadas recorrendo à técnica de HPLC-DAD (método das antocianinas), cuja metodologia se encontra descrita em 3.2.1.2.a.1). Estas frações foram incubadas com as células durante 24 horas a 37 °C e pH 7,4, usando quatro concentrações distintas (diluições em série), num volume final de 100 μ L.

3.2.5.3. Ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

Para a avaliação da viabilidade celular foram realizados ensaios de citotoxicidade. Nas células, o mecanismo de redução do MTT envolve a transferência de eletrões do NADH ou de moléculas redutoras semelhantes para o MTT [130]. No ensaio de redução do MTT, as células viáveis são capazes de converter o MTT num produto de cor roxa, enquanto as células mortas não são capazes de o fazer. Assim, a medição da absorvância a $\lambda = 570$ nm permite a deteção desse produto corado e a quantificação da viabilidade celular.

Os ensaios de MTT foram realizados de acordo com a literatura [131], com algumas modificações. Para a realização deste ensaio, retirou-se o meio dos poços das placas de 96 poços e os poços foram lavados com PBS. De seguida, foram adicionados 100 μ L de solução de MTT a cada poço (concentração de 5,0 mg/mL) e as placas foram incubadas na estufa durante 1 hora e 30 minutos. A reação foi interrompida rejeitando o meio e adicionando DMSO para a dissolução dos cristais que se formaram. Em

seguida, procedeu-se à leitura da absorvância a $\lambda = 570$ nm (FlexStation®3 Multi-Mode Microplate Reader, *Molecular Devices*).

3.2.6. Efeito das antocianinas nas enzimas da pele

Para avaliar o efeito das antocianinas nas enzimas da pele foram realizados ensaios de inibição enzimática com a collagenase, a elastase, a tirosinase e a hialuronidase.

3.2.6.1. Atividade da collagenase

Os ensaios de inibição enzimática da collagenase na presença do extrato de antocianinas de amora e de cy-3-glc a diferentes concentrações foram realizados usando as condições descritas na literatura [132], com algumas modificações. A atividade desta enzima na presença e na ausência dos compostos em estudo foi avaliada através da monitorização da hidrólise do composto FALGPA pela collagenase, recorrendo à medição da diminuição da absorvância a $\lambda = 324$ nm.

A collagenase de *Clostridium histolyticum* do tipo I foi dissolvida em tampão fosfato 10 mmol/L (pH 6,8), tendo sido preparada uma solução com uma concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. O substrato FALGPA foi dissolvido no mesmo tampão, a uma concentração de 3,0 mmol/L. Depois de terem sido preparadas soluções padrão de extrato de antocianinas de amora e de cy-3-glc (97,0 mg/mL) em DMSO, foram preparadas 4 soluções de cada um dos compostos com concentrações de 19,4; 48,5; 97,0 e 194 $\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato.

Após a adição de tampão (175 μL) a cada um dos poços das placas de 96 poços, procedeu-se à adição das soluções de extrato ou de cy-3-glc (75 μL) e à sua incubação com a enzima (20 μL), durante 15 minutos a 37 °C, e, ao fim desse tempo, iniciou-se a reação com a adição de substrato (30 μL). Na situação controlo, onde não foram adicionadas as soluções de antocianinas, o volume destes compostos foi substituído por tampão. A reação foi seguida num leitor de placas (FlexStation®3 Multi-Mode Microplate Reader, *Molecular Devices*) e foram registados os valores de absorvância a $\lambda = 324$ nm e a 37 °C, durante 35 minutos. Para calcular a percentagem de inibição da collagenase por parte das antocianinas, utilizou-se a **Equação 3.5**:

$$\% \text{ Inibição} = \left(1 - \frac{B_0 - B_{35}}{A_0 - A_{35}}\right) \times 100 \quad (3.5)$$

onde B_0 representa a absorvância da solução inicial medida nos poços na presença de enzima, substrato e antocianinas e B_{35} refere-se à absorvância ao fim de 35 minutos de

incubação destes compostos. A_0 representa a absorvância da solução inicial na ausência das antocianinas, ou seja, apenas na presença de enzima e substrato e A_{35} refere-se à absorvância ao fim de 35 minutos de incubação da enzima com o substrato.

3.2.6.2. Atividade da elastase

Os ensaios de inibição enzimática da elastase na presença do extrato de antocianinas de amora e de cy-3-glc a diferentes concentrações foram realizados usando as condições descritas na literatura [133], mas com algumas modificações. A atividade da enzima na presença e na ausência dos compostos em estudo foi avaliada através da monitorização da hidrólise do *N*-Suc-Ala-Ala-Ala-*p*-NA pela elastase. Nesta reação, é libertado o *p*-Nitroanilido que leva a um aumento da absorvância a $\lambda = 405$ nm.

A elastase pancreática de porco foi dissolvida em tampão Tris-HCl 100 mmol/L (pH 8,0), tendo sido preparada uma solução com uma concentração de 75,5 $\mu\text{g/mL}$. O substrato *N*-Suc-Ala-Ala-Ala-*p*-NA foi dissolvido em tampão Tris-HCl, a uma concentração de 4,4 mmol/L. Depois de terem sido preparadas soluções padrão de extrato de antocianinas de amora e de cy-3-glc (97,0 mg/mL) em DMSO, foram preparadas 4 soluções de cada um dos compostos com concentrações de 97,0; 194; 388 e 776 $\mu\text{g/mL}$ em tampão Tris-HCl.

A adição das soluções a cada um dos poços da placa de 96 poços foi realizada conforme descrito no caso da collagenase, no entanto, neste caso, o volume de enzima foi de 30 μL e o volume de substrato foi de 20 μL . A reação foi seguida num leitor de placas (FlexStation®3 Multi-Mode Microplate Reader, *Molecular Devices*) e foram registados os valores de absorvância, a $\lambda = 405$ nm e a 37 °C, durante 35 minutos. Para calcular a percentagem de inibição da elastase, utilizou-se a **Equação 3.6**:

$$\% \text{ Inibição} = \left(1 - \frac{B_{35} - B_0}{A_{35} - A_0} \right) \times 100 \quad (3.6)$$

onde B_{35} representa a absorvância ao fim de 35 minutos de incubação da enzima e das antocianinas com o substrato e B_0 refere-se à absorvância da solução inicial na presença destes compostos. A_{35} refere-se à absorvância ao fim de 35 minutos de incubação da enzima com o substrato na ausência de antocianinas e A_0 representa a absorvância da solução inicial contendo enzima e substrato.

3.2.6.3. Atividade da tirosinase

Os ensaios de inibição enzimática da tirosinase na presença do extrato de antocianinas de amora e de cy-3-glc a diferentes concentrações foram realizados usando as condições descritas na literatura [134], mas com algumas modificações. Neste caso, foi utilizado o composto *L*-DOPA como substrato, e a atividade da enzima na presença e na ausência das antocianinas foi monitorizada através da medição do aumento da absorvância a $\lambda = 475$ nm.

A tirosinase de cogumelo foi dissolvida em tampão fosfato 10 mmol/L (pH 6,8), tendo sido preparada uma solução com uma concentração de 37,7 $\mu\text{g/mL}$. O substrato *L*-DOPA foi dissolvido em tampão fosfato, a uma concentração de 6,0 mmol/L. Depois de terem sido preparadas soluções padrão de extrato de antocianinas de amora e a cy-3-glc (97,0 mg/mL) em DMSO, foram preparadas 4 soluções de cada um dos compostos com concentrações de 19,4; 48,5; 97,0 e 194 $\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato.

A adição das soluções a cada um dos poços da placa de 96 poços foi realizada conforme descrito no caso da collagenase. A reação foi seguida num leitor de placas (FlexStation®3 Multi-Mode Microplate Reader, *Molecular Devices*) e foram registados os valores de absorvância, a $\lambda = 475$ nm e a 37°C, durante 20 minutos. Para calcular a percentagem de inibição da tirosinase, utilizou-se a **Equação 3.7**:

$$\% \text{ Inibição} = \left(1 - \frac{B_{20} - B_0}{A_{20} - A_0} \right) \times 100 \quad (3.7)$$

onde B_{20} representa a absorvância ao fim de 20 minutos de incubação da enzima e das antocianinas com o substrato e B_0 refere-se à absorvância da solução inicial na presença destes compostos. A_{20} refere-se à absorvância ao fim de 20 minutos de incubação da enzima com o substrato na ausência de antocianinas e A_0 representa a absorvância da solução inicial contendo enzima e substrato.

3.2.6.4. Atividade da hialuronidase

Os ensaios de inibição enzimática da hialuronidase na presença do extrato de antocianinas de amora e de cy-3-glc a diferentes concentrações foram realizados usando as condições descritas na literatura [135], com algumas modificações. Neste caso, foi utilizado o ácido hialurónico, como substrato, e a atividade da enzima na presença e na ausência dos compostos foi monitorizada através de um método turbidimétrico, que tem por base a formação de complexos insolúveis entre o ácido hialurónico não digerido e o CTAB.

A hialuronidase de testículos bovinos tipo I-S foi dissolvida em tampão fosfato 20 mmol/L (pH 7,0) contendo 50 mmol/L de NaCl, tendo sido preparada uma solução com uma concentração de 50,0 µg/mL. O substrato, sal de sódio do ácido hialurônico de crista de galo, foi dissolvido em tampão com 0,3 mol/L de fosfato de sódio (pH 5,35), a uma concentração de 0,3 mg/mL. Esta solução foi aquecida a 60-70 °C durante 15 a 20 minutos, antes da sua utilização, para garantir a dissolução completa do ácido hialurônico. Depois de terem sido preparadas soluções padrão de extrato de antocianinas de amora e a cy-3-glc (97,0 mg/mL) em DMSO, foram preparadas 4 soluções de cada um dos compostos com concentrações de 19,4; 48,5; 97,0 e 194 µg/mL em tampão fosfato 20 mmol/L (pH 7,0) contendo 50 mmol/L de NaCl.

Após a adição de tampão fosfato 20 mmol/L (pH 7,0) contendo 50 mmol/L de NaCl (52,5 µL) a cada um dos poços das placas de 96 poços, foram adicionadas as soluções de extrato ou de cy-3-glc (37,5 µL) e incubadas com uma solução de hialuronidase (30 µL), durante 10 minutos a 37 °C. Na situação controlo, onde não foram adicionadas antocianinas, o volume destas foi substituído por tampão. Para além do controlo na ausência de antocianinas, foram ainda realizados ensaios na ausência de enzima, em que o volume de enzima foi substituído por tampão. Ao fim dos 10 minutos, a reação foi iniciada com a adição do ácido hialurônico (30 µL). Posteriormente, houve um novo período de incubação de 60 minutos a 37 °C. O ácido hialurônico não digerido que permanecia na solução foi precipitado com 150 µL da solução de CTAB (2,5% *m/V* em 2% *m/V* NaOH). A mistura foi deixada à temperatura ambiente durante 10 minutos e, após esse período de tempo, mediu-se a absorvância a $\lambda = 400$ nm, num leitor de placas (FlexStation®3 Multi-Mode Microplate Reader, *Molecular Devices*). A percentagem de inibição foi calculada recorrendo à **Equação 3.8**:

$$\% \text{ Inibição} = \left(1 - \frac{B}{A}\right) \times 100 \quad (3.8)$$

$$A = \left(1 - \frac{A_E}{A_0}\right) \times 100 \quad (3.9)$$

$$B = \left(1 - \frac{B_E}{B_0}\right) \times 100 \quad (3.10)$$

onde *A* representa a atividade enzimática do controlo na ausência das antocianinas e *B* a atividade enzimática na presença das antocianinas. As atividades enzimáticas foram calculadas a partir das **Equações 3.9 e 3.10**, onde *A_E* e *B_E* representam a absorvância do substrato na presença de enzima e *A₀* e *B₀* representam a absorvância do substrato na ausência de enzima.

3.2.7. Análise estatística

Os ensaios de libertação com suor artificial foram realizados com pelo menos $n = 3$ repetições. Os valores apresentados representam a média aritmética $\pm$ erro padrão da média (SEM) e as diferenças estatísticas foram analisadas por *two-way* ANOVA [136]. As diferenças foram consideradas significativas quando o nível descritivo (p) $< 0,05$.

Todos os restantes ensaios foram realizados com pelo menos $n = 3$ repetições. Os valores apresentados representam a média aritmética $\pm$ SEM e as diferenças estatísticas foram analisadas por *one-way* ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni [137]. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Todos os dados estatísticos foram processados pelo programa *GraphPad Prism* 5.0, versão para Windows (*GraphPad software*).

3.2.8. Estudos de *docking* molecular com a hialuronidase

A química computacional é uma área da química que, nos últimos anos, tem vindo a ganhar uma importância crescente. Através da química computacional, é possível prever resultados experimentais e/ou interpretá-los mais facilmente, minimizando a necessidade de recorrer a técnicas complicadas e dispendiosas. Os estudos de atracagem (do inglês, *docking*) molecular enquadram-se nesta área da química e são bastante utilizados para prever a orientação de duas moléculas (geralmente, proteína (recetor) e substrato (ligando)), quando estas se associam para formar um complexo estável. A partir da técnica de *docking* molecular, é possível identificar as interações mais relevantes entre as duas moléculas e distinguir as estruturas do complexo formado que maximizam as interações entre as moléculas e, ao mesmo tempo, minimizam a energia do sistema [138].

O processo de *docking* molecular apresenta diversas etapas [138]. As primeiras correspondem à seleção do recetor e à definição da região de ligação mais favorável entre o recetor e o ligando. Posteriormente, deve-se proceder à preparação das estruturas moleculares dos ligandos. Em seguida, deve-se escolher um algoritmo de pesquisa adequado, de modo a procurar várias estruturas possíveis para encaixar um ligando no local de ligação do recetor. Existem vários algoritmos de pesquisa, por exemplo, os algoritmos rígidos (que não têm em conta a flexibilidade do ligando e do recetor), os algoritmos sistemáticos (que exploram os graus de liberdade do ligando e do recetor), as simulações de dinâmica molecular (que utilizam equações de movimento e geram várias conformações ao longo do tempo) e os métodos estocásticos (que

analisam o espaço conformacional de uma forma aleatória e introduzem modificações nos ligandos e/ou no recetor, que podem ser aceites ou rejeitadas de acordo com uma função probabilística). Um exemplo de um método estocástico é o caso dos algoritmos genéticos, que aplicam os princípios da genética e a teoria da evolução ao *docking* molecular. Estes algoritmos partem de uma “população” de diferentes conformações do recetor ou do ligando, cada uma das quais definida por um conjunto de variáveis (designadas de “genes”). O espaço conformacional é explorado tendo por base as teorias de evolução. Neste caso, as conformações são cruzadas através da aplicação de operadores genéticos, como mutações, migrações e cruzamento cromossómico (do inglês *crossing-over*). As conformações que não satisfazem uma evolução positiva vão sendo excluídas e o processo vai sendo repetido até que a população final satisfaça uma determinada função de ajuste. Dado que é impossível explorar todas as orientações e conformações possíveis resultantes da associação entre o recetor e o ligando, a maioria dos algoritmos de pesquisa de *docking* mantém a estrutura do recetor rígida e confere flexibilidade ao ligando. A última etapa do processo de *docking* deve ser o uso de uma função de avaliação para determinar as melhores soluções obtidas. O principal objetivo da função de avaliação é estimar a afinidade entre o recetor e o ligando, que é proporcional à energia de Gibbs da ligação (ΔG_{lig}). Geralmente, a qualidade de um processo de *docking* está associada ao uso de um bom algoritmo de pesquisa e de uma boa função de avaliação, mas também à rapidez de execução de todo o processo [138-140]. O programa AutoDock [141] é um dos mais populares e utilizados que emprega algoritmo genético.

A hialuronidase é uma das enzimas responsáveis pela destruição do glicosaminoglicano mais abundante no nosso organismo, o ácido hialurónico [142]. Para além da abordagem experimental realizada com esta enzima, foi também realizado um estudo teórico sobre a inibição da hialuronidase usando antocianinas, onde foram avaliadas as interações entre o centro ativo da enzima e diferentes formas da antocianina maioritária do extrato de amora (cy-3-glc).

A estrutura cristalográfica da hialuronidase obtida por difração de raios-X foi retirada da base de dados *Protein Data Bank* (PDB). Foi escolhida a estrutura cristalográfica da hialuronidase do veneno de abelha, uma vez que esta estrutura possui um centro ativo semelhante ao da enzima humana, assim como pelo facto de ter sido usada com sucesso em estudos semelhantes [142,143]. O código PDB da estrutura é 1FCV e a resolução é 2,65 Å [142]. Esta estrutura molecular possui um tetrassacárido associado ao centro ativo da enzima, o qual, de acordo com a literatura [142],

corresponde ao produto final da hidrólise do ácido hialurónico. Neste estudo, a quercetina e a quercetina-3-glucósido foram usadas como controlo positivo e foram estudadas as formas estruturais da cy-3-glc maioritárias a pH 7: a pseudobase carbinol e a chalcona. Também foi estudada a 3-desoxicianidina (também designada de luteolinidina) e a sua respetiva chalcona. As estruturas dos ligandos foram construídas usando o programa *Avogadro* [144].

O procedimento de *docking* molecular foi realizado com o software *Autodock 4*, recorrendo ao *Autodock Tools* [141]. Inicialmente, efetuou-se uma validação do processo de *docking*, usando o tetrassacárido cristalográfico, constituído por duas unidades de GlcA e de GlcNAc. Após o re-*docking* do tetrassacárido e subsequente validação, foi realizado o processo de *docking* molecular com os ligandos em estudo aplicando o mesmo protocolo computacional. Inicialmente, foram retiradas as moléculas de água presentes na estrutura cristalográfica e procedeu-se à adição dos átomos de hidrogénio à enzima, tendo em conta o estado de protonação de todos os resíduos da proteína no seu estado fisiológico. Neste caso, o resíduo Glu219 foi protonado de forma a possuir carga neutra, assim como as ligações de enxofre entre os resíduos de cisteína 22 e 313 e 189 e 201 foram definidas. Para definir o local de *docking* molecular, recorreu-se ao módulo *AutoGrid*. O centro da caixa de *docking* foi: X – 2,606; Y – 31,694; Z – -8,535, o número de pontos de espaçamento foi de 0,375 e o número total de pontos em cada uma das 3 dimensões (X, Y e Z) foi de 60. O *AutoGrid* gerou um conjunto de ficheiros que foram utilizados pelo programa *Autodock*. Durante o *docking* molecular, foi usado um método baseado num algoritmo genético lamarquiano com um total de 50 soluções. O tamanho da população foi de 150. O número máximo de avaliações foi de 250000 e o número de gerações foi de 27000.

Todas as soluções obtidas foram ordenadas, tendo em conta os valores de ΔG_{lig} . As melhores soluções de *docking* para cada ligando foram analisadas com recurso ao programa *Visual Molecular Dynamics* (VMD) [145], tendo sido estudadas as interações mais relevantes entre o centro ativo da enzima e os ligandos em estudo.

4. Resultados e Discussão

Este capítulo encontra-se dividido em várias partes distintas. Numa primeira fase, serão referidos os resultados relacionados com a caracterização do extrato de antocianinas de amora. Em seguida, serão apresentados e discutidos os resultados de caracterização dos substratos têxteis de algodão e poliamida tingidos obtidos com recurso às técnicas de colorimetria, FTIR-ATR e XPS. Numa fase seguinte, serão abordados os resultados obtidos nos ensaios de libertação das antocianinas dos têxteis para o suor artificial. Serão ainda descritos os resultados obtidos nos ensaios biológicos realizados, nomeadamente os resultados relacionados com os ensaios de citotoxicidade e com o efeito das antocianinas na atividade das enzimas da pele. Adicionalmente, serão abordados os resultados relacionados com o estudo de *docking* molecular realizado com a hialuronidase.

4.1. Caracterização estrutural do extrato de antocianinas de amora

4.1.1. Determinação do conteúdo em antocianinas

O extrato de antocianinas de amora foi analisado por HPLC-DAD e HPLC-MS. Na **Fig. 4.1** encontra-se representado o cromatograma obtido para o extrato de antocianinas de amora a $\lambda = 520$ nm. No cromatograma do extrato é possível identificar a presença de 5 antocianinas: 1 - Cy-3-glc; 2 - Cianidina-3-rutinósido; 3 - Cianidina-3-xilósido; 4 - Cianidina-3-malonil-glucósido e 5 - Cianidina-3-dioxaloil-glucósido, cujas características se encontram apresentadas na **Tabela 4.1** [99].

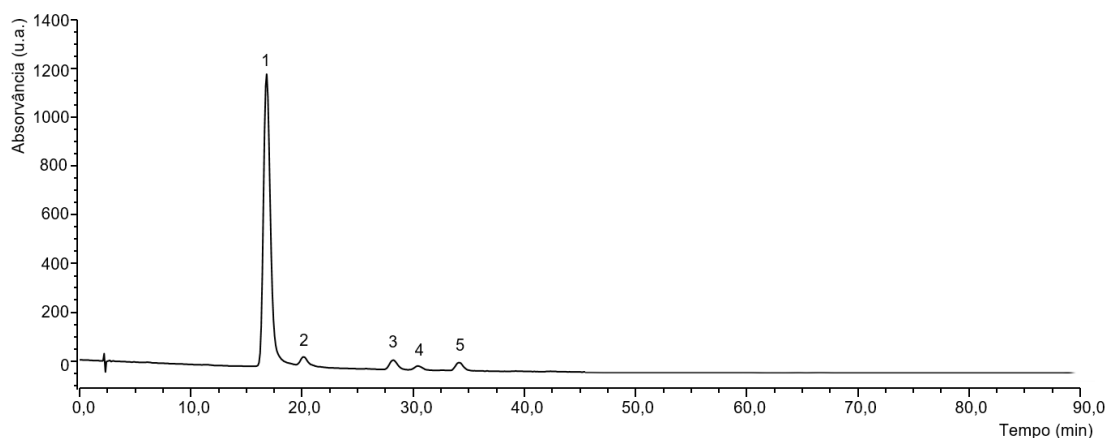
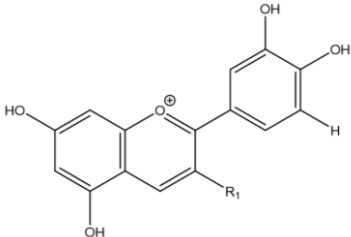


Fig. 4.1 - Cromatograma representativo da análise por HPLC das antocianinas presentes no extrato de amora a $\lambda = 520$ nm.

Tabela 4.1 - Identificação estrutural por HPLC-MS das antocianinas presentes no extrato de amora (estrutura das antocianinas, varrimentos MS^1 e MS^2 (m/z), λ de absorção máxima e tempo de retenção)

Pico	Antocianinas	R ₁	MS^1 (m/z)	MS^2 (m/z)	λ (nm)	Tempo de retenção (min)
1	Cy-3-glc	Glc	449	287	514	16,7
2	Cianidina-3-O-rutinósido	Rut	595	449/287	517	20,0
3	Cianidina-3-O-xilósido	Xil	419	287	517	28,0
4	Cianidina-3-O-malonil-glucósido	Malonil-Glc	535	-	520	30,2
5	Cianidina-3-dioxaloil-glucósido	Dioxaloil-Glc	593	287	520	33,8



Legenda: Glc - glucósido; Rut - rutinósido; Xil - xilósido.

Através da área total dos picos presentes nos cromatogramas obtidos e da reta de calibração, foi determinada a concentração total de antocianinas presentes no extrato, tendo-se determinado uma concentração de $(0,62 \pm 0,07)$ mg de antocianinas (em equivalentes de cy-3-glc) por mg de extrato. Este valor está de acordo com o esperado, já que comprova que o extrato é maioritariamente composto por antocianinas.

Para estudar a contribuição da antocianina maioritária neste extrato, cy-3-glc, para a atividade total do extrato, procedeu-se ao seu isolamento. A purificação desta antocianina foi avaliada por HPLC, tendo sido calculado um grau de pureza de 97%.

4.1.2. Determinação do conteúdo em polifenóis de baixo peso molecular

O cromatograma obtido para o extrato de antocianinas de amora a $\lambda = 280$ nm, através do método dos polifenóis de baixo peso molecular, encontra-se na **Fig. 4.2**. Através do cromatograma do extrato é possível identificar a presença de: 1 - Ácido gálico; 2 - Ácido protocatecuico; 3 - Cy-3-glc; 4 - Desconhecido; 5 e 6 - Galoil-bis-hexahidroxidifenoil-glucose (isómeros), 7 - Ácido elágico e 8 - Quercetina-3-glucósido / Quercetina-3-galactósido, cujas características se encontram apresentadas na **Tabela 4.2** [102].

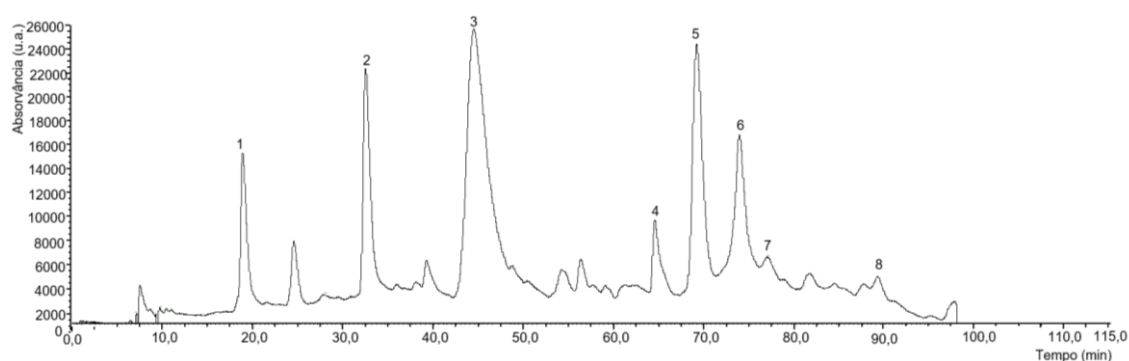


Fig. 4.2 - Cromatograma representativo da análise por HPLC-MS dos polifenóis de baixo peso molecular presentes no extrato de amora a $\lambda = 280$ nm.

Tabela 4.2- Identificação estrutural por HPLC-MS dos compostos presentes no extrato de amora que apresentam absorvância a $\lambda = 280$ nm (varrimentos MS^1 , MS^2 e MS^3 (m/z), λ de absorção máxima e tempo de retenção)

Pico	Polifenóis	MS^1 (m/z)	MS^2 (m/z)	MS^3 (m/z)	λ (nm)	Tempo de retenção (min)
1	Ácido gálico	169	-		271	19,0
2	Ácido protocatecuico	153	109	-	259/292	32,8
3	Cy-3-glc	447	285	-	514	44,9
4	Desconhecido	481	318/301	165/153/182	265	65,2
5	Galoil-bis-hexahidroxidifenoil-glucose	935	633/301	-	289	69,9
6	Galoil-bis-hexahidroxidifenoil-glucose	935	633/301	-	265	74,4
7	Ácido elágico	301	229/257/185	-	256/367	82,1
8	Quercetina-3-glucósido / Quercetina-3-galactósido	463	301	257/179/271/151	349	90,2

Através da reta de calibração, foi determinada a concentração total de polifenóis de baixo peso molecular presentes no extrato, tendo-se determinado uma concentração de $(0,00388 \pm 0,00003)$ mg de polifenóis de baixo molecular (em equivalentes de ácido gálico) por mg de extrato.

4.1.3. Determinação do conteúdo em flavonóis

Através do método dos flavonóis, foi obtido um cromatograma para o extrato de antocianinas de amora a $\lambda = 370$ nm, que se encontra na **Fig. 4.3**. Através do cromatograma do extrato é possível identificar a presença de: 1 - Quercetina-3-glucurónido; 2 - Quercetina-3-(6'-(3-hidroxi-3-metilglutaroil)-galactósido / Quercetina-3-glucósido / Quercetina-3-galactósido; e 3 - Desconhecido; na **Tabela 4.3** [146].

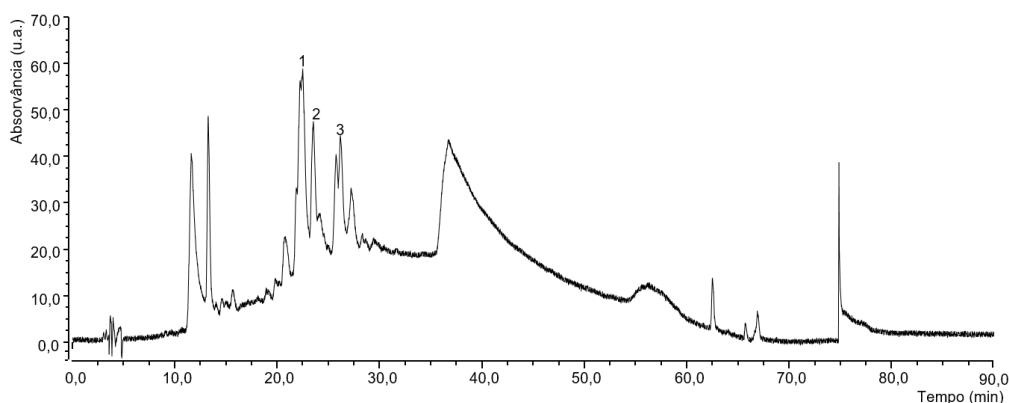


Fig. 4.3 - Cromatograma representativo da análise por HPLC dos flavonóis presentes no extrato de amora a $\lambda = 370$ nm.

Tabela 4.3 - Identificação estrutural por HPLC-MS dos flavonóis presentes no extrato de amora (varrimentos MS^1 , MS^2 e MS^3 (m/z), λ de absorção máxima e tempo de retenção)

Pico	Flavonóis	MS^1 (m/z)	MS^2 (m/z)	MS^3 (m/z)	λ (nm)	Tempo de retenção (min)
1	Quercetina-3-glucurónido	477	301	179/151	253/334	22,3
2	Quercetina-3-(6'-(3-hidroxi-3-metilglutaroil)-galactósido	607	463	301	253/352	22,9
	Quercetina-3-glucósido / Quercetina-3-galactósido	463	301	257/179/ 271/151	253/340	23,0
3	Desconhecido	837	791	773/451/ 565/338	253/355	27,3

Usando a reta de calibração obtida, foi determinada a concentração total de flavonóis presentes no extrato, tendo-se determinado uma concentração de $(0,006 \pm 0,002)$ mg de flavonóis (em equivalentes de quercetina-3-galactósido) por mg de extrato.

4.1.4. Determinação do conteúdo total em fenóis

Através do método de Folin-Ciocalteu, foi determinado o conteúdo total em fenóis presentes na amostra. Neste caso, foi determinada uma concentração total de $(0,64 \pm 0,04)$ mg de fenóis (em equivalentes de cy-3-glc) por mg de extrato. Este valor é concordante com a soma dos valores obtidos para o conteúdo em antocianinas, polifenóis de baixo peso molecular e flavonóis. Dado que o conteúdo em polifenóis de baixo peso molecular e flavonóis, é praticamente nulo, conclui-se que os compostos fenólicos que compõem este extrato são maioritariamente antocianinas.

4.1.5. Determinação do teor em humidade

A determinação do teor em humidade foi realizada com 5,00 mg de extrato e, ao fim de duas semanas, verificou-se uma diminuição da massa em 0,47 mg. Deste modo, foi determinado um teor em humidade de $(0,09 \pm 0,01)$ mg de água por mg de extrato, o que equivale a uma percentagem de 9%.

4.1.6. Determinação do teor em proteínas

Após a realização do método de Bradford, determinou-se um teor em proteínas de $(0,051 \pm 0,003)$ mg proteínas por mg de extrato. De facto, o teor em proteínas é bastante reduzido, tal como seria de esperar, uma vez que o extrato foi purificado através do gel de fase reversa C18. É de salientar que este método é bastante sensível e reprodutível e apresenta pouco interferentes [108].

4.1.7. Determinação da atividade antioxidante

Através do método de FRAP, foi determinada a atividade antioxidante em equivalentes de Trolox. O valor obtido foi de (66 ± 2) μmol em equivalentes de Trolox por mg de extrato. É de esperar que a atividade antioxidante do extrato seja elevada, já que os flavonóides, nomeadamente as antocianinas, têm uma elevada atividade antioxidante.

4.1.8. Determinação da atividade antirradicalar

Recorrendo ao método do DDPH, foi determinada a atividade antirradicalar do extrato em equivalentes de Trolox. O valor obtido foi de (52 ± 5) μmol em equivalentes de Trolox por mg de extrato. Nem todos os compostos com atividade antioxidante possuem atividade antirradicalar, no entanto, o poder antirradicalar do extrato está relacionado com o seu poder antioxidante, já que ambos resultam do elevado número de grupos hidroxilo, que são característicos das antocianinas (**Tabela 4.1**). Estes grupos hidroxilo apresentam uma elevada capacidade de doar átomos de hidrogénio ao DPPH e de estabilizar o eletrão desemparelhado [147].

Na literatura [148], encontra-se descrita uma atividade antioxidante entre 16,2 e 41,8 μmol em equivalentes de Trolox por mg de extrato e uma atividade antirradicalar compreendida entre 1,5 e 8,1 μmol em equivalentes de Trolox por mg de extrato de amora. Estes valores são inferiores aos obtidos, no entanto, é de notar que os extratos mencionados na literatura não foram purificados em gel de fase reversa C18, pelo que

as suas atividades antioxidante e antirradicalar por mg serão menores do que as de um extrato purificado.

Na **Tabela 4.4**, encontra-se um resumo da composição do extrato de antocianinas de amora. A determinação da composição do extrato permitiu concluir que o extrato é maioritariamente constituído por compostos fenólicos, sendo que a maioria desses compostos são antocianinas. A percentagem de polifenóis de baixo peso molecular e de flavonóis é baixa (inferior à de proteínas) e deverão existir outros compostos fenólicos no extrato para além dos determinados. A quantidade de água presente no extrato também é significativa, sendo próxima dos 10%. Aproximadamente 25% da composição do extrato permanece desconhecida, pelo que seria interessante determinar a concentração de lípidos e açúcares presentes no extrato, no entanto, tal não foi possível por limitações do equipamento. No entanto, seria de esperar que estes valores fossem baixos, dado que o extrato foi purificado em gel de fase reversa C18. O extrato apresenta uma atividade antioxidante e antirradicalar significativa, pelo que, à partida, terá um efeito protetor e antienvhecimento na pele.

Tabela 4.4 - Composição do extrato de antocianinas de amora por mg de extrato

Antocianinas (mg)	Polifenóis de baixo peso molecular (mg)	Flavonóis (mg)	Fenóis totais (mg)	Água (mg)	Proteínas (mg)	Atividade antioxidante (μmol)	Atividade antirradicalar (μmol)
0,62 ± 0,07	0,00388 ± 0,00003	0,006 ± 0,002	0,64 ± 0,04	0,09 ± 0,01	0,051 ± 0,003	66 ± 2	52 ± 5

4.2. Caracterização dos substratos têxteis

As malhas de algodão e poliamida foram tingidas com o extrato de antocianinas de amora por um processo que mimetiza o tingimento por esgotamento. Tal como já foi referido, foram testadas diversas condições, de modo a otimizar este processo. Na próxima subsecção, serão apresentadas fotografias dos têxteis bem como os resultados obtidos na caracterização por colorimetria. Nas subsecções seguintes, serão avaliados os resultados obtidos com recurso às restantes técnicas de caracterização.

4.2.1. Colorimetria

Na **Tabela 4.5** é possível observar as coordenadas colorimétricas e fotografias das amostras de algodão e de poliamida não tingidas antes (**Alg_na** e **Pol_na**) e após ativação (**Alg** e **Pol**).

Tabela 4.5 - Substratos têxteis de algodão e poliamida não tingidos antes e após ativação

	L*	a*	b*	Fotografia
Alg_na	90,86	0,54	0,31	
Alg	89,52	0,34	3,04	
Pol_na	94,62	-1,06	3,24	
Pol	93,01	-0,48	5,79	

Os substratos têxteis não tingidos apresentam valores de L* próximos de 100 (cor mais clara). De acordo com os resultados obtidos, a ativação dos têxteis não leva a alterações significativas da sua cor, uma vez que as coordenadas de cor se mantêm próximas das dos têxteis não ativados. No entanto, verifica-se uma certa tendência para os substratos ativados ficarem mais amarelados (aumento do valor de b*).

Estes substratos têxteis foram tingidos por impregnação à temperatura ambiente e foram testadas duas variáveis: o número de impregnações (1 a 3 impregnações) e o pH (2 e 3). Na **Tabela 4.6**, são apresentadas as coordenadas colorimétricas e fotografias das amostras de algodão tingidas por este método (**Alg@am_i1_pH2**, **Alg@am_i1**, **Alg@am_i2** e **Alg@am_i3**), bem como dos respetivos provetes resultantes da lavagem. Para além disso, são apresentados os valores de ΔE relativamente ao algodão e a percentagem de lixiviação.

Tabela 4.6 - Substratos têxteis de algodão tingidos por impregnação à temperatura ambiente, antes e após a lavagem

	L*	a*	b*	ΔE	Percentagem de lixiviação (%)	Fotografia
Alg@am_i1_pH2	63,18	9,04	-1,86	28,16	48,75	
Alg@am_i1_pH2 (lavado)	76,05	5,15	4,98	14,43		
Alg@am_i1	56,05	11,38	-2,32	35,65	45,99	
Alg@am_i1 (lavado)	71,43	5,03	7,67	19,25		
Alg@am_i2	49,71	15,99	-3,96	43,34	48,16	
Alg@am_i2 (lavado)	68,16	6,65	6,02	22,47		
Alg@am_i3	44,77	18,74	-3,83	48,86	51,36	
Alg@am_i3 (lavado)	66,88	6,96	6,96	23,77		

Como é possível observar na **Tabela 4.6**, o aumento do número de impregnações leva a que os substratos têxteis apresentem uma cor mais escura, o que

pode ser comprovado pela diminuição do valor de L^* , e mais avermelhada, o que é confirmado pelo aumento do valor de a^* . Ao comparar a amostra tingida a pH 2 (**Alg@am_i1_pH2**) com o provete tingido a pH 3 (**Alg@am_i1**), onde não houve qualquer ajuste do pH do extrato, verifica-se que o primeiro tem uma cor mais clara do que o segundo, dado que o seu valor de L^* é mais elevado. Ao comparar com a amostra **Alg**, e tal como já seria expectável, o provete **Alg@am_i3** é o que apresenta maior diferença de cor relativamente à amostra **Alg**.

Relativamente à solidez à lavagem, a perda de cor é relativamente menor quando é utilizado o extrato sem ajuste de pH comparativamente ao extrato a pH 2 e esta tende a aumentar com o aumento do número de impregnações.

Na **Tabela 4.7**, são apresentadas as coordenadas colorimétricas e fotografias dos provetes de poliamida tingidos pelo mesmo método (**Pol@am_i1_pH2**, **Pol@am_i2_pH2**, **Pol@am_i1** e **Pol@am_i2**) e das respetivas amostras resultantes da lavagem. São apresentados os valores de ΔE relativamente à poliamida e a percentagem de lixiviação.

Tabela 4.7 - Substratos têxteis de poliamida tingidos por impregnação à temperatura ambiente, antes e após a lavagem

	L^*	a^*	b^*	ΔE	Percentagem de lixiviação (%)	Fotografia
Pol@am_i1_pH2	79,22	2,18	13,02	15,79	-	
Pol@am_i2_pH2	78,97	2,13	10,30	14,97	-	
Pol@am_i1	77,49	1,72	13,26	17,35	18,96	
Pol@am_i1 (lavado)	80,47	1,69	11,79	14,06		
Pol@am_i2	71,30	0,93	11,04	22,37	21,31	
Pol@am_i2 (lavado)	76,69	1,44	12,12	17,61		

No caso da malha de poliamida, o método de tingimento por impregnação não foi bem-sucedido. Os provetes mantêm uma tonalidade clara, embora se verifique uma diminuição do valor de L^* relativamente à amostra original. Comparando as coordenadas de cor destas amostras com as da não tingida (**Pol**), verifica-se um aumento dos valores de a^* , o que é indicativo de uma tonalidade mais avermelhada e de que algumas antocianinas terão ficado imobilizadas (**Tabela 4.7**). Uma vez que o tingimento com o extrato sem ajuste de pH não foi satisfatório (amostras **Pol@am_i1** e **Pol@am_i2**), procedeu-se a uma acidificação do extrato. O pH utilizado (pH = 2) não

foi muito diferente do inicial ($\text{pH} = 3$), mas, o facto de haver mais espécies com carga positiva em solução poderia favorecer o processo de tingimento, já que a poliamida se encontra desprotonada e com carga negativa. No entanto, verifica-se que esta acidificação não favoreceu o processo de tingimento (os valores das coordenadas colorimétricas das amostras **Pol@am_i1_pH2** e **Pol@am_i2_pH2** são idênticas aos dos provetes **Pol@am_i1** e **Pol@am_i2**). Comparando com o provete **Pol**, a amostra **Pol@am_i2** é a que apresenta maior diferença de cor relativamente à amostra **Pol**.

Apesar dos resultados obtidos, testou-se a resistência à lavagem em dois casos (**Pol@am_i1** e **Pol@am_i2**); porém, este procedimento era dispensável, dado que, visualmente, as antocianinas não ficaram imobilizadas nos substratos. Mais uma vez, o aumento do número de impregnações levou a uma percentagem de lixiviação superior.

As amostras de algodão e de poliamida tingidas por este método não ficaram com uma aparência homogénea. Para além disso, a malha de algodão tingida apresentou pouca resistência à lavagem e a poliamida quase não ficou tingida. Por isso, houve necessidade de recorrer a outro tipo de tingimento, designado de tingimento por esgotamento.

Na **Tabela 4.8** encontram-se apresentados os resultados obtidos para o algodão usando o tingimento por esgotamento com extrato a pH 2 e sem ajuste de pH (**Alg@am_pH2** e **Alg@am**, respetivamente).

Tabela 4.8 - Substratos têxteis de algodão tingidos por esgotamento, antes e após a lavagem

	L*	a*	b*	ΔE	Percentagem de lixiviação (%)	Fotografia
Alg@am_pH2	64,53	8,22	4,21	26,23	20,23	
Alg@am_pH2 (lavado)	70,24	6,49	8,36	20,92		
Alg@am	52,24	15,06	3,52	40,08	21,18	
Alg@am (lavado)	59,48	8,81	7,96	31,59		

No tingimento por esgotamento, as amostras apresentam uma tonalidade bordô com coordenadas de cor entre o vermelho e o amarelo (valores de a^* e b^* positivos). Ao diminuir o pH do extrato usado no tingimento, o provete tingido **Alg@am_pH2** ficou mais claro do que o tingido com extrato sem ajuste de pH (**Alg@am**), havendo um aumento dos valores de L^* (**Tabela 4.8**). Ao comparar com a amostra **Alg**, o substrato tingido com extrato sem ajuste de pH é o que apresenta maior diferença de cor relativamente à amostra não tingida.

Após a lavagem, os têxteis adquiriram uma cor mais acastanhada / amarelada (o que pode ser confirmado pela diminuição dos valores de a^* e aumento dos valores de b^*) e mais clara (aumento dos valores de L^*). As perdas de cor parecem ser equivalentes independentemente do pH utilizado, no método de esgotamento.

Os substratos de poliamida também foram tingidos por esgotamento usando as mesmas condições (**Pol@am_pH2** e **Pol@am**, Tabela 4.9).

Tabela 4.9 - Substratos têxteis de poliamida tingidos por esgotamento, antes e após a lavagem

	L^*	a^*	b^*	ΔE	Percentagem de lixiviação (%)	Fotografia
Pol@am_pH2	62,09	4,16	4,20	31,30	0,27	
Pol@am_pH2 (lavado)	62,09	3,81	5,30	31,21		
Pol@am	52,15	5,56	9,50	41,47	3,87	
Pol@am (lavado)	53,70	4,80	9,87	39,86		

As amostras de poliamida tingidas adquiriram cores distintas das do algodão e menos avermelhadas (valores de a^* mais baixos: para o algodão o valor de a^* era superior a 8,00 e para a poliamida na ordem dos 4,00). Ao contrário do tingimento por impregnação, onde os substratos praticamente não tingiram, usando o tingimento por esgotamento, verifica-se que estes adquirem uma cor acastanhada (coordenadas de cor entre o vermelho e o amarelo, ou seja, valores de a^* e b^* positivos). Ao diminuir o pH do extrato usado no tingimento, a amostra **Pol@am_pH2** ficou mais clara do que o provete **Pol@am**, havendo um aumento dos valores de L^* (Tabela 4.9). Comparando com o substrato **Pol**, o substrato tingido com extrato sem ajuste de pH é o que apresenta maior diferença de cor relativamente ao provete **Pol**.

Após a lavagem, as cores mantiveram-se idênticas, verificando-se diferenças pouco significativas entre os valores das coordenadas L^* , a^* e b^* (Tabela 4.9). As perdas de cor observadas para ambas as amostras após a lavagem são muito reduzidas, pelo que a interação estabelecida entre as antocianinas e este substrato têxtil é uma interação forte (talvez ligação covalente), não sendo perdida no processo de lavagem.

De um modo geral, o tingimento por esgotamento revelou-se mais eficaz do que o tingimento por impregnação, sobretudo usando a malha de poliamida. Para além disso, observou-se uma maior resistência às lavagens do que no tingimento por impregnação. Assim, conclui-se que o uso de uma temperatura mais elevada durante o

tingimento bem como um maior tempo de exposição do substrato têxtil ao corante leva a uma maior imobilização das antocianinas no mesmo.

Também foram testadas outras variáveis no tingimento dos têxteis. Numa primeira fase, foi testado o uso de mordente, de modo a avaliar se este favorecia ou não a imobilização das antocianinas nos substratos têxteis. A escolha de mordentes derivados do alumínio, como o sulfato de alumínio e o sulfato de alumínio e potássio, prende-se com o facto de estes serem frequentemente usados e considerados dos mais seguros na aplicação de corantes naturais em substratos têxteis [149].

Os provetes de algodão foram tingidos na ausência (**Alg@am**) e na presença de mordentes, como o sulfato de alumínio e o sulfato de alumínio e potássio (**Alg@am_sa** e **Alg@am_sap**, respetivamente). Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 4.10**.

Tabela 4.10 - Efeito do uso de mordente no tingimento dos substratos têxteis de algodão, antes e após a lavagem

	L*	a*	b*	ΔE	Percentagem de lixiviação (%)	Fotografia
Alg@am	52,24	15,06	3,52	40,08	21,18	
Alg@am (lavado)	59,48	8,81	7,96	31,59		
Alg@am_sa	51,57	5,72	-7,75	39,81	25,24	
Alg@am_sa (lavado)	60,01	1,75	-0,65	29,76		
Alg@am_sap	46,86	11,93	-5,72	45,06	25,68	
Alg@am_sap (lavado)	56,36	3,65	-0,27	33,49		

Através destes resultados, é possível observar que os substratos têxteis tingidos na ausência e na presença de mordente adquirem cores bastante distintas. A amostra **Alg@am** tem uma cor mais alaranjada (valores de a^* e b^* positivos) enquanto o provete **Alg@am_sa** apresenta uma cor roxa e a amostra **Alg@am_sap** é cor-de-rosa (valores de a^* positivos e de b^* negativos). Os valores de ΔE obtidos sugerem que o provete **Alg@am_sap** é o que apresenta maior diferença de cor relativamente ao provete **Alg** enquanto o que apresenta menor diferença de cor é a amostra **Alg@am_sa**.

Quanto à lavagem, houve alguma perda de cor em todas as amostras, o que pode ser comprovado pelas percentagens de lixiviação. Verifica-se que a amostra tingida na ausência de mordente (**Alg@am**) foi a que perdeu menos cor e que a perda de cor foi equivalente independentemente do mordente utilizado.

O mesmo procedimento foi adotado para a poliamida e os resultados estão apresentados na **Tabela 4.11 (Pol@am, Pol@am_sa e Pol@am_sap)**.

Tabela 4.11 - Efeito do uso de mordente no tingimento dos substratos têxteis de poliamida, antes e após a lavagem

	L*	a*	b*	ΔE	Percentagem de lixiviação (%)	Fotografia
Pol@am	52,15	5,56	9,50	41,47	3,87	
Pol@am (lavado)	53,70	4,80	9,87	39,86		
Pol@am_sa	46,18	5,26	-4,81	48,35	7,67	
Pol@am_sa (lavado)	49,17	3,70	-1,54	44,64		
Pol@am_sap	42,04	7,57	-8,88	53,64	15,28	
Pol@am_sap (lavado)	49,01	4,40	-4,48	45,44		

A amostra **Pol@am** tem uma cor mais acastanhada (valores de a^* e b^* positivos) e os provetes **Pol@am_sa** e **Pol@am_sap** apresentam uma cor roxa (valores de a^* positivos e de b^* negativos). Relativamente à coordenada L^* , verifica-se que as amostras tingidas na presença de mordente (**Pol@am_sa** e **Pol@am_sap**) são mais escuras (valor de L^* mais baixo) do que o provete **Pol@am**. É de salientar que, visualmente, o provete **Pol@am_sa** apresenta um aspeto mais homogêneo do que os restantes (**Tabela 4.11**). O provete **Pol@am_sap** é o que apresenta maior diferença de cor relativamente ao provete **Pol**. Relativamente à lavagem, verifica-se que a amostra **Pol@am** foi a que perdeu menos cor e o provete **Pol@am_sap** foi o que perdeu mais.

Analisando os resultados obtidos com o algodão e a poliamida, verifica-se que, apesar de os substratos têxteis tingidos na presença de sulfato de alumínio e potássio apresentarem maior diferença de cor relativamente aos substratos originais (ΔE mais elevado), são os substratos têxteis tingidos na presença de sulfato de alumínio que possuem um tingimento mais homogêneo. Tal acontece, pois o ião alumínio(III) forma facilmente complexos de coordenação com as antocianinas [85], já que estas contêm muitos grupos OH com pares de eletrões livres que podem preencher as orbitais livres do alumínio(III). Por sua vez, o alumínio(III) também pode interagir com os grupos OH do algodão e NH da poliamida. Assim, ao interagir simultaneamente com as antocianinas e o com o substrato têxtil, o ião alumínio(III) contribui para o aumento da afinidade entre ambos. No caso do sulfato de alumínio e potássio, o ião potássio pode estabelecer algumas interações com o substrato têxtil e, nessas zonas, as interações entre as antocianinas e o substrato têxtil bem como entre o alumínio complexado com

as antocianinas e o substrato têxtil não são tão favorecidas, levando à criação de zonas onde o tingimento não é tão homogêneo.

Por isso, foram testadas outras variáveis na presença do mordente sulfato de alumínio, nomeadamente o efeito do pH (2, 3 (sem ajuste de pH), 6, 8, 10 e 12). Na **Tabela 4.12** é possível observar as características dos provetes de algodão resultantes dos tingimentos a diferentes valores de pH (**Alg@am_pH2_sa**, **Alg@am_sa**, **Alg@am_pH6_sa**, **Alg@am_pH8_sa**, **Alg@am_pH10_sa** e **Alg@am_pH12_sa**).

Tabela 4.12 - Efeito do pH no tingimento por esgotamento dos substratos têxteis de algodão, com aplicação prévia do mordente sulfato de alumínio, antes e após a lavagem

	L*	a*	b*	ΔE	Percentagem de lixiviação (%)	Fotografia
Alg@am_pH2_sa	54,24	4,66	-4,70	36,37	24,25	
Alg@am_pH2_sa (lavado)	62,03	2,09	3,53	27,55		
Alg@am_sa	51,57	5,72	-7,75	39,81	25,24	
Alg@am_sa (lavado)	60,01	1,75	-0,65	29,76		
Alg@am_pH6_sa	43,79	3,60	-4,35	46,43	10,46	
Alg@am_pH6_sa (lavado)	48,06	1,34	0,08	41,58		
Alg@am_pH8_sa	43,10	-0,96	-5,48	47,21	12,35	
Alg@am_pH8_sa (lavado)	48,73	-1,53	-3,67	41,38		
Alg@am_pH10_sa	54,94	1,59	14,03	36,30	19,14	
Alg@am_pH10_sa (lavado)	61,22	1,06	10,83	29,35		
Alg@am_pH12_sa	65,55	7,64	18,25	29,31	21,00	
Alg@am_pH12_sa (lavado)	68,68	5,25	11,87	23,16		

O tingimento usando diferentes valores de pH permite obter substratos têxteis com cores bastantes distintas. Enquanto a pHs mais ácidos (2, 3 e 6) as amostras **Alg@am_pH2_sa**, **Alg@am_sa** e **Alg@am_pH6_sa** possuem cores mais arroxeadas (valores de a^* positivos e de b^* negativos), a pHs mais básicos, foram obtidas outras cores: usando extrato a pH 8, a amostra **Alg@am_pH8_sa** ficou azul (valores de a^* e b^* negativos); usando extrato a pH 10 e a pH 12, os provetes **Alg@am_pH10_sa** e **Alg@am_pH12_sa** adquiriram uma tonalidade mais amarelada (visualmente, até mais esverdeada no caso da amostra **Alg@am_pH10_sa**), tendo-se observado um aumento do valor de a^* e uma subida mais acentuada do valor de b^* , relativamente à amostra

Alg@am_pH8_sa. Relativamente ao valor de L^* , não existe uma correlação direta entre o aumento do pH usado no tingimento e o aumento do valor de L^* . No entanto, verifica-se que as amostras **Alg@am_pH2_sa** e **Alg@am_sa** apresentam valores de L^* intermédios (entre 50,00 e 55,00), os provetes **Alg@am_pH6_sa** e **Alg@am_pH8_sa** apresentam valores de L^* mais baixos (entre 40,00 e 45,00) e, por último, as amostras **Alg@am_pH10_sa** e **Alg@am_pH12_sa** possuem uma tonalidade mais clara com valores de L^* próximos de 55,00 e 65,00, respetivamente (**Tabela 4.12**). Comparando estes provetes com a amostra **Alg**, verifica-se que os valores de ΔE das amostras tingidas com extrato a pH inferior ou igual a 8 tendem a aumentar, à medida que o pH da solução de tingimento aumenta. Para valores de pH superiores a 8 (pH 10 e pH 12), observa-se uma diminuição dos valores de ΔE . A amostra **Alg@am_pH8_sa** é a que apresenta maior diferença de cor relativamente ao **Alg**.

Relativamente à lavagem, verifica-se uma maior resistência à lavagem a valores de pH mais elevados (6, 8, 10 e 12), dado que, nestas situações, apesar da percentagem de lixiviação ser crescente com o aumento de pH, os valores são inferiores aos das amostras onde foi utilizado um pH mais ácido (2 e 3).

O mesmo ensaio foi realizado para a poliamida (**Pol@am_pH2_sa**, **Pol@am_sa**, **Pol@am_pH6_sa**, **Pol@am_pH8_sa**, **Pol@am_pH10_sa** e **Pol@am_pH12_sa**, **Tabela 4.13**).

Tabela 4.13 - Efeito do pH no tingimento por esgotamento dos substratos têxteis de poliamida, com aplicação prévia do mordente sulfato de alumínio, antes e após a lavagem

	L*	a*	b*	ΔE	Percentagem de lixiviação (%)	Fotografia
Pol@am_pH2_sa	52,37	4,07	2,44	41,03	15,87	
Pol@am_pH2_sa (lavado)	58,66	2,94	5,33	34,52		
Pol@am_sa	46,18	5,26	-4,81	48,35	7,67	
Pol@am_sa (lavado)	49,17	3,70	-1,54	44,64		
Pol@am_pH6_sa	44,44	-1,84	1,38	48,78	7,41	
Pol@am_pH6_sa (lavado)	48,11	-2,11	1,08	45,17		
Pol@am_pH8_sa	44,45	-3,75	-4,27	49,70	7,77	
Pol@am_pH8_sa (lavado)	48,11	-3,14	-3,07	45,84		
Pol@am_pH10_sa	66,28	-3,00	4,43	26,88	21,02	
Pol@am_pH10_sa (lavado)	72,08	-2,59	2,91	21,23		
Pol@am_pH12_sa	82,54	3,85	10,44	12,24	84,65	
Pol@am_pH12_sa (lavado)	92,11	0,16	4,27	1,88		

No caso do tingimento da poliamida, as amostras ficaram menos homogêneas do que as de algodão. Observa-se uma cor mais acastanhada a pH 2 e roxa a pH 3. A pH 6, verificou-se que as amostras ficaram muito pouco uniformes. A pHs mais básicos, foram obtidas outras cores: a pH 8, os provetes ficaram azuis, a pH 10, adquiriram uma cor mais esverdeada e a pH 12, mais amarelada. Estas observações estão concordantes com os valores obtidos para as coordenadas L*, a* e b* (**Tabela 4.13**). Relativamente aos valores de ΔE , verificam-se as mesmas tendências obtidas para o algodão: os valores de ΔE das amostras tingidas com extrato a pH inferior ou igual a 8 tendem a aumentar com o aumento do pH da solução de tingimento. Para pH 10 e 12, observa-se uma diminuição dos valores de ΔE . Assim, o têxtil tingido usando extrato a pH 8 é o que apresenta maior diferença de cor relativamente ao provete **Pol**.

Quanto à lavagem, observa-se que os provetes **Pol@am_pH2_sa**, **Pol@am_pH10_sa** e **Pol@am_pH12_sa** apresentam menor resistência à lavagem, sendo que para a amostra **Pol@am_pH12_sa** se verifica uma perda de cor muito elevada com a lavagem. Por outro lado, as amostras **Pol@am_sa**, **Pol@am_pH6_sa** e **Pol@am_pH8_sa** apresentam uma maior resistência à lavagem, pelo que estes valores

de pH favorecem as interações entre a poliamida e as antocianinas complexadas com o alumínio.

Os resultados obtidos usando diferentes valores de pH estão de acordo com o equilíbrio entre as diferentes formas estruturais das antocianinas a diferentes pHs. Tal como já foi referido na introdução deste trabalho (secção 1.1.1.1.a)), a pH 2, as antocianinas apresentam uma cor mais avermelhada, uma vez que a espécie predominante em solução é o catião flavílio. A pH mais elevado, o catião deixa de ser a forma predominante em solução, dando origem a outras estruturas. A sua desprotonação origina a base quinoidal que confere uma cor mais azulada à solução, o que poderá explicar a tonalidade mais azulada dos substratos têxteis tingidos a pH 8. Por outro lado, a solução também pode ficar incolor ou com uma tonalidade amarelada, devido ao surgimento da pseudobase carbinol e da chalcona que se formam por hidratação do catião flavílio. Este fenómeno pode explicar as cores obtidas usando o extrato a pH 10 e 12 [23]. Independentemente do substrato têxtil utilizado, verificam-se as mesmas tendências com as variações de pH da solução de tingimento. A maior resistência à lavagem a valores de pH mais elevados (pH entre 6 e 8) pode ser explicada pelo facto da presença do alumínio (com carga positiva) estabilizar as antocianinas (carregadas negativamente a estes valores de pH). Como o substrato têxtil também tem carga negativa, a imobilização do alumínio complexado com as antocianinas vai ser facilitada, havendo menor perda de cor com as lavagens.

Para além do pH, foi também testado o efeito da temperatura com o extrato a pH 8. Em vez da temperatura de 90 °C utilizada nos tingimentos anteriores, foi utilizada uma temperatura de 60 °C, de modo a compreender se o uso de uma temperatura mais baixa favorecia ou não a fixação do corante nos substratos têxteis. Os resultados obtidos para o algodão e para a poliamida (**Alg@am_T60_pH8_sa** e **Pol@am_T60_pH8_sa**) encontram-se na **Tabela 4.14**.

Tabela 4.14 - Efeito da temperatura no tingimento por esgotamento dos substratos têxteis de algodão e poliamida, com aplicação prévia do mordente sulfato de alumínio, antes e após a lavagem

	L*	a*	b*	ΔE	Percentagem de lixiviação (%)	Fotografia
Alg@am_T60_pH8_sa	50,12	-5,32	1,60	39,83	1,21	
Alg@am_T60_pH8_sa (lavado)	50,53	-4,94	2,05	39,35		
Pol @am_T60_pH8_sa	49,66	-5,25	-4,76	44,87	19,15	
Pol@am_T60_pH8_sa (lavado)	57,53	-4,61	-0,58	36,28		

Ao utilizar uma temperatura mais baixa (60 °C) durante o tingimento, as amostras de algodão **Alg@am_T60_pH8_sa** e de poliamida **Pol@am_T60_pH8_sa** adquiriram uma cor mais esverdeada (no caso do algodão, verifica-se uma diminuição do valor de a^* na ordem dos 4,37, um aumento do valor de b^* na ordem dos 7,08 e um aumento do valor de L^* de 7,02 relativamente à amostra **Alg@am_pH8_sa** e no caso da poliamida, observa-se uma diminuição de a^* de 1,50, uma diminuição de b^* na ordem de 0,49 e um aumento de L^* de 5,21 relativamente ao provete **Pol@am_pH8_sa**). Visualmente, os provetes tingidos a 60 °C ficaram pouco homogêneos. Os valores de ΔE obtidos para os provetes tingidos a 60 °C (**Alg@am_T60_pH8_sa** e **Pol@am_T60_pH8_sa**) são inferiores aos dos provetes tingidos a 90 °C (**Alg@am_pH8_sa** e **Pol@am_pH8_sa**).

Relativamente à lavagem, verifica-se que a percentagem de lixiviação da amostra tingida a 60°C é inferior à da amostra **Alg@am_pH8_sa** e, no caso da poliamida, o valor é superior ao da amostra **Pol@am_pH8_sa**. Atendendo apenas a estes valores, poderíamos concluir que o tingimento a 60 °C é mais eficaz para o algodão e a 90 °C é mais eficaz para a poliamida. No entanto, dado que as amostras tingidas a 60 °C ficaram menos homogêneas e apresentaram menor diferença de cor relativamente aos provetes não tingidos, admitiu-se que a utilização de uma temperatura de 90 °C se revelou mais eficaz para a imobilização das antocianinas nos têxteis.

Um outro aspeto importante a testar foi o efeito da concentração de mordente. Para isso, procedeu-se a um ensaio usando o dobro da concentração de mordente e a malha de algodão com extrato sem ajuste de pH e a pH 8 (**Alg@am_sa(2x)** e **Alg@am_pH8_sa(2x)**, Tabela 4.15).

Tabela 4.15 - Efeito da concentração de mordente no tingimento por esgotamento dos substratos têxteis de algodão, com aplicação prévia do mordente sulfato de alumínio, antes e após a lavagem

	L^*	a^*	b^*	ΔE	Percentagem de lixiviação (%)	Fotografia
Alg@am_sa(2x)	51,51	8,68	-6,01	39,95	36,34	
Alg@am_sa(2x) (lavado)	60,25	2,45	0,89	29,42		
Alg@am_pH8_sa(2x)	52,52	3,76	13,26	38,53	8,59	
Alg@am_pH8_sa(2x) (lavado)	55,59	3,30	12,03	35,22		

Com o extrato sem ajuste de pH, não houve grande diferença entre os têxteis tingidos com uma concentração de mordente igual a 0,5 mg/mL (**Alg@am_sa**) e a 1,0 mg/mL (**Alg@am_sa(2x)**), observando-se apenas um ligeiro aumento dos valores de a^*

e de b^* . A pH 8, o aumento da concentração de mordente levou a que a amostra **Alg@am_pH8_sa(2x)** adquirisse uma cor mais clara do que a obtida com a concentração normal de mordente **Alg@am_pH8_sa** (valor de L^* mais elevado). Para pH 8, verifica-se ainda uma mudança de cor de azul para uma tonalidade mais amarelada (aumento do valor de a^* e de b^*), quando a concentração de mordente aumenta para o dobro, uma vez que o excesso de mordente poderá deslocar o equilíbrio no sentido da formação de chalconas, que possuem uma tonalidade mais amarelada. Como o valor de ΔE da amostra **Alg@am_sa(2x)** é semelhante ao da amostra **Alg@am_sa** e o do provete **Alg@am_pH8_sa(2x)** é menor do que o do provete **Alg@am_pH8_sa**, então o aumento da concentração de mordente para o dobro não parece favorecer o processo de tingimento.

Quanto à lavagem, observa-se que quando é usada uma concentração de mordente superior (1,0 mg/mL), a percentagem de lixiviação da amostra tingida com extrato sem ajuste de pH (**Alg@am_sa(2x)**) é superior à da amostra **Alg@am_sa**. No entanto, a pH 8 verifica-se o contrário, embora a diferença não seja significativa. Assim, atendendo às percentagens de lixiviação, verifica-se que o aumento da concentração de mordente não favorece o tingimento.

Para a poliamida, foi realizado o mesmo tipo de ensaios (**Pol@am_sa(2x)** e **Pol@am_pH8_sa(2x)**). Os resultados obtidos são apresentados na **Tabela 4.16**.

Tabela 4.16 - Efeito da concentração de mordente no tingimento por esgotamento dos substratos têxteis de poliamida, com aplicação prévia do mordente sulfato de alumínio, antes e após a lavagem

	L^*	a^*	b^*	ΔE	Percentagem de lixiviação (%)	Fotografia
Pol@am_sa(2x)	45,50	6,71	-6,36	49,56	-4,38	
Pol@am_sa(2x) (lavado)	42,55	5,49	-3,96	51,73		
Pol@am_pH8_sa(2x)	57,74	-1,91	4,86	35,30	-0,80	
Pol@am_pH8_sa(2x) (lavado)	57,48	-1,73	4,23	35,59		

O tingimento da malha de poliamida levou a resultados com tendências semelhantes às obtidas para o algodão. Comparando os valores de ΔE com as amostras tingidas com mordente a uma concentração de 0,5 mg/mL, observa-se que o valor da amostra **Pol@am_sa(2x)** é semelhante ao da amostra **Pol@am_sa** e o do provete **Pol@am_pH8_sa(2x)** é inferior ao do provete **Pol@am_pH8_sa**, pelo que o aumento

da concentração de mordente para o dobro não parece favorecer o tingimento e torna os provetes menos homogêneos.

As percentagens de lixiviação obtidas para a poliamida tingida com o dobro de concentração de mordente são negativas, pelo que os provetes lavados não apresentaram perda de cor relativamente às amostras não lavadas.

Analisando os resultados colorimétricos para ambos os substratos, verifica-se que o aumento da concentração de mordente para o dobro não favorece significativamente a imobilização das antocianinas nos têxteis. Por isso, estabelecendo um compromisso entre o gasto de recursos e a eficiência do tingimento, decidiu-se que uma concentração de mordente igual a 0,5 mg/mL será eficaz.

Em todos os casos observados anteriormente, o mordente foi aplicado antes do tingimento das amostras com o extrato. De modo a compreender se o mordente estaria a ser utilizado na melhor altura do processo de tingimento, foi realizado um teste onde o mordente sulfato de alumínio e o extrato de antocianinas foram aplicados simultaneamente (abordagem *in situ*), usando uma temperatura de 90°C e extrato sem ajuste de pH e a pH 8 (**Alg@am_sa_situ** e **Alg@am_pH8_sa_situ**, Tabela 4.17).

Tabela 4.17 - Efeito da abordagem *in situ* no tingimento por esgotamento dos substratos têxteis de algodão, na presença do mordente sulfato de alumínio, antes e após a lavagem

	L*	a*	b*	ΔE	Percentagem de lixiviação (%)	Fotografia
Alg@am_sa_situ	50,45	6,47	-4,37	40,23	22,06	
Alg@am_sa_situ (lavado)	58,19	-0,76	-1,82	31,25		
Alg@am_pH8_sa_situ	44,99	-2,49	0,15	44,71	15,94	
Alg@am_pH8_sa_situ (lavado)	49,83	-2,76	0,29	39,90		

Os provetes de algodão adquiriram uma cor arroxeadada sem ajuste de pH (**Alg@am_sa_situ**) e esverdeada a pH 8 (**Alg@am_pH8_sa_situ**), verificando-se um aumento do valor de b^* quando comparados com os provetes **Alg@am_sa** e **Alg@am_pH8_sa**. A amostra **Alg@am_pH8_sa_situ** é a que possui maior diferença de cor quando comparada com o substrato não tingido. Os valores de ΔE são próximos dos das amostras tingidas com a aplicação prévia de mordente (**Alg@am_sa** e **Alg@am_pH8_sa**).

No caso dos provetes lavados, observa-se que as percentagens de lixiviação usando este método são próximas dos valores obtidos para os substratos onde se

procedeu à aplicação prévia do mordente (**Alg@am_sa** e **Alg@am_pH8_sa**). Dado que os provetes tingidos por esta abordagem ficaram menos homogêneos, a abordagem *in situ* mostrou não ser muito eficaz.

Estas condições também foram testadas para os substratos têxteis de poliamida (**Pol@am_sa_situ** e **Pol@am_pH8_sa_situ**, Tabela 4.18).

Tabela 4.18 - Efeito da abordagem *in situ* no tingimento por esgotamento dos substratos têxteis de poliamida, na presença do mordente sulfato de alumínio, antes e após a lavagem

	L*	a*	b*	ΔE	Percentagem de lixiviação (%)	Fotografia
Pol@am_sa_situ	51,47	4,11	-0,63	42,27	15,94	
Pol@am_sa_situ (lavado)	57,54	1,23	4,40	35,54		
Pol@am_pH8_sa_situ	45,32	-5,91	5,10	48,00	4,92	
Pol@am_pH8_sa_situ (lavado)	47,65	-5,43	4,65	45,64		

Quanto ao tingimento *in situ* dos substratos de poliamida, verificaram-se tendências semelhantes às dos provetes de algodão. A amostra tingida com extrato a pH 8, usando a abordagem *in situ* (**Pol@am_pH8_sa_situ**) é a que possui maior diferença de cor quando comparada com o substrato original não tingido. Os valores de ΔE são próximos dos das amostras tingidas com a aplicação prévia de mordente.

Avaliando os efeitos da lavagem, verifica-se que, usando extrato sem ajuste de pH e a abordagem “*in situ*”, a percentagem de lixiviação da amostra **Pol@am_sa_situ** é superior à da amostra **Pol@am_sa**; no entanto, observa-se o oposto a pH 8 (**Pol@am_pH8_sa**). Assim, atendendo às percentagens de lixiviação, verifica-se que o aumento da concentração de mordente não favorece o tingimento com extrato sem ajuste de pH. A pH 8, embora se tenha verificado uma percentagem de lixiviação inferior, os provetes ficaram pouco homogêneos.

Esta abordagem *in situ* revela-se uma alternativa menos promissora do que o uso prévio de mordente, uma vez que as amostras de algodão e de poliamida ficaram pouco uniformes. Isto pode ser justificado pelo facto de o alumínio complexar com as antocianinas em solução e fazer com que estas precipitem em vez de ficarem imobilizadas no têxtil. De facto, durante o processo de tingimento, observou-se a formação de algum precipitado no banho.

Um outro efeito avaliado foi a concentração de antocianinas. Neste caso, ambos os substratos têxteis foram tingidos por esgotamento e o sulfato de alumínio foi usado

previamente como mordente. Os tingimentos foram realizados a 90 °C e foi usado extrato sem ajuste de pH e a pH 8 com o dobro da concentração (2,0 mg/mL). Os resultados obtidos para o algodão (**Alg@am(2x)_sa** e **Alg@am(2x)_pH8_sa**) encontram-se apresentados na **Tabela 4.19**.

Tabela 4.19 - Efeito da concentração de extrato no tingimento por esgotamento dos substratos têxteis de algodão, com aplicação prévia do mordente sulfato de alumínio, antes e após a lavagem

	L*	a*	b*	ΔE	Percentagem de lixiviação (%)	Fotografia
Alg@am(2x)_sa	40,49	20,93	-4,95	53,77	27,99	
Alg@am(2x)_sa (lavado)	51,69	7,23	-1,55	38,72		
Alg@am(2x)_pH8_sa	44,87	1,65	5,80	44,75	11,87	
Alg@am(2x)_pH8_sa (lavado)	50,14	0,85	5,13	39,44		

A partir da **Tabela 4.19** é possível verificar que as amostras de algodão tingidas com uma concentração de extrato de 2,0 mg/mL (**Alg@am(2x)_sa** e **Alg@am(2x)_pH8_sa**) adquiriram uma cor mais avermelhada sem ajuste de pH (valor de a* maior) e mais amarelada a pH 8 (valor de b* maior) do que as amostras tingidas com a concentração de 1,0 mg/mL (**Alg@am_sa** e **Alg@am_pH8_sa**). Relativamente ao valor de L*, a amostra **Alg@am(2x)_sa** apresenta um valor mais baixo do que o provete **Alg@am_sa**, pelo que é mais escura. No entanto, a pH 8 não há grande diferença entre as amostras **Alg@am(2x)_pH8_sa** e **Alg@am_pH8_sa**. A amostra tingida com extrato com o dobro da concentração e sem ajuste de pH (**Alg@am(2x)_sa**) é a que possui maior diferença de cor quando comparada com o substrato original não tingido. Contrariamente aos resultados verificados nos outros testes, o valor de ΔE da amostra **Alg@am(2x)_sa** é superior ao da amostra **Alg@am_sa** verificando-se uma tendência oposta para o provete **Alg@am_pH8_sa**.

No que diz respeito à lavagem, verificou-se alguma perda de cor, havendo maior perda de cor no provete tingido com extrato sem ajuste de pH, **Alg@am(2x)_sa**. As percentagens de lixiviação usando o dobro da concentração de extrato são próximas dos valores obtidos para os provetes **Alg@am_sa** e **Alg@am_pH8_sa**, pelo que a perda de cor com a lavagem não parece depender da concentração de extrato para o intervalo de concentrações estudado.

As mesmas condições foram utilizadas para tingir a malha de poliamida (**Pol@am(2x)_sa** e **Pol@am(2x)_pH8_sa**, **Tabela 4.20**).

Tabela 4.20 - Efeito da concentração de extrato no tingimento por esgotamento dos substratos têxteis de poliamida, com aplicação prévia do mordente sulfato de alumínio, antes e após a lavagem

	L*	a*	b*	ΔE	Porcentagem de lixiviação (%)	Fotografia
Pol@am(2x)_sa	39,21	10,79	-1,50	55,44	16,89	
Pol@am(2x)_sa (lavado)	47,43	5,85	3,39	46,07		
Pol@am(2x)_pH8_sa	45,36	-1,95	-1,84	48,28	5,90	
Pol@am(2x)_pH8_sa (lavado)	48,41	-1,82	-2,75	45,43		

Quanto à poliamida, o aumento da concentração de antocianinas para o dobro favoreceu o tingimento quando foi usado o extrato sem ajuste de pH (**Pol@am(2x)_sa**) (o valor de a^* aumenta aproximadamente 5,53, o valor de b^* também aumenta 3,31 e o valor de L^* diminui 6,97, pelo que o provete ficou com uma tonalidade mais escura comparativamente ao da amostra **Pol@am_sa**). A utilização do extrato a pH 8 não parece ter favorecido muito o tingimento, já que as coordenadas de cor da amostra **Pol@am(2x)_pH8_sa** são semelhantes às do provete **Pol@am_pH8_sa**. A amostra **Pol@am(2x)_sa** é a que apresenta maior diferença de cor quando comparada com todas as amostras de poliamida tingidas com extrato de amora (cujos valores variam entre 12,24 a 55,44).

No que diz respeito à lavagem, verifica-se que, para os tingimentos com extrato sem ajuste de pH, a amostra **Pol@am(2x)_sa** apresenta maior perda de cor com a lavagem do que o provete **Pol@am_sa**. Quanto o extrato se encontra a pH 8, observa-se um efeito contrário. Deste modo, o aumento da concentração para o dobro não parece favorecer o tingimento dos substratos de poliamida, quando é usado extrato sem ajuste de pH.

De um modo geral, verifica-se que usar o dobro da concentração de antocianinas leva a que as cores dos provetes fiquem mais fortes do que as iniciais, mas não aumenta muito a resistência à lavagem. Por isso, fazendo um balanço entre o gasto de recursos e a eficiência do tingimento, comprovou-se que uma concentração de extrato de antocianinas de amora igual a 1,0 mg/mL parece ser eficaz para tingir os substratos têxteis na presença de mordente (principalmente no caso da poliamida).

Por último, foi avaliada a necessidade de ativação da malha de algodão, tendo-se procedido ao tingimento de têxteis não ativados a uma temperatura de 90 °C e com extrato sem ajuste de pH (a uma concentração de 1,0 mg/mL e de 2,0 mg/mL) e a pH 8 (a uma concentração de 1,0 mg/mL). O sulfato de alumínio e o sulfato de alumínio e

potássio foram utilizados previamente como mordentes (**Alg_na@am_sa**, **Alg_na@am_pH8_sa**, **Alg_na@am(2x)_sa** e **Alg_na@am_sap**, Tabela 4.21).

Tabela 4.21 - Efeito da ativação dos substratos têxteis de algodão no tingimento por esgotamento, com aplicação prévia dos mordentes sulfato de alumínio e sulfato de alumínio e potássio, antes e após a lavagem

	L*	a*	b*	ΔE	Percentagem de lixiviação (%)	Fotografia
Alg_na@am_sa	47,96	16,28	-6,22	45,46	28,74	
Alg_na@am_sa (lavado)	57,93	5,68	-1,82	32,40		
Alg_na@am_pH8_sa	57,19	0,77	0,37	32,44	22,91	
Alg_na@am_pH8_sa (lavado)	64,61	0,86	0,91	25,00		
Alg_na@am(2x)_sa	39,80	22,13	-7,20	55,25	32,43	
Alg_na@am(2x)_sa (lavado)	53,67	7,95	-4,07	37,33		
Alg_na@am_sap	43,90	17,54	-7,89	49,96	33,23	
Alg_na@am_sap (lavado)	57,52	7,03	-3,61	33,36		

Através dos resultados obtidos, verifica-se que a ativação dos substratos têxteis não parece ser um aspeto muito importante para a malha de algodão, dado que mesmo sem ativação as amostras tingidas ficaram homogêneas. Usando o sulfato de alumínio sem ajuste de pH, o provete não ativado (**Alg_na@am_sa**) ficou rosa em vez de roxo (a cor observada no provete ativado, **Alg@am_sa**), verificando-se um aumento de 10,56 no valor de a^* e variações reduzidas no valor de b^* e L^* . No que diz respeito à utilização do pH 8, a cor obtida foi muito distinta da do têxtil ativado, uma vez que, neste caso, o provete **Alg_na@am_pH8_sa** ficou mais amarelado e mais claro (aumento do valor de b^* em 5,85 e aumento do valor de L^* em 14,09) relativamente à amostra **Alg@am_pH8_sa**, que tinha uma tonalidade azul. As cores observadas quando foi usado o dobro da concentração de extrato e o sulfato de alumínio como mordente foram idênticas nos substratos **Alg_na@am(2x)_sa** e **Alg @am(2x)_sa** (coordenadas de cor semelhantes). No caso em que foi utilizado sulfato de alumínio e potássio como mordente, verificou-se que a cor do provete não ativado (**Alg_na@am_sap**) ficou mais avermelhada do que da amostra **Alg@am_sap** (aumento de a^* em 5,61); no entanto, as restantes coordenadas de cor são semelhantes. Neste caso, a amostra **Alg_na@am(2x)_sa** é a que apresenta maior diferença de cor quando comparada com o substrato original não tingido e conclui-se que para os substratos têxteis tingidos com extrato sem ajuste de pH, a não ativação parece favorecer o tingimento, já que os

valores de ΔE são superiores para os substratos não ativados. A pH 8, verifica-se o oposto, pelo que a ativação parece ser crucial para tingimentos a pH mais elevados, usando o extrato de antocianinas de amora.

Relativamente à lavagem, verifica-se que as percentagens de lixiviação dos provetes não ativados são superiores aos das amostras ativadas, pelo que a ativação do substrato de algodão parece ser importante para aumentar a resistência à lavagem.

O mesmo estudo também foi realizado para a poliamida (**Pol_na@am_sa**, **Pol_na@am_pH8_sa**, **Pol_na@am(2x)_sa** e **Pol_na@am_sap**, Tabela 4.22).

Tabela 4.22 - Efeito da ativação dos substratos têxteis de poliamida no tingimento por esgotamento, com aplicação prévia dos mordentes sulfato de alumínio e sulfato de alumínio e potássio, antes e após a lavagem

	L*	a*	b*	ΔE	Percentagem de lixiviação (%)	Fotografia
Pol_na@am_sa	48,13	6,79	-0,25	45,86	12,45	
Pol_na@am_sa (lavado)	53,14	4,23	5,09	40,15		
Pol_na@am_pH8_sa	56,53	-1,28	-1,35	37,18	9,77	
Pol_na@am_pH8_sa (lavado)	59,97	-0,71	0,00	33,55		
Pol_na@am(2x)_sa	41,34	10,72	4,02	52,59	18,79	
Pol_na@am(2x)_sa (lavado)	50,53	5,48	8,15	42,96		
Pol_na@am_sap	47,05	6,63	-0,93	46,99	20,25	
Pol_na@am_sap (lavado)	56,00	4,03	1,95	37,47		

No caso da poliamida, observou-se que, usando o sulfato de alumínio, sem ajuste de pH, com a concentração de extrato igual a 1,0 mg/mL (**Pol_na@am_sa**) e a 2,0 mg/mL (**Pol_na@am(2x)_sa**), os substratos têxteis não ativados ficaram mais amarelados (aumento do valor de b^* na ordem de 4,56 para o primeiro e de 5,52 para o segundo, quando comparado com as amostras ativadas). No que diz respeito à utilização do pH 8, observou-se um comportamento idêntico ao da malha de algodão (o provete **Pol_na@am_pH8_sa** ficou mais avermelhado, mais amarelado e mais claro, o que pode ser comprovado pelo aumento de a^* , de b^* e de L^* relativamente à amostra **Pol@am_pH8_sa** que tinha uma tonalidade azul). Quando foi usado o sulfato de alumínio e potássio como mordente (**Pol_na@am_sap**), a amostra ficou mais amarela (aumento de b^* em 7,95) e mais clara (aumento de L^* em 5,00). Em todas as situações, os provetes de poliamida ficaram com um aspeto muito pouco uniforme, o que dificulta a avaliação das suas características. O substrato **Pol_na@am(2x)_sa** é o que

apresenta maior diferença de cor quando comparado com o original; mesmo assim, esse valor é inferior ao do têxtil ativado. Neste caso, a não ativação dos substratos têxteis parece não favorecer o tingimento, já que os valores de ΔE são inferiores para os substratos não ativados.

No que diz respeito às amostras lavadas, as percentagens de lixiviação dos provetes não ativados são superiores aos das amostras ativadas, pelo que se verifica maior perda de cor durante a lavagem do que nos substratos ativados.

Através dos resultados obtidos, verifica-se que a ativação dos têxteis não parece ser fundamental para o algodão. No entanto, é crucial para que a poliamida fique tingida de um modo homogêneo. Todo este conjunto de resultados sugere que o extrato de antocianinas de amora pode ser usado com sucesso para o tingimento dos substratos têxteis, apresentando maior eficácia no caso da malha de algodão. Assim, as condições ótimas para o algodão correspondem ao substrato não ativado, com ou sem aplicação prévia de mordente a uma concentração de 0,5 mg/mL, o uso de extrato sem ajuste de pH (pH ácido), a uma concentração de 1,0 ou 2,0 mg/mL e uma temperatura de 90 °C.

Por esse motivo, foram preparados 4 substratos têxteis distintos, nas condições otimizadas, com os códigos: **Alg_na@am(2x)**, **Alg_na@am(4x)**, **Alg_na@am(2x)_sa** e **Alg_na@am(4x)_sa** para serem testadas as suas propriedades biológicas (Tabela 4.23).

Tabela 4.23 - Substratos têxteis de algodão testados nos ensaios biológicos tingidos pelo método de esgotamento, na ausência e na presença prévia do mordente sulfato de alumínio, antes e após a lavagem

	L*	a*	b*	ΔE	Percentagem de lixiviação (%)	Fotografia
Alg_na@am(2x)	43,51	23,04	-4,34	51,83	25,72	
Alg_na@am(2x) (lavado)	52,30	8,81	-2,03	38,50		
Alg_na@am(2x)_sa	39,80	22,13	-7,20	55,25	32,43	
Alg_na@am(2x)_sa (lavado)	53,67	7,95	-4,07	37,33		
Alg_na@am(4x)	26,92	29,44	6,42	69,11	23,01	
Alg_na@am(4x) (lavado)	38,69	15,76	-0,19	53,21		
Alg_na@am(4x)_sa	23,35	25,27	4,97	70,73	29,15	
Alg_na@am(4x)_sa (lavado)	41,32	13,17	-1,85	50,11		

Os resultados obtidos encontram-se de acordo com o esperado, verificando-se que os substratos têxteis tingidos com extrato de antocianinas a uma concentração de 4,0 mg/mL (**Alg_na@am(4x)** e **Alg_na@am(4x)_sa**) são mais avermelhados (valores de a^* mais elevados em 6,40 e 3,14 unidades, respetivamente), mais amarelados (valores de b^* mais elevados em 10,76 e 12,17, respetivamente) e mais escuros (valores de L^* mais baixos em cerca de 16,50) do que os têxteis tingidos na presença de extrato a uma concentração de 2,0 mg/mL (**Alg_na@am(2x)** e **Alg_na@am(2x)_sa**). Esta situação verifica-se para os substratos tingidos na ausência e na presença de mordente. Na presença de mordente, verifica-se que os substratos são menos avermelhados (**Alg_na@am(2x)_sa** e **Alg_na@am(4x)_sa**) (valores de a^* mais baixos, 0,91 e 4,17, respetivamente), mais azulados (valores de b^* mais baixos, 2,86 e 1,46, respetivamente) e mais escuros (valores de L^* mais baixos, 3,72 e 3,57, respetivamente) do que na ausência de mordente para ambas as concentrações. Neste caso, a amostra **Alg_na@am(4x)_sa** é a que apresenta maior diferença de cor quando comparada com a do substrato original. Quando se duplica a concentração de extrato de 2,0 para 4,0 mg/mL, a diferença de cor não duplica, embora se verifique um aumento (superior na ausência de mordente). Também se verifica que o valor de ΔE é maior na presença de mordente para ambas as concentrações.

Quanto à lavagem, observa-se que os substratos têxteis tingidos com 4,0 mg/mL de extrato e na ausência de mordente apresentam uma maior resistência à lavagem.

Para estudar a influência do mordente, do pH e verificar a robustez das antocianinas durante os tingimentos, foram realizadas análises por HPLC do extrato de antocianinas de amora antes e depois dos tingimentos bem como do extrato incubado a 90 °C durante 1 hora. Nas **Figs. 4.4 a 4.7**, serão apresentados cromatogramas representativos de alguns dos tingimentos. É de notar que, por questões de logística, foi apenas realizado tingimento para cada amostra, pelo que os resultados obtidos são apenas preliminares, sendo necessário efetuar mais réplicas para os validar.

Na **Fig. 4.4** estão representados os cromatogramas relativos ao tingimento da amostra **Alg@am** com o extrato de antocianinas de amora sem ajuste de pH. Através dos cromatogramas obtidos por HPLC é possível observar que a concentração de antocianinas no extrato diminuiu cerca de 33% após a incubação a 90°C durante 1 hora, o que constitui uma prova de que parte das antocianinas foram degradadas (sofreram modificações estruturais durante este processo) e que aproximadamente 31% ficaram imobilizadas nos substratos têxteis.

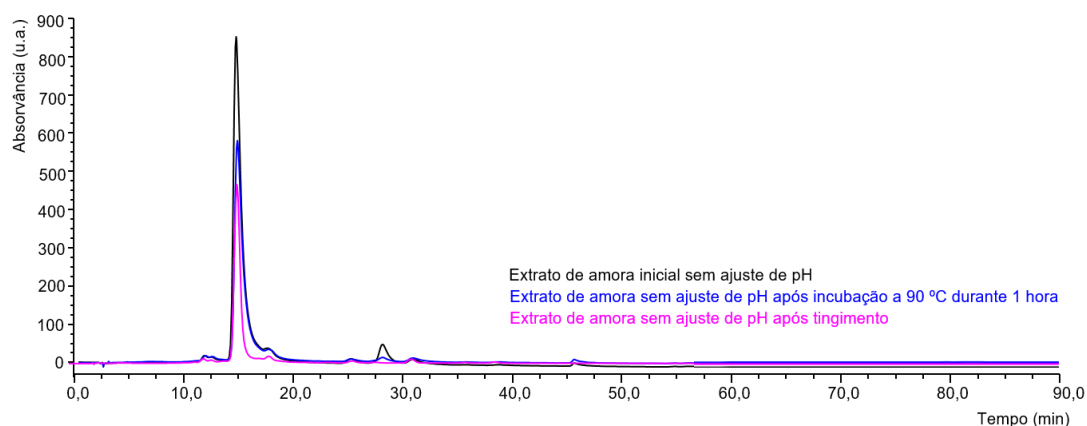


Fig. 4.4 - Cromatogramas representativos da análise por HPLC do extrato de antocianinas de amora sem ajuste de pH antes (preto) e após o tingimento (rosa) da amostra **Alg@am** bem como do extrato após incubação a 90 °C durante 1 hora (azul) a $\lambda = 520$ nm.

Na **Fig. 4.5** são apresentados os cromatogramas obtidos relativos ao tingimento da amostra **Alg@am_sa** realizado com o extrato de antocianinas sem ajuste de pH e com aplicação prévia de sulfato de alumínio. Estes cromatogramas mostram que a adição de sulfato de alumínio à solução de extrato numa proporção 1/1 leva a uma diminuição da concentração de antocianinas em cerca de 7%. No HPLC, são detetadas as antocianinas na forma de catião flavílio e dado que o sulfato de alumínio estabiliza essencialmente as formas quinoidais, o equilíbrio desloca-se nesse sentido, diminuindo a quantidade de antocianinas em solução que podem ser detetadas. No entanto, é importante considerar que na solução de tingimento esta proporção não se verifica, dado que o mordente é aplicado previamente. Admitindo que a percentagem de antocianinas degradadas durante o tingimento é semelhante com ou sem uso prévio de mordente (33%), é possível inferir que cerca de 38% das antocianinas presentes no extrato ficaram imobilizadas nos substratos têxteis.

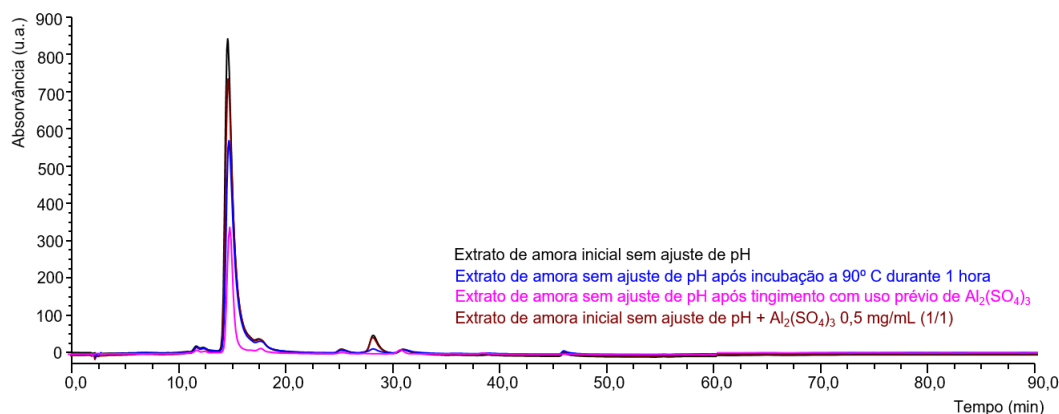


Fig. 4.5 - Cromatogramas representativos da análise por HPLC do extrato de antocianinas de amora sem ajuste de pH antes (preto) e após o tingimento (rosa) da amostra **Alg@am_sa** bem como do extrato após incubação a 90 °C durante 1 hora (azul) e de uma solução aquosa de extrato misturada com sulfato de alumínio (1/1, V/V; castanho) a $\lambda = 520$ nm.

Também foram obtidos os cromatogramas associados ao tingimento da amostra **Alg@am_pH8_sa** usando o extrato de antocianinas a pH 8 e com aplicação prévia de sulfato de alumínio. (**Fig. 4.6**). Os cromatogramas obtidos mostram que o aumento do pH do extrato leva, por si só, a uma ligeira diminuição do conteúdo em antocianinas (devido a uma possível degradação das mesmas). Para além disso, observa-se que essa diminuição é muito mais drástica após a incubação a 90°C durante 1 hora, comparativamente com a utilização de extrato sem ajuste de pH. Tal acontece, uma vez que, a pHs alcalinos e a elevadas temperaturas, o equilíbrio desloca-se no sentido da formação de outras formas de equilíbrio, como bases quinoidais aniónicas, pseudobases incolores e chalconas, que são mais instáveis e tendem a degradar-se mais facilmente [23]. Se, por um lado, ocorre degradação dessas formas, por outro lado, o mordente também terá tendência a estabilizá-las e, como tal, quando as amostras são acidificadas, estas estruturas não são revertidas para a forma de catião flavílio. No entanto, é importante considerar que na solução de tingimento a quantidade de mordente é muito reduzida, dado que o mordente é aplicado previamente. Admitindo que a percentagem de antocianinas degradadas durante o tingimento é cerca de 94%, é possível inferir que apenas cerca de 4% das antocianinas presentes no extrato ficaram imobilizadas nos substratos têxteis.

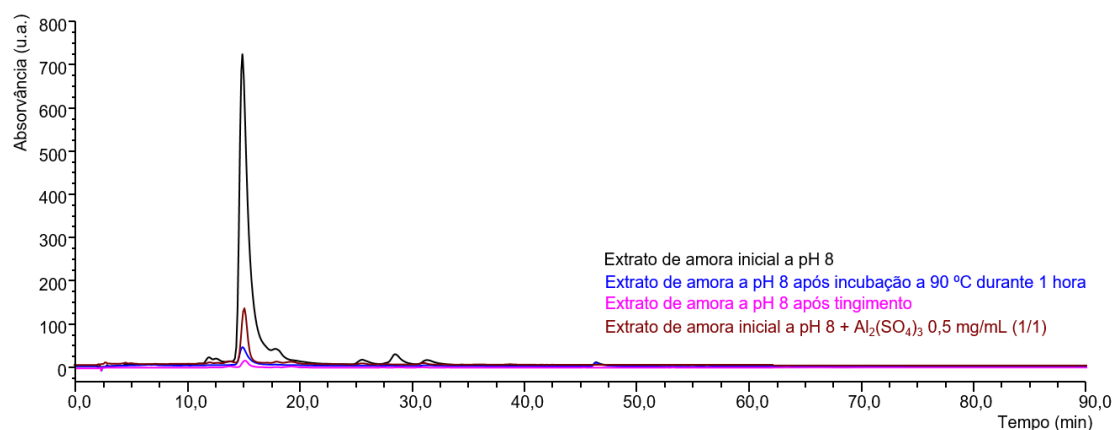


Fig. 4.6 - Cromatogramas representativos da análise por HPLC do extrato de antocianinas de amora a pH 8 antes (preto) e após o tingimento (rosa) da amostra **Alg@am_pH8_sa** bem como do extrato a pH 8 após incubação a 90 °C durante 1 hora (azul) e de uma solução aquosa de extrato a pH 8 misturada com sulfato de alumínio (1/1, V/V; castanho) a $\lambda = 520$ nm.

Na **Fig. 4.7**, estão representados os cromatogramas obtidos relativamente ao tingimento do provete **Alg@am_sap** com o extrato de antocianinas sem ajuste de pH e na presença prévia do mordente sulfato de alumínio e potássio. Tal como com o sulfato de alumínio, o sulfato de alumínio e potássio também estabilizou as antocianinas nas formas quinoidais, levando a uma diminuição da concentração de antocianinas em cerca

de 0,5%. Admitindo que a percentagem de antocianinas degradadas durante o tingimento é semelhante com ou sem uso prévio de mordente (33%), é possível inferir que cerca de 33% das antocianinas presentes no extrato ficaram imobilizadas nos substratos têxteis.

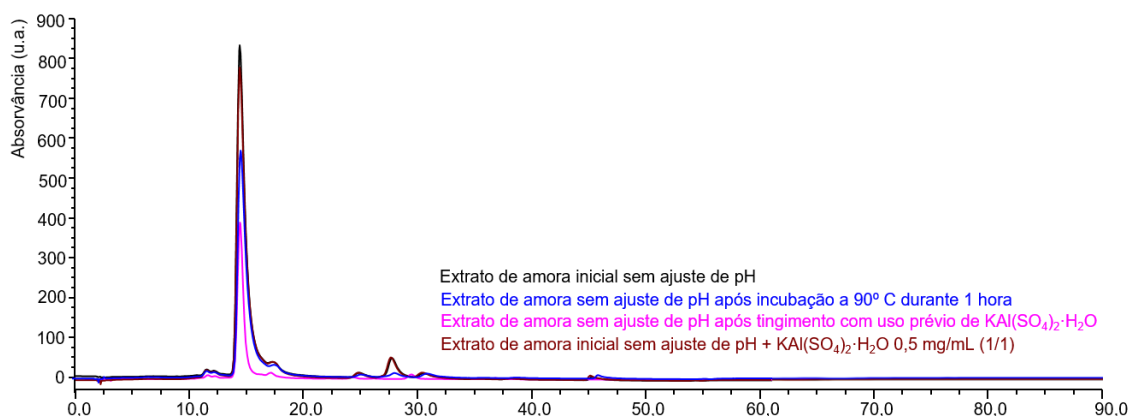


Fig. 4.7 - Cromatogramas representativos da análise por HPLC do extrato de antocianinas de amora sem ajuste de pH antes (preto) e após o tingimento (rosa) da amostra **Alg@am_sap** bem como do extrato após incubação a 90 °C durante 1 hora (azul) e de uma solução aquosa de extrato misturada com sulfato de alumínio e potássio (1/1,V/V; castanho) a $\lambda = 520$ nm.

Durante o processo de tingimento, podem ocorrer diferentes tipos de interação entre o corante e o substrato têxtil, simultaneamente (por exemplo, através de ligações covalentes, interações eletrostáticas, ligações de hidrogénio, forças de VdW e adsorção física) [87,150].

O extrato de antocianinas utilizado possuía um pH próximo de 3, pelo que a espécie predominante em solução era o catião flavílio (que tem carga positiva) [23]. O facto de os substratos têxteis terem sido previamente ativados leva a que estes sofram desprotonação, adquirindo uma carga parcial negativa. Deste modo, são favorecidas interações eletrostáticas entre as antocianinas e os têxteis. Para além de interações eletrostáticas, podem estabelecer-se interações de hidrogénio entre os grupos OH das antocianinas e os grupos OH do algodão ou os grupos NH da poliamida (que não sofreram desprotonação), bem como forças de VdW ou até mesmo ligações covalentes [85,87]. No caso da poliamida, estas interações de hidrogénio deverão ser mais fracas, já que o nitrogénio é menos eletronegativo do que o oxigénio [151]. Durante a lavagem dos substratos têxteis, é utilizada água *Millipore*, o que leva ao aumento do pH da solução para pH 5,5. Este aumento de pH pode favorecer a desprotonação das antocianinas (com formação da base quinoidal que confere uma cor violeta ou azul à solução) ou, como se trata de um meio aquoso, pode também ocorrer a hidratação do

catião flavílio, havendo um equilíbrio entre a pseudobase carbinol e a chalcona [23]. Estes equilíbrios explicam a perda da carga positiva por parte das antocianinas. Por esse motivo, as antocianinas que não estabeleceram interações fortes com os substratos têxteis (por exemplo, ligações covalentes) passam a ter mais afinidade pela solução aquosa do que pelo substrato e, por isso, são perdidas durante a lavagem, o que justifica alguma perda de cor com a lavagem tanto no caso do algodão como da poliamida [87].

O uso de mordentes favorece a fixação da cor [5]. Neste caso, os sais metálicos, como o sulfato de alumínio e o sulfato de alumínio e potássio, foram utilizados como mordentes. Estes sais formam complexos de coordenação com as antocianinas, melhorando, assim, a afinidade do corante para o substrato têxtil. Como as antocianinas contêm muitos grupos OH com pares de elétrons livres nos átomos de oxigênio, estes podem atuar como doadores e preencher as orbitais livres dos íons metálicos (neste caso, o alumínio) [85]. Após a formação do complexo antocianina-metal, estas sofrem uma desprotonação. As antocianinas atuam como ligandos bidentados ao complexar com metais, sendo que os grupos hidroxilo nas posições C3' e C4' são os mais importantes para essa complexação [26,152]. Por esse motivo, os derivados da cianidina (que são as antocianinas majoritariamente presentes no extrato de amora) complexam facilmente com metais. Os metais também podem complexar com os grupos OH do algodão e NH da poliamida. Por isso, como o alumínio(III) tem um número de coordenação igual a 6, o mesmo catião pode interagir simultaneamente com as moléculas de antocianinas e com os substratos têxteis [85].

A pH ácido (<5), a interação das antocianinas com o mordente que irá interagir com o têxtil não é tão favorecida como a pH básico, o que justifica a maior robustez à lavagem dos têxteis tingidos a pH mais elevado. Tal acontece, uma vez que, a pH ácido, as antocianinas estão carregadas positivamente, tal como o alumínio. Apesar de o mordente poder deslocar o equilíbrio no sentido da formação de bases quinoidais (que complexam com o alumínio), a maioria das antocianinas permanece em solução sob a forma de catião flavílio. Assim, muitas das moléculas poderão continuar a interagir diretamente com os substratos têxteis através de interações eletrostáticas, já que este permanece com carga negativa. Durante o processo de lavagem, o pH vai aumentar e, como alguma parte das antocianinas não interagiu com o têxtil através do mordente, mas, diretamente, através de interações eletrostáticas, estas interações vão ser desfavorecidas e a amostra vai ter menor resistência à lavagem.

A pH neutro (5-7), a maioria das espécies que existe em solução são espécies neutras e, por isso, estas vão interagir com o mordente e, desse modo, poderão interagir com os substratos têxteis através do mesmo. No entanto, continuarão a existir espécies em solução que interagem diretamente com o substrato têxtil, através de interações de hidrogénio. Por isso, e devido à existência de diferentes formas estruturais em solução, nos tingimentos com extrato a pH neutro, as amostras ficam muito pouco homogêneas [85,87].

A pH alcalino (>7), a presença de mordente vai estabilizar as antocianinas (o alumínio tem carga positiva e vai complexar com as antocianinas carregadas negativamente) e, como o substrato têxtil também tem carga negativa, a sua imobilização no têxtil vai ser facilitada. Durante a lavagem, a perda de cor do têxtil será menor, uma vez que as alterações de pH não são significativas para levar à diminuição da interação entre as antocianinas, os mordentes e os têxteis [85,87].

4.2.2. Espetroscopia de infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada

O extrato de antocianinas de amora e os provetes de algodão e poliamida antes e após a ativação bem como as amostras tingidas **Alg@am**, **Alg@am_sa**, **Pol@am** e **Pol@am_sa** foram caracterizados por FTIR-ATR, de modo a realizar uma análise da composição dos mesmos. Devido à logística do equipamento e limitação do número de amostras, foram selecionados apenas quatro exemplares de cada substrato têxtil: um não tingido e não ativado (**Alg_na** e **Pol_na**), um não tingido e ativado (**Alg** e **Pol**), outro tingido na ausência de mordente (**Alg@am** e **Pol@am**) e outro tingido com aplicação prévia do mordente sulfato de alumínio (**Alg@am_sa** e **Pol@am_sa**).

Inicialmente, foi obtido um espectro do extrato de antocianinas de amora (**Fig. 4.8**).

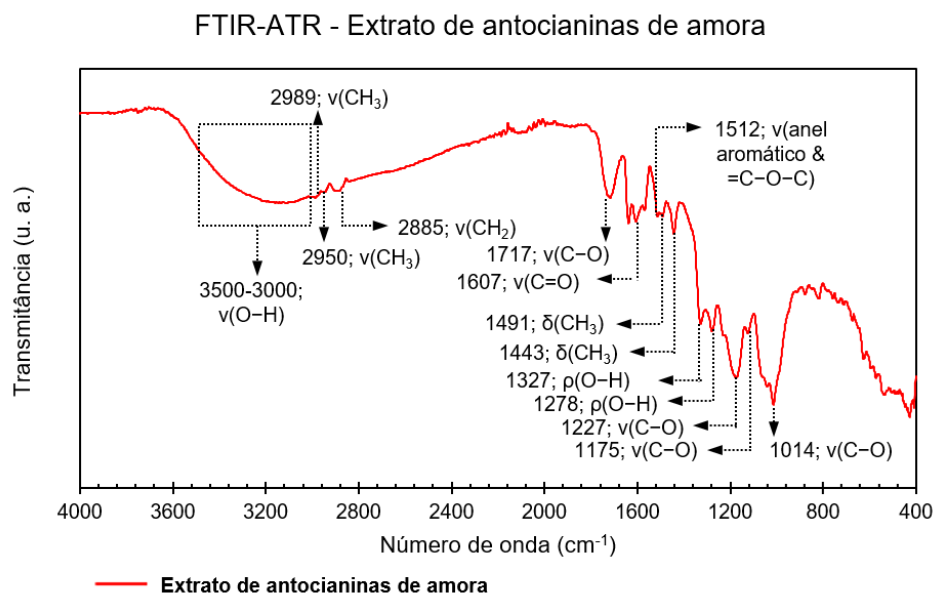


Fig. 4.8 - Espectro de FTIR-ATR do extrato de antocianinas de amora.

O espectro de FTIR-ATR do extrato de antocianinas de amora apresenta várias bandas em posições características. A banda existente a 3500–3000 cm⁻¹ corresponde a vibrações de estiramento das ligações O–H. As bandas a 2989 e 2950 cm⁻¹ estão associadas a vibrações de estiramento dos grupos CH₃ e a banda a 2885 cm⁻¹ refere-se a vibrações de estiramento dos grupos CH₂. As bandas a 1717 e a 1607 cm⁻¹ estão relacionadas com vibrações de estiramento das ligações C–O e C=O, respetivamente. A banda existente a 1512 cm⁻¹ corresponde a vibrações de estiramento do esqueleto dos anéis aromáticos e dos grupos =C–O–C. As bandas existentes a 1491 e 1443 cm⁻¹ estão associadas a vibrações de flexão de CH₃. As bandas a 1327 e 1278 cm⁻¹ referem-se a vibrações correspondentes a deformações no plano de ligações O–H. As bandas a 1227, 1175 e 1014 cm⁻¹ dizem respeito a vibrações de estiramento das ligações C–O de grupos álcool [116,153,154]. Estes resultados estão de acordo com a estrutura química das antocianinas que compõem o extrato (**Tabela 4.1**).

Para além disso, foram caracterizados os provetes de algodão ativados e não ativados, de modo a compreender se o processo de ativação afetava a sua estrutura química. Na **Fig. 4.9**, estão representados os espectros obtidos para as amostras **Alg_na** e **Alg** e na **Fig. 4.10** está representada a estrutura química do algodão.

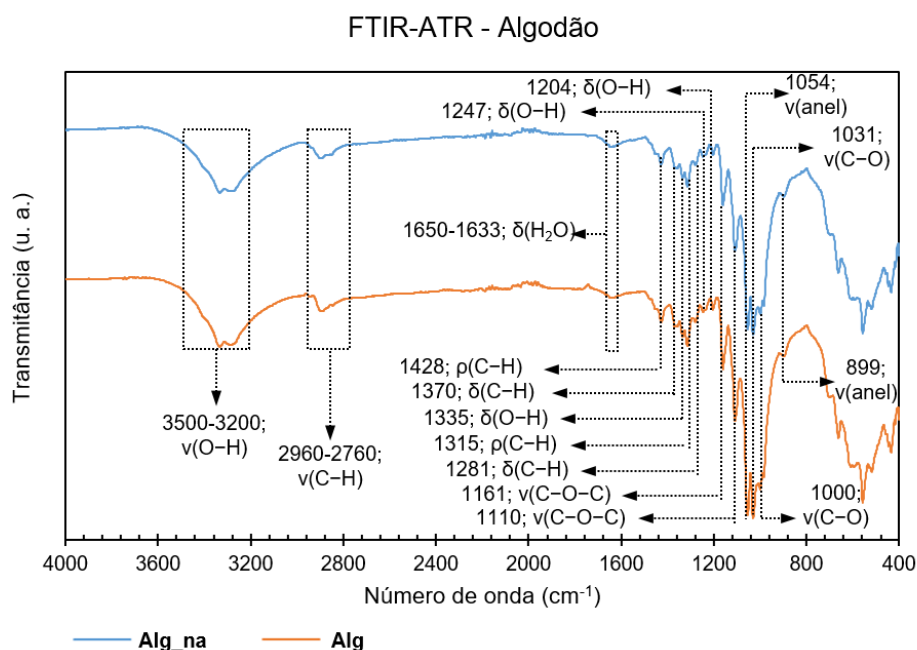


Fig. 4.9 - Espectros de FTIR-ATR dos provetes **Alg_na** e **Alg**.

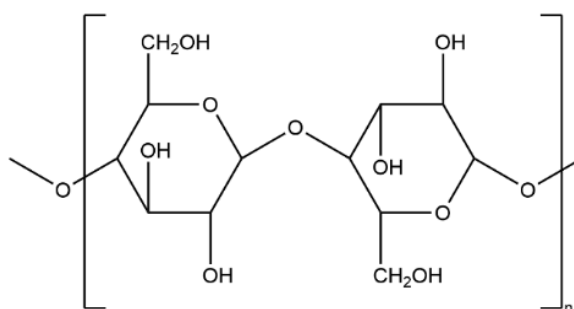


Fig. 4.10 - Estrutura química do algodão. Adaptado de [155].

Os espectros de FTIR-ATR das amostras **Alg_na** e **Alg** apresentam as bandas características da estrutura do algodão. As bandas no intervalo de $3550\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ correspondem a vibrações de estiramento de ligações O-H do substrato e/ou de água adsorvida. As bandas existentes a $2960\text{--}2760\text{ cm}^{-1}$ estão associadas a vibrações de estiramento das ligações C-H e a banda no intervalo $1650\text{--}1633\text{ cm}^{-1}$ referem-se a deformações O-H de água adsorvida. As duas bandas a 1428 e 1315 cm^{-1} estão relacionadas com vibrações de deformação (balanço) das ligações C-H e a banda a 1370 cm^{-1} corresponde a vibrações de flexão das ligações C-H. As bandas existentes a 1335 , 1247 e 1204 cm^{-1} estão associadas a vibrações de flexão das ligações O-H no plano. A banda a 1281 cm^{-1} refere-se a deformações das ligações C-H. As bandas a 1161 e 1110 cm^{-1} correspondem a vibrações das pontes assimétricas C-O-C e a banda a 1054 cm^{-1} está relacionada com vibrações de estiramento assimétrico dos anéis de

glucose no plano. As bandas existentes a 1031 e 1000 cm^{-1} dizem respeito a vibrações de estiramento das ligações C–O e a banda a 899 cm^{-1} corresponde a vibrações de estiramento assimétrico dos anéis fora de fase [116,155,156].

Ao comparar os espectros do algodão ativado e não ativado, não se verificam diferenças significativas nas posições e nas intensidades relativas das bandas, pelo que a estrutura química do algodão não é alterada durante o processo de ativação.

Para além da malha de algodão ativada e não ativada, foram avaliados os provetes tingidos na ausência de mordente (**Alg@am**) e com aplicação prévia do mordente sulfato de alumínio (**Alg@am_sa**). Na **Fig. 4.11**, estão representados os respetivos espectros de FTIR-ATR bem como os espectros do provete **Alg** e do extrato de antocianinas de amora.

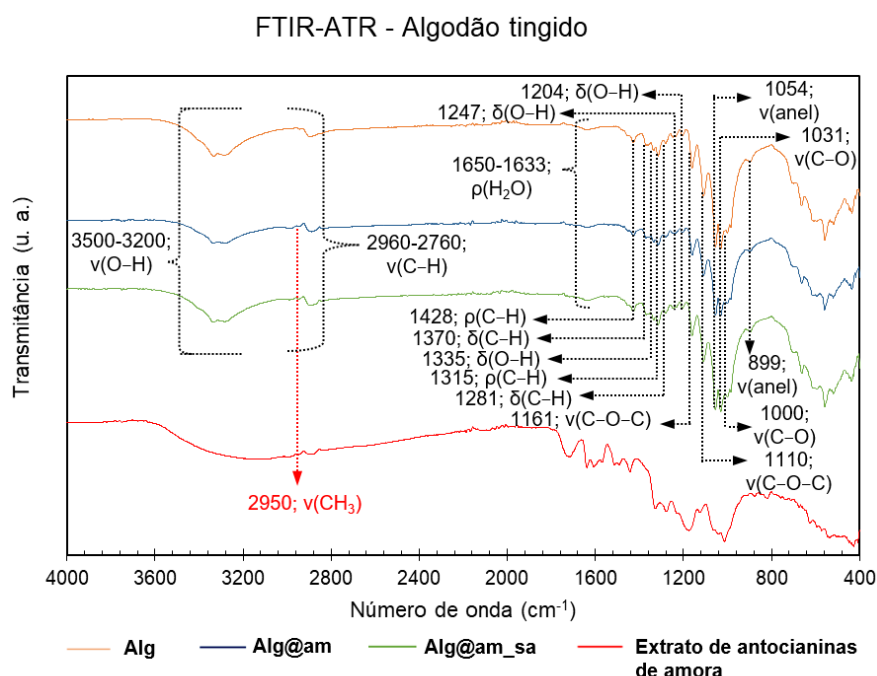


Fig. 4.11 - Espectros de FTIR-ATR das amostras **Alg**, **Alg@am**, **Alg@am_sa** e do extrato de antocianinas de amora. A preto, encontram-se assinaladas as bandas características dos substratos têxteis e, a vermelho, a do extrato de antocianinas.

Os espectros de FTIR-ATR dos provetes tingidos **Alg@am** e **Alg@am_sa** apresentam as bandas características do espectro de algodão não tingido. No entanto, nos espectros dos têxteis tingidos surge uma banda a $\sim 2950 \text{ cm}^{-1}$ (vibração de estiramento de grupo CH_3), que é típica do extrato de antocianinas de amora e que não está presente no espectro do algodão, sugerindo a incorporação das antocianinas na malha de algodão. As restantes bandas das antocianinas surgem sobrepostas às

bandas de maior intensidade do algodão, pelo que não é possível associá-las à incorporação do extrato no algodão.

Os espectros de FTIR-ATR dos provetes **Alg@am** e **Alg@am_sa** não apresentam diferenças entre si, no que diz respeito à posição das bandas, pelo que, de acordo com os dados de FTIR-ATR, a adição de mordente não parece influenciar o modo de incorporação das antocianinas no algodão.

O mesmo estudo também foi realizado para a malha de poliamida. Na **Fig. 4.12** estão representados os espectros obtidos para os provetes **Pol_na** e **Pol** e na **Fig. 4.13** está representada a estrutura química da poliamida.

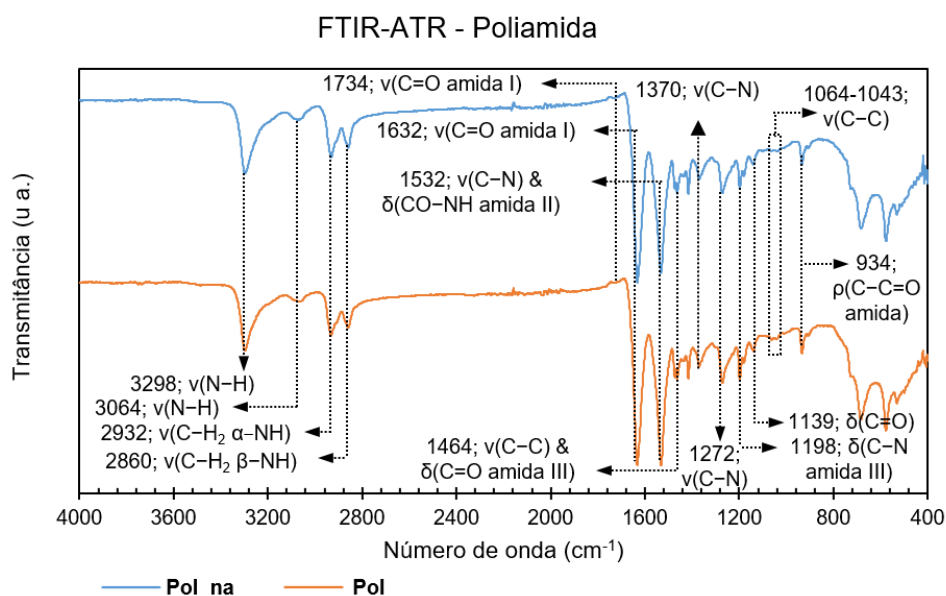


Fig. 4.12 - Espectros de FTIR-ATR dos provetes **Pol_na** e **Pol**.

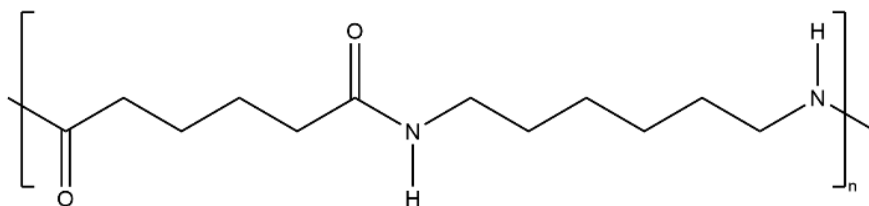


Fig. 4.13 - Estrutura química da poliamida. Adaptado de [157].

Os dois espectros de FTIR-ATR dos provetes **Pol_na** e **Pol** apresentam as bandas características da estrutura da poliamida. As bandas existentes a 3298 e a 3064 cm⁻¹ correspondem a vibrações de estiramento das ligações N-H. As bandas a 2932 e 2860 cm⁻¹ estão associadas a vibrações de estiramento das ligações C-H₂ α-NH e C-H₂ β-NH, respetivamente. As bandas existentes a 1734 e 1632 cm⁻¹ referem-se a vibrações de estiramento das ligações C=O (amida I). A banda a 1532 cm⁻¹ está relacionada com

vibrações de estiramento das ligações C–N e com vibrações de flexão das ligações CO–NH (amida II). A banda existente a 1464 cm^{-1} corresponde a vibrações de estiramento das ligações C–C e de flexão das ligações C=O (amida III). As bandas a 1370 e 1272 cm^{-1} dizem respeito a vibrações de estiramento da ligação C–N. A banda a 1198 cm^{-1} está relacionada com vibrações de flexão assimétrica fora do plano (amida III). A banda existente a 1139 cm^{-1} está associada a vibrações de flexão das ligações C=O fora do plano. A banda no intervalo $1064\text{--}1043\text{ cm}^{-1}$ refere-se a vibrações de estiramento das ligações C–C e a banda a 934 cm^{-1} corresponde a vibrações de deformação axial das ligações C–C=O (amida) [116,158,159].

Os espectros correspondentes à poliamida ativada e não ativada são muito semelhantes, não sendo observáveis diferenças significativas nas posições das bandas, pelo que a estrutura química da poliamida não é alterada durante o processo de ativação.

As amostras tingidas na ausência de mordente (**Pol@am**) e com aplicação prévia do mordente sulfato de alumínio (**Pol@am_sa**) também foram analisadas por esta técnica, usando as condições descritas anteriormente. Na **Fig. 4.14**, estão representados os seus espectros de FTIR-ATR bem como os espectros da amostra **Pol** e do extrato de antocianinas de amora.

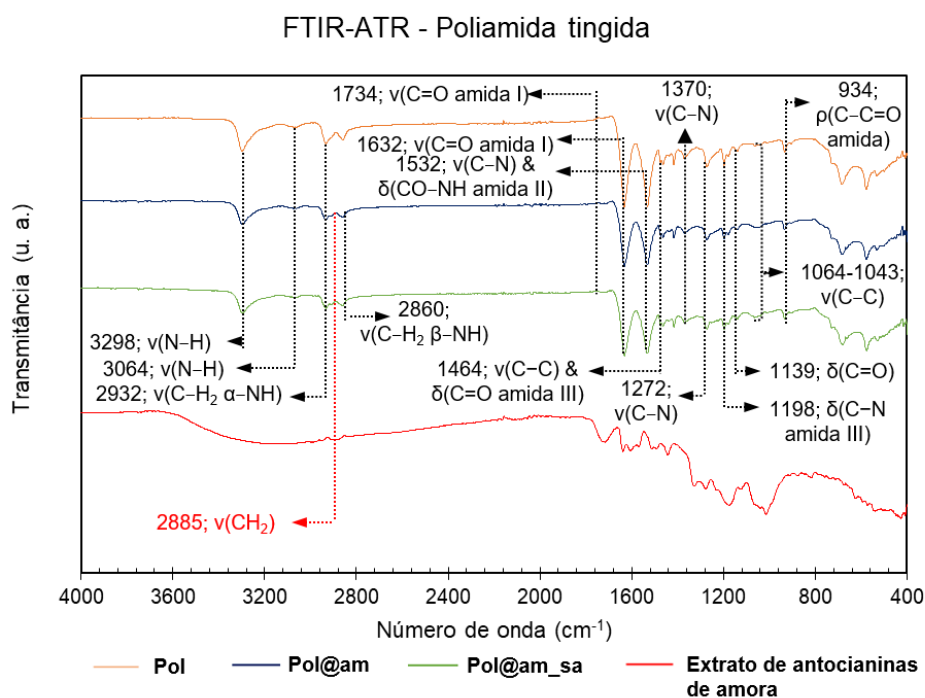


Fig. 4.14 - Espectros de FTIR-ATR das amostras **Pol**, **Pol@am**, **Pol@am_sa** e do extrato de antocianinas de amora. A preto, encontram-se assinaladas as bandas características dos substratos têxteis e, a vermelho, a do extrato de antocianinas.

Os espectros de FTIR-ATR dos provetes tingidos **Pol@am** e **Pol@am_sa** apresentam as mesmas bandas que o da amostra **Pol**. Nos espectros das amostras tingidas surge uma banda a $\sim 2885\text{ cm}^{-1}$ (vibração de estiramento de grupo CH_2), que é típica do extrato de antocianinas de amora. Embora tenha uma intensidade reduzida, esta confirma do ponto de vista químico a incorporação das antocianinas na malha de poliamida.

Os espectros de FTIR-ATR dos têxteis tingidos **Pol@am** e **Pol@am_sa** não apresentam diferenças significativas entre si. Deste modo, de acordo com os dados de FTIR-ATR, o uso de mordente não parece interferir com o modo de incorporação das antocianinas na malha de poliamida.

Assim, através da técnica de FTIR-ATR foi possível observar o aparecimento de bandas características das antocianinas nos espectros dos têxteis tingidos, pelo que se pode concluir que estas foram incorporadas em ambos os substratos têxteis. Para confirmar os resultados obtidos por esta técnica, foi utilizada a técnica de XPS.

4.2.3. Espetroscopia fotoeletrónica de raios-X

De modo a avaliar a composição química da superfície dos substratos têxteis do ponto de vista qualitativo e quantitativo, procedeu-se a uma caracterização por XPS. Devido à logística do equipamento e limitação do número de amostras a analisar, foram selecionados apenas dois exemplares de cada substrato têxtil, um não tingido e ativado (**Alg** e **Pol**) e outro tingido (**Alg@am_sa** e **Pol@am_sa**). Na **Tabela 4.24**, são apresentados os valores das percentagens atómicas superficiais dos elementos químicos existentes na superfície dos substratos têxteis obtidos através da análise de XPS.

Tabela 4.24 - Percentagens atómicas superficiais dos elementos químicos existentes na superfície das amostras **Alg**, **Alg@am_sa**, **Pol** e **Pol@am_sa**

Amostra	% Atómica					
	C 1s	N 1s	O 1s	Si 2p	Al 2p	S 2p
Alg	74,1	1,6	22,9	1,4	-	-
Alg@am_sa	69,4	0,8	26,4	2,7	0,5	0,2
Pol	75,2	6,8	13,8	4,2	-	-
Pol@am_sa	70,4	1,1	26,0	1,3	1,1	0,1

Através dos resultados apresentados na **Tabela 4.24**, é possível verificar a presença de carbono, azoto, oxigénio e silício na superfície de todas as amostras. O

carbono e o oxigénio fazem parte da estrutura química de ambos os substratos têxteis e são os elementos mais abundantes. Embora o azoto só faça parte da estrutura química da poliamida, este elemento é detetado em quantidades residuais no algodão e a sua proveniência poderá ser resultante de algumas impurezas. Apesar do silício estar presente em todas as amostras, este não faz parte da estrutura química dos substratos têxteis nem das antocianinas. Assim, a sua presença poderá resultar de uma contaminação. O processo de ativação dos têxteis foi realizado em balões de vidro e, como este passo de ativação implica o uso de um meio alcalino (solução aquosa de NaOH), o vidro poderá sofrer alguma degradação e consequentemente poderá haver libertação de silicatos. Comparando a composição dos substratos têxteis tingidos relativamente aos não tingidos, verifica-se que o carbono e o oxigénio continuam a ser os elementos mais abundantes. No entanto, em termos percentuais, verifica-se que a razão carbono/oxigénio diminui após a incorporação das antocianinas (no caso do algodão, diminui de 3,2 para 2,6 e, no que diz respeito à poliamida, diminui de 5,5 para 2,7). Nas amostras tingidas, observa-se também a presença de enxofre e alumínio que são provenientes do mordente sulfato de alumínio. É de notar que a estequiometria Al:S não está de acordo com a que seria de esperar se fosse só mordente (estequiometria 2:3), o que poderá estar relacionado com a presença de alumínio no extrato de antocianinas de amora (tema que irá ser explorado na secção 4.3).

Nas **Figs. 4.15 e 4.16** são apresentados os espectros de XPS deconvoluídos obtidos nas regiões de maior interesse. Serão apenas apresentados os que são mais relevantes de cada uma das amostras: no caso do algodão, os espectros do C 1s e do O 1s e, no caso da poliamida, os espectros do C 1s, do N 1s e do O 1s.

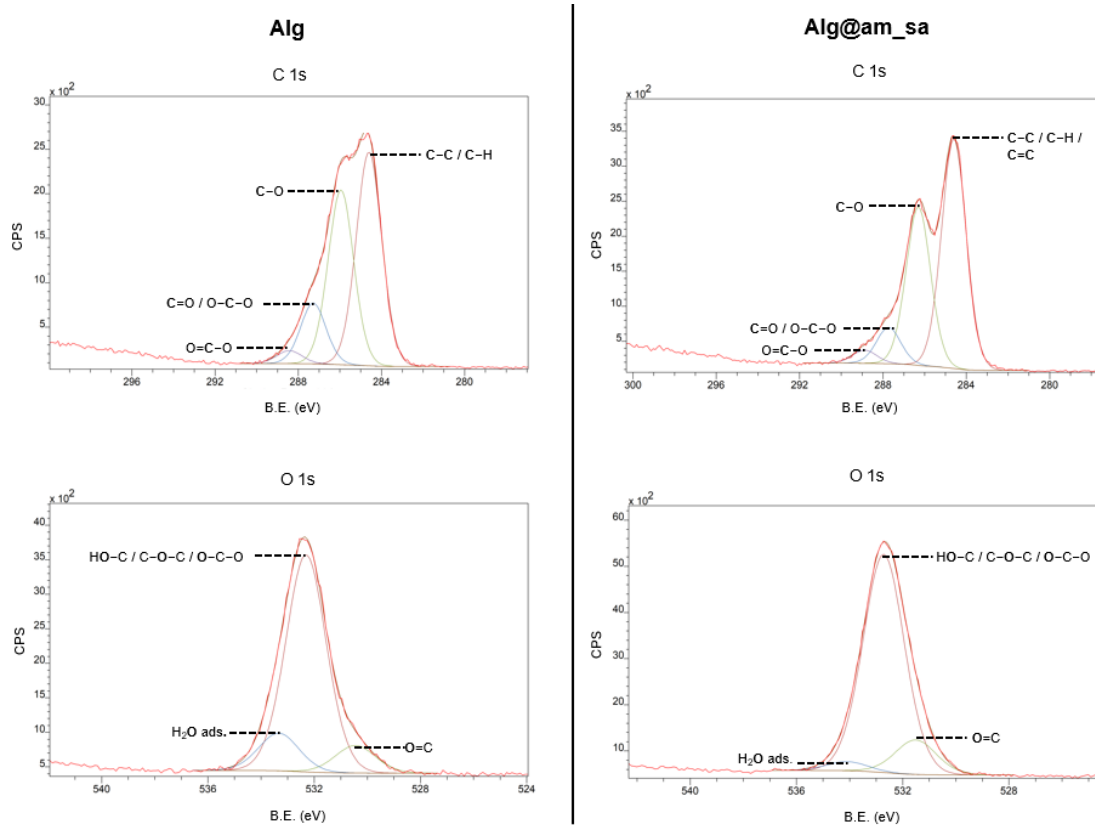


Fig. 4.15 - Espectros de XPS dos elementos C 1s e O 1s presentes nas amostras **Alg** e **Alg@am_sa** e respetivas deconvoluções (Nota: CPS - contagens por segundo).

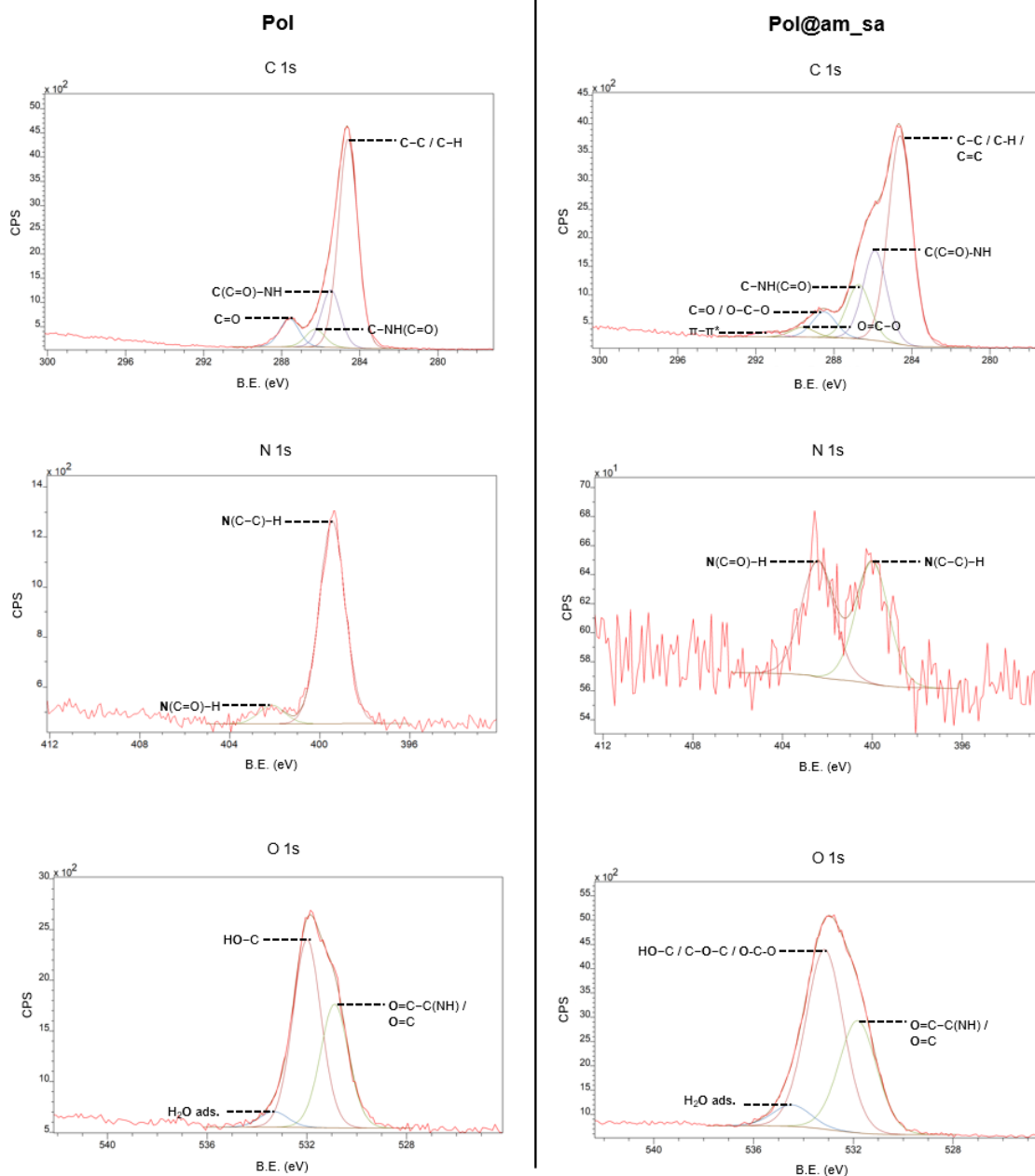


Fig. 4.16 - Espectros de XPS dos elementos C 1s, N 1s e O 1s presentes nas amostras **Pol** e **Pol@am_sa** e respectivas deconvoluções.

A partir da deconvolução dos espectros de XPS associados a cada elemento, foi possível construir a **Tabela 4.25**, onde se encontram os valores das energias de ligação (BE) e das áreas relativas de cada banda deconvoluída para todas as amostras analisadas.

Tabela 4.25 - Valores de BE e áreas associadas a cada banda resultante da deconvolução dos espectros de XPS associados a cada elemento para as amostras de **Alg**, **Alg@am_sa**, **Pol** e **Pol@am_sa**

	C 1s		N 1s		O 1s		Si 2p		Al 2p		S 2p	
	BE (eV) ^a	Área (%) ^b	BE (eV) ^a	Área (%) ^b	BE (eV) ^a	Área (%) ^b	BE (eV) ^a	Área (%) ^b	BE (eV) ^a	Área (%) ^b	BE (eV) ^a	Área (%) ^b
Alg	284,6 (1,4)	46,2	399,6 (1,7)	37,9	530,5 (1,8)	9,8	101,9 (1,7)	66,7	-	-	-	-
	286,0 (1,4)	37,8	402,4 (1,7)	62,1	532,3 (1,8)	76,9	102,5 (1,7)	33,3	-	-	-	-
	287,3 (1,4)	13,2	-	-	533,3 (1,8)	13,3	-	-	-	-	-	-
	288,4 (1,4)	2,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alg@am_sa	284,6 (1,4)	52,5	399,9 (1,5)	54,4	531,5 (1,8)	13,2	102,3 (1,6)	66,5	74,4 (1,5)	66,7	168,2 (2,7)	66,7
	286,3 (1,4)	36,2	402,4 (1,5)	45,6	532,7 (1,8)	83,4	102,9 (1,6)	33,5	74,8 (1,5)	33,3	169,4 (2,7)	33,3
	287,7 (1,4)	8,3	-	-	534,1 (1,8)	3,4	-	-	-	-	-	-
	288,9 (1,4)	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pol	284,6 (1,2)	66,9	399,5 (1,3)	91,6	530,9 (1,3)	37,8	101,9 (1,2)	66,7	-	-	-	-
	285,5 (1,2)	18,4	402,2 (1,3)	8,4	532,0 (1,3)	57,4	102,5 (1,2)	33,3	-	-	-	-
	286,3 (1,2)	5,7	-	-	533,3 (1,3)	4,8	-	-	-	-	-	-
	287,6 (1,2)	9,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pol@am_sa	284,6 (1,4)	53,0	400,0 (1,7)	51,4	531,8 (1,8)	35,8	101,7 (1,4)	66,7	74,7 (1,7)	66,7	168,6 (2,1)	66,7
	285,9 (1,4)	22,9	402,4 (1,7)	48,6	533,2 (1,8)	57,3	102,3 (1,4)	33,3	75,1 (1,7)	33,3	169,8 (2,1)	33,3
	286,7 (1,4)	13,8	-	-	534,5 (1,8)	6,9	-	-	-	-	-	-
	288,5 (1,4)	6,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	289,6 (1,4)	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	291,4 (1,4)	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a Os valores dentro de parênteses correspondem aos valores de largura a meia altura das bandas.^b Área de cada componente em relação à área total da banda.

Analisando a **Fig. 4.15** e a **Tabela 4.25**, observa-se que relativamente ao espectro do elemento C 1s da amostra **Alg**, são detetadas quatro bandas que são atribuídas às ligações **C-C** e **C-H** (284,6 eV), **C-O** (286,0 eV), **C=O/O-C-O** (287,3 eV) e **O=C-O** (288,4 eV) [156,160,161]. Tal como seria de esperar a partir da estrutura química do algodão (**Fig. 4.10**), as bandas correspondentes às ligações **C-C/C-H** e **C-O** são as que possuem maiores áreas relativas. Na região O 1s são detetadas três bandas atribuídas às ligações **O=C** (530,5 eV), **HO-C/C-O-C/O-C-O** (532,3 eV) e a **H₂O** adsorvida (533,3 eV), sendo que a banda dominante é a correspondente às ligações **HO-C/C-O-C/O-C-O** [160,162,163]. Relativamente à amostra **Alg@am_sa** (**Fig. 4.15** e **Tabela 4.25**), verifica-se que no espectro do elemento C 1s são detetadas quatro bandas que são atribuídas às ligações **C-C/C-H/C=C** (284,6 eV), **C-O** (286,3 eV), **C=O/O-C-O** (287,7 eV) e **O=C-O** (288,9 eV) [156,160,161]. Ao comparar este espectro com o do provete **Alg**, verifica-se que as áreas relativas das bandas correspondentes às ligações **C-C/C-H/C=C** e **O=C-O** aumentam e as áreas relativas das bandas associadas às ligações **C-O/C=O** e **O-C-O** diminuem. No caso do elemento O 1s, são detetadas três bandas atribuídas às ligações **O=C** (531,5 eV), **HO-C/C-O-C/O-C-O** (532,7 eV) e a **H₂O** adsorvida (534,1 eV) [160,162,163]. Comparando este espectro com o da amostra **Alg**, observa-se que as áreas relativas das bandas correspondentes às ligações **O=C** e **HO-C/C-O-C/O-C-O** aumentam e a área relativa das bandas associada à **H₂O** adsorvida diminui. Dado que se trata de uma análise da superfície das amostras, a diminuição da banda associada à **H₂O** adsorvida no espectro do elemento O 1s poderá justificar que a água presente no algodão não tingido poderá ter sido substituída pelas antocianinas que ficaram imobilizadas. O aumento das áreas das bandas correspondentes às ligações **C-C/C-H/C=C** e **O=C-O** no espectro C 1s, aliado ao facto da ligação **C=C** ser exclusiva da estrutura das antocianinas e da ligação **O=C-O** ser uma ligação característica da estrutura de algumas antocianinas permite confirmar a imobilização das antocianinas na superfície do algodão. Por outro lado, o aumento das bandas relativas às ligações **O=C** e **HO-C/C-O-C/O-C-O** que são ligações também presentes na estrutura química das antocianinas no espectro O 1s reforça esta conclusão. Através da análise dos espectros de C 1s e O 1s, é ainda possível verificar que os valores de BE associados a todas as bandas sofrem um desvio para valores mais elevados na amostra tingida (**Alg@am_sa**) relativamente à não tingida (**Alg**), o que sugere que a vizinhança desses elementos se altera e poderá ser resultado da ligação das antocianinas ao algodão.

No caso da amostra **Pol**, a partir da **Fig. 4.16** e da **Tabela 4.25** verifica-se que, relativamente ao espectro do elemento C 1s, são detetadas quatro bandas que são atribuídas às ligações **C-C/C-H** (284,6 eV), **C(C=O)-NH** (285,5 eV), **C-NH(C=O)** (286,3 eV) e **C=O** (287,6 eV) [160,164]. A banda correspondente às ligações **C-C/C-H** é a que possui maior área relativa, o que está de acordo com o esperado, dado que as ligações **C-C** são maioritárias na estrutura da poliamida. No espectro do elemento N 1s são detetadas duas bandas atribuídas às ligações **N(C-C)-H** (399,5 eV) e **N(C=O)-H** (402,2 eV) [160,165], sendo a primeira dominante em relação à segunda. No espectro O 1s, são detetadas três bandas atribuídas às ligações **O=C-C(NH)/O=C** (530,5 eV), **HO-C** (532,0 eV) e a **H₂O** adsorvida (533,3 eV) [160,163,164], verificando-se que a banda relativa à ligação **HO-C** é a que tem maior área relativa. No que diz respeito ao provete **Pol@am_sa**, verifica-se que no espectro C 1s são detetadas seis bandas que são atribuídas às ligações **C-C/C-H/C=C** (284,6 eV), **C(C=O)-NH** (285,9 eV), **C-NH(C=O)** (286,7 eV), **C=O/O-C-O** (288,5 eV), **O=C-O** (289,6 eV) e interações $\pi-\pi^*$ (291,4 eV) [160,164,166], sendo que a banda relativa às ligações **C-C/C-H/C=C** é a dominante. Comparando este espectro com o da amostra **Pol**, verifica-se que as áreas relativas das bandas correspondentes às ligações **C(C=O)-NH** e **C=O/O-C-O** aumentam e as áreas relativas das bandas associadas às ligações **C-C/C-H/C=C** e **C-NH(C=O)** diminuem. É de notar o aparecimento de duas novas bandas correspondentes à ligação **O=C-O** e às interações $\pi-\pi^*$. No espectro do elemento N 1s são detetadas duas bandas atribuídas às ligações **N(C-C)-H** (400,0 eV) e **N(C=O)-H** (402,4 eV) [160,165]. Este espectro foi o que sofreu mais alterações comparativamente com o amostra **Pol**. Para além de se ter verificado uma diminuição acentuada do teor superficial de N, já que há uma diminuição drástica da intensidade de ambas as bandas, verifica-se que a banda **N(C-C)-H** sofre uma maior diminuição. No espectro do elemento O 1s são detetadas três bandas atribuídas às ligações **O=C-C(NH)/O=C** (531,8 eV), **HO-C/C-O-C/O-C-O** (533,2 eV) e a **H₂O** adsorvida (534,5 eV) [160,163,164]. Neste caso, a área da banda correspondente às ligações **O=C-C(NH)** e **O=C** diminui, a área da banda relativa às ligações **HO-C/C-O-C/O-C-O** mantém-se e a área da banda associada à **H₂O** adsorvida aumenta, comparando com a do espectro de **Pol**. A diminuição drástica da área das bandas associadas ao espectro de N 1s revela que a percentagem relativa deste elemento presente na superfície da poliamida diminui, o que poderá sugerir a imobilização das antocianinas à superfície da poliamida e que estas se poderão ligar preferencialmente ao azoto. Também o aumento das áreas relativas das

bandas correspondentes às ligações $\text{C}=\text{O}$ e $\text{O}-\text{C}-\text{O}$ (esta última exclusiva da estrutura química das antocianinas), o aparecimento das bandas correspondentes às ligações $\text{O}=\text{C}-\text{O}$ (presente na estrutura das antocianinas) e às interações $\pi-\pi^*$ (estabelecidas entre os anéis aromáticos das antocianinas) no espectro C 1s e a diminuição da área da banda correspondente às ligações $\text{O}=\text{C}-\text{C}(\text{NH})$ (típica da poliamida) no espectro O 1s sugerem a imobilização das antocianinas na superfície da poliamida. Analisando os espectros de alta resolução C 1s, N 1s e O 1s, verifica-se que os valores de BE de todas as bandas sofrem um desvio para valores crescentes na amostra **Pol@am_sa** relativamente ao provete **Pol**, pelo que a vizinhança desses elementos se altera na amostra tingida comparativamente à não tingida. Esta variação sugere que as antocianinas terão estabelecido ligações químicas com a poliamida, nomeadamente através da coordenação ao azoto.

Assim, as técnicas de colorimetria, FTIR-ATR e XPS permitem concluir que as antocianinas ficaram imobilizadas nos substratos têxteis.

4.3. Ensaios de libertação

4.3.1. Ensaios de libertação com suor artificial

Para determinar a quantidade de antocianinas libertadas dos têxteis **Alg**, **Alg@am**, **Alg@am_sa**, **Alg@am_pH8_sa**, **Alg@am_sap** e **Alg_na@am(2x)_sa**, foram realizados ensaios de libertação com suor artificial durante 24 horas. Este ensaio foi apenas preliminar de modo a verificar se as antocianinas eram libertadas dos substratos e, ao fim de quanto tempo, era atingida a concentração máxima em solução.

A **Fig. 4.17** representa a concentração de antocianinas libertadas ao longo do tempo. Como é possível observar no gráfico, os diferentes provetes de algodão tingidos em condições distintas libertam quantidades de antocianinas diferentes. Tal como seria de esperar, na amostra **Alg**, que não foi tingida, não houve libertação de antocianinas.

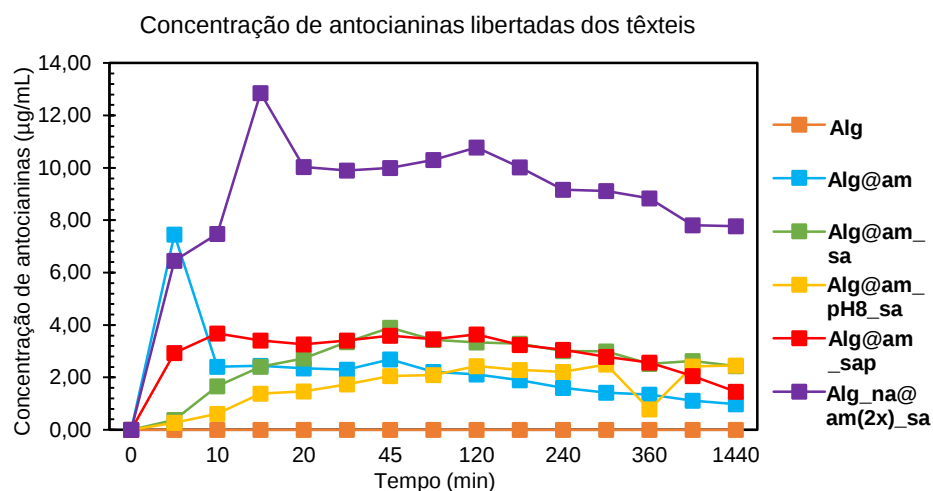


Fig. 4.17 - Concentração de antocianinas libertadas dos substratos têxteis de algodão durante a incubação com suor artificial (Gráfico preliminar).

Quanto ao provete **Alg@am**, verifica-se que foi libertada uma quantidade de antocianinas superior, nos primeiros 5 minutos, e, nos minutos seguintes, houve uma diminuição da quantidade de antocianinas no suor, o que poderá ser explicado por uma degradação das antocianinas com a temperatura ao longo do tempo.

Relativamente à amostra tingida na presença de mordente, **Alg@am_sa**, verifica-se que não há uma libertação inicial tão grande, sendo a concentração máxima de antocianinas no suor atingida ao fim de 45 minutos. Após esse período, verifica-se uma ligeira diminuição, mas não muito acentuada, pelo que, na presença de mordente, não há uma degradação tão forte das antocianinas.

O provete tingido na presença de mordente a pH 8 (**Alg@am_pH8_sa**) é aquele onde há uma libertação mais lenta de antocianinas, sendo a concentração máxima atingida ao fim de 5 horas (300 minutos). Até 1 hora de incubação com o suor, esta amostra foi aquela que levou à libertação de uma menor concentração de antocianinas. A partir desse momento, a concentração de antocianinas em solução continua a aumentar e depois estabiliza (a diminuição brusca aos 360 minutos poderá ser resultado de um erro de medição experimental). Mais uma vez o uso do sulfato de alumínio leva a uma estabilização das antocianinas em solução, principalmente, nesta situação, em que é utilizado pH 8 e que propicia a degradação.

No que diz respeito à amostra **Alg@am_sap**, verifica-se que a concentração máxima é atingida ao fim de 10 minutos. A partir desse momento, a concentração de antocianinas tende a estabilizar, começando a diminuir após 120 minutos de incubação com o suor.

Por último, quanto à amostra **Alg_na@am(2x)_sa**, esta é a que leva a uma maior libertação de antocianinas para o suor. O facto de o têxtil não estar ativado e de ter sido usado o dobro da concentração de extrato de antocianinas durante o tingimento leva a que haja uma maior libertação de antocianinas para o suor. A concentração máxima é atingida ao fim de 15 minutos. Depois, há uma diminuição da concentração e, até aos 120 minutos, observa-se um ligeiro aumento. A partir desse período temporal, verifica-se uma diminuição da concentração das antocianinas ao longo do tempo.

Foram ainda realizados ensaios usando os mesmos provetes e um tempo de incubação máximo de 2 horas, uma vez que a partir desse intervalo de tempo se verifica uma diminuição da concentração de antocianinas em quase todas as situações. No gráfico da **Fig. 4.18**, estão representadas as concentrações de antocianinas libertadas dos têxteis nessa situação.

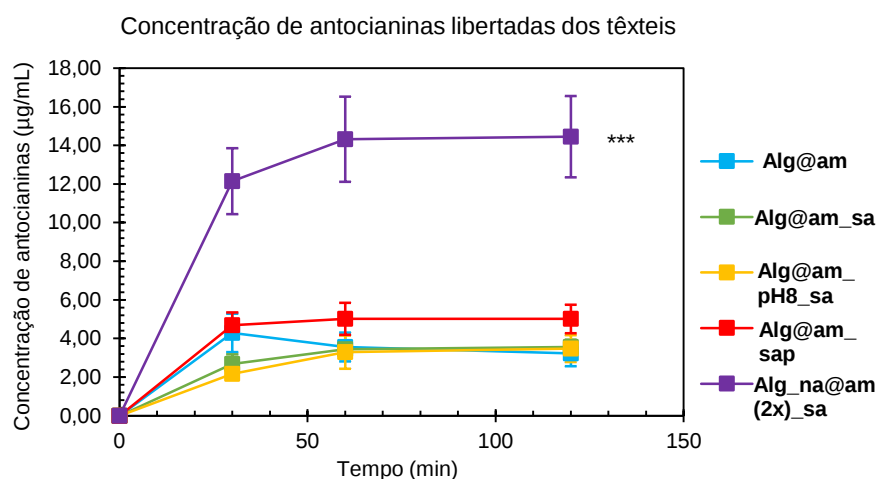


Fig. 4.18 - Concentração de antocianinas libertadas dos têxteis de algodão durante 2 horas de incubação com suor artificial. Os valores representam a média $\pm$ SEM ($n=3$), *** $p < 0,001$ (valores estatisticamente diferentes entre si).

Após a análise estatística dos resultados obtidos, verifica-se que, durante as primeiras 2 horas, a concentração de antocianinas libertadas era idêntica em todos os provetes, à exceção da amostra **Alg_na@am(2x)_sa** cuja libertação mostrou ser distinta das restantes. Este provete foi aquele onde foi usado o dobro da concentração de antocianinas na presença de mordente e na qual o têxtil não tinha sido ativado. Dado que, neste caso, houve uma maior libertação de antocianinas, esta amostra irá servir como ponto de partida para os ensaios biológicos.

Através deste conjunto de resultados podemos também concluir que o uso de mordente não influencia a quantidade de antocianinas libertadas (embora fosse de esperar que a presença de mordente estabilizasse as antocianinas no têxtil, poderão

existir componentes no suor com maior afinidade para as antocianinas do que o mordente, daí a libertação ser semelhante). Para além disso, os têxteis tingidos na presença de mordente são mais homogêneos em cor. Assim, o uso de mordente pode constituir uma boa alternativa para o tingimento dos têxteis. Também o pH não parece influenciar a concentração de antocianinas libertadas, embora um pH mais elevado possa reduzir a estabilidade das antocianinas em solução.

4.3.2. Determinação da quantidade de alumínio libertada

Como o uso de mordente parece ser importante para o tingimento dos têxteis, é essencial determinar a concentração de alumínio libertada dos têxteis, já que alguns especialistas consideram o alumínio um metal tóxico para o organismo [167]. Na **Tabela 4.26**, está representada a concentração de alumínio libertada por cada um dos têxteis que foram utilizados neste ensaio.

Tabela 4.26 - Concentração de alumínio libertada dos têxteis de algodão

	Concentração de alumínio libertada ($\mu\text{g/L}$)
Alg@am	8,52 $\pm$ 5,26
Alg@am_sa	51,73 $\pm$ 0,69
Alg@am_pH8_sa	65,75 $\pm$ 0,46
Alg@am_sap	45,31 $\pm$ 0,80
Alg_na@am(2x)_sa	34,72 $\pm$ 2,46

Observando a **Tabela 4.26**, verifica-se que a quantidade de alumínio libertada dos substratos têxteis é bastante reduzida, na ordem dos $\mu\text{g/L}$. Contrariamente ao que seria de esperar, na amostra **Alg@am**, onde não foi utilizado mordente, verificou-se alguma libertação de alumínio do provete, embora bastante inferior à dos restantes provetes. O alumínio é um metal que está presente no solo e nos alimentos [168,169]. No caso dos frutos vermelhos, a presença do alumínio já foi identificada, nomeadamente nos mirtilos, onde foram determinadas concentrações na ordem dos 1248 mg/kg de peso seco [170]. Portanto, se usarmos uma fonte natural de antocianinas, como as amoras, o alumínio pode estar presente na sua composição. Após o processo de extração, esse metal pode persistir no extrato de antocianinas e afetar os valores obtidos.

Nas restantes amostras, verifica-se que a concentração de alumínio libertada é superior na amostra **Alg@am_pH8_sa**, seguindo-se os provetes **Alg@am_sa**, **Alg@am_sap** e **Alg_na@am(2x)_sa**.

Segundo o Comité Científico da Segurança dos Consumidores (SCCS), uma concentração abaixo de 6,25% (*m/m*) em alguns produtos cosméticos, nomeadamente em desodorizantes *roll-on*, é segura para o consumidor [171]. Como a concentração de alumínio libertada dos substratos têxteis é na ordem das partes por bilião (ppb), todas estas concentrações são inferiores à definida por este comité e, por isso, estas amostras são seguras nestas condições.

4.4. Ensaio de citotoxicidade

Para a avaliação da viabilidade celular foram realizados ensaios de citotoxicidade a pH 7,4. Embora este pH não seja o mais favorável para a extração, este pH é o mais favorável para o crescimento das células.

Para estes ensaios, foram utilizados os provetes **Alg_na@am(4x)** e **Alg_na@am(4x)_sa**, dado que estes foram tingidos com extrato com uma concentração superior à dos restantes. Caso estas amostras não apresentassem toxicidade, as que foram tingidas usando extrato a concentrações mais baixas também não iriam apresentar. Após a incubação dos provetes **Alg_na@am(4x)** e **Alg_na@am(4x)_sa** em meio DMEM sem FBS, sem solução de antibiótico/antimicótico e sem *L*-glutamina a pH 7,4, determinou-se que tinha sido libertada uma concentração de antocianinas igual a 326 $\mu\text{mol/L}$ na ausência e 492 $\mu\text{mol/L}$ na presença de mordente. Esta e outras concentrações foram testadas nas células, tendo-se obtido os resultados que constam na **Fig. 4.19**.

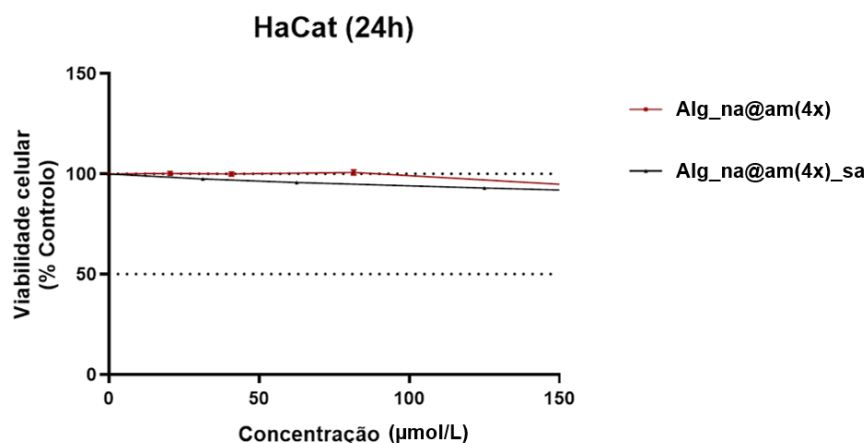


Fig. 4.19 - Percentagens de células viáveis, relativamente a um controlo, após a incubação com a solução extraída das amostras **Alg_na@am(4x)** e **Alg_na@am(4x)_sa**. Os valores representam a média $\pm$ SEM ($n=4$).

A partir da **Fig. 4.19**, verifica-se que realizando uma extração a pH 7,4 não se verifica toxicidade para as células para as concentrações mais baixas (abaixo de 125 $\mu\text{mol/L}$). Para concentrações superiores, já se começa a observar alguma toxicidade, embora a percentagem de células viáveis se mantenha elevada (próximo dos 90%). É de salientar que a viabilidade celular é semelhante na presença e na ausência de mordente, embora seja ligeiramente inferior na presença de mordente.

Estes resultados parecem estar de acordo com a literatura [99], já que em ensaios com linhas celulares HaCat não se verificou toxicidade por parte das antocianinas provenientes de amora e de vinho até uma concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$.

É importante ter em conta que, apesar de o ensaio de MTT ser um ensaio de citotoxicidade amplamente aceite, os resultados obtidos a partir desta técnica podem ter algumas imprecisões devido à possível interferência das propriedades antioxidantes das antocianinas [172]. Esta interferência foi minimizada, uma vez que, antes da adição do MTT, o meio que continha os polifenóis foi retirado dos poços e estes foram lavados com PBS.

Os ensaios de citotoxicidade revelam-se muito importantes para assegurar a utilização destes têxteis como produtos de cosmética seguros para o consumidor. Apesar de ter havido alguma toxicidade para concentrações mais elevadas, é importante ter em conta que estes ensaios foram realizados *in vitro* e que *in vivo* os resultados poderão ser diferentes, já que, nesse caso, os valores dependerão da taxa de absorção da pele, que é um órgão bastante complexo.

4.5. Efeito das antocianinas nas enzimas da pele

Em seguida, serão apresentados os resultados obtidos relativamente aos ensaios de inibição enzimática realizados com as enzimas collagenase, elastase, tirosinase e hialuronidase.

4.5.1. Atividade da collagenase

Para estudar o efeito do extrato de antocianinas de amora e de cy-3-glc na redução da formação de rugas, foram realizados ensaios de inibição enzimática com a enzima collagenase, usando o substrato FALGPA, e monitorizando a reação através da medição da absorvância a 324 nm. Na **Fig. 4.20**, estão representadas as percentagens de inibição enzimática obtidas com as diferentes concentrações de compostos testados.

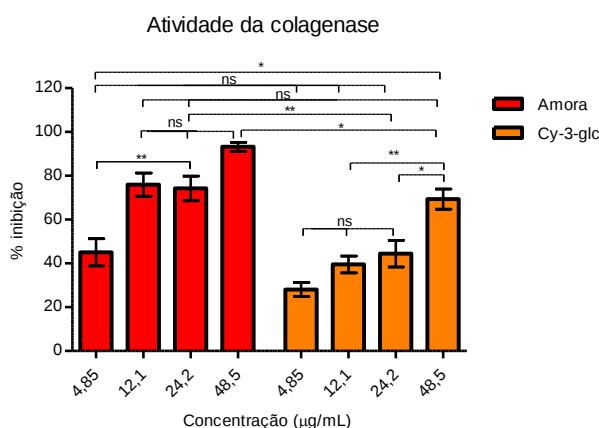


Fig. 4.20 - Percentagens de inibição da collagenase, após a incubação com o extrato de antocianinas de amora e a cy-3-glc. Os valores representam a média $\pm$ SEM ($n=9-10$), * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ (todos os valores são estatisticamente diferentes entre si, exceto os assinalados com ns - valores sem diferenças significativas).

Nas condições experimentais utilizadas, tanto o extrato de antocianinas de amora como a cy-3-glc pura inibiram a collagenase. Para a concentração máxima testada (48,5 $\mu\text{g/mL}$) de extrato de amora, a percentagem de inibição é de $(93,21 \pm 2,07)\%$ e, com a cy-3-glc à mesma concentração, essa percentagem é de $(69,39 \pm 4,59)\%$. Procedeu-se ainda ao cálculo do valor da concentração de inibidor necessária para reduzir a atividade enzimática em 50% (IC_{50}). Para a collagenase, o valor da IC_{50} é de $(5,7 \pm 0,8) \mu\text{g/mL}$, pelo que é necessária uma concentração de 5,7 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de antocianinas de amora, para se verificar uma diminuição da atividade enzimática em 50%. No caso da cy-3-glc, a IC_{50} é de $(26 \pm 4) \mu\text{g/mL}$.

Analisando os resultados obtidos (**Fig. 4.20**), verifica-se um aumento da percentagem de inibição com o aumento da concentração de extrato. Esse aumento não parece ser muito linear, uma vez que não se verificam diferenças significativas entre as situações onde são utilizadas as concentrações 12,1 e 24,2 $\mu\text{g/mL}$.

O extrato de antocianinas de amora é constituído por cerca de 55% de cy-3-glc, pelo que cerca de 45% da massa de extrato corresponde a outros componentes. Apesar de a cy-3-glc ser a antocianina maioritária do extrato de amora, verifica-se que o extrato apresenta um maior poder inibitório do que a cy-3-glc (mesmo quando se comparam as mesmas concentrações de cy-3-glc no extrato e de cy-3-glc pura). Assim, esta antocianina, embora contribua fortemente para a inibição da enzima, não é a única responsável. Possivelmente, os outros polifenóis e os outros componentes presentes no extrato também contribuem para uma maior inibição por parte do extrato. Estudos prévios realizados com polifenóis extraídos de bagaço de uva mostraram que a inibição da collagenase pode resultar de um efeito sinérgico de diferentes polifenóis [173]. De

acordo com a literatura, a inibição da collagenase resulta de interações não covalentes, como interações de hidrogénio e interações hidrofóbicas, com grupos das cadeias laterais da collagenase. Os grupos OH dos polifenóis podem atuar como aceitadores ou doadores de interações de hidrogénio e interagir com os grupos amida e grupos funcionais das cadeias laterais da proteína [174]. Para além disso, podem-se estabelecer interações hidrofóbicas entre os anéis benzénicos dos polifenóis e a enzima [174]. Estas interações levam a mudanças conformacionais na enzima e consequentemente à sua inibição [66]. Dado que as antocianinas e outros polifenóis presentes no extrato possuem vários grupos hidroxilo e alguns anéis benzénicos, a sua estrutura química poderá justificar a elevada percentagem de inibição da collagenase, usando este extrato.

4.5.2. Atividade da elastase

Dado que a elastase também contribui para a formação de rugas, procedeu-se ao estudo do efeito do extrato de antocianinas de amora e da cy-3-glc na inibição desta enzima, usando o substrato *N*-Suc-Ala-Ala-Ala-*p*-NA, e monitorizando a reação através da medição da absorvância a 405 nm. Na **Fig. 4.21**, está representado um gráfico, onde constam as percentagens de inibição da enzima com as diferentes concentrações de extrato de amora e de cy-3-glc testadas.

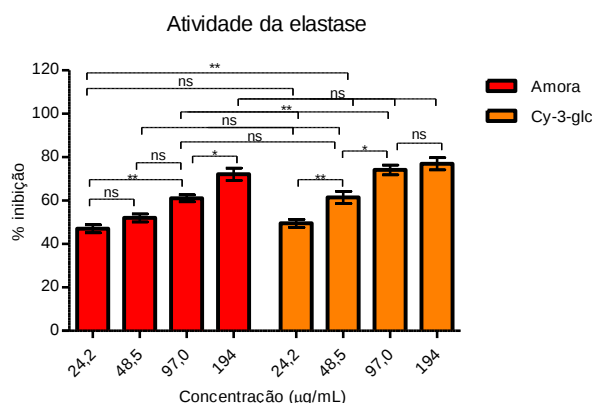


Fig. 4.21 - Percentagens de inibição da elastase, após a incubação com o extrato de antocianinas de amora e a cy-3-glc. Os valores representam a média $\pm$ SEM (n=10-19), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (todos os valores são estatisticamente diferentes entre si, exceto os assinalados com ns - valores sem diferenças significativas).

Nas condições experimentais utilizadas, o extrato de antocianinas de amora e a cy-3-glc foram capazes de inibir a elastase (**Fig. 4.21**), no entanto, foram necessárias concentrações mais elevadas de extrato e cy-3-glc relativamente às outras enzimas para se verificar alguma inibição da elastase. Para o extrato de amora à concentração

máxima testada (194 µg/mL), a percentagem de inibição é de $(72,12 \pm 2,84)\%$ e, com a cy-3-glc à mesma concentração, essa percentagem é de $(76,95 \pm 2,78)\%$. Para além disso, procedeu-se ao cálculo do valor da IC_{50} . No caso da elastase, o valor da IC_{50} é de (37 ± 2) µg/mL, ou seja, é necessária uma concentração de 37 µg/mL de extrato de antocianinas de amora, para se verificar uma diminuição da atividade enzimática em 50%. No caso da cy-3-glc, a IC_{50} é de (29 ± 2) µg/mL.

Através da **Fig. 4.21**, verifica-se um aumento da percentagem de inibição com o aumento da concentração de extrato e de cy-3-glc. Ao comparar concentrações de extrato em que a concentração de cy-3-glc presente no mesmo é igual à concentração de cy-3-glc pura, não se verificam diferenças significativas, pelo que a cy-3-glc poderá ser a principal responsável pela inibição desta enzima. De acordo com os resultados da literatura [66,133], a inibição da elastase é do tipo competitivo e resulta da interação entre polifenóis e a elastase. Esta depende de interações bastante específicas entre grupos hidroxilo polifenólicos e resíduos de aminoácidos do centro ativo e também de interações hidrofóbicas. Assim, as percentagens de inibição que se observam para este extrato e para a cy-3-glc poderão resultar do facto da cy-3-glc (e dos outros polifenóis presentes no extrato) terem vários grupos hidroxilo que poderão interagir com a enzima.

4.5.3. Atividade da tirosinase

Com o objetivo de estudar o efeito do extrato de antocianinas de amora e de cy-3-glc na redução da hiperpigmentação da pele, foram realizados ensaios de inibição enzimática com a enzima tirosinase, usando o composto *L*-DOPA, como substrato, e monitorizando a reação através da medição da absorvância a 475 nm. Na **Fig. 4.22**, estão representadas as percentagens de inibição da enzima tirosinase com as diferentes concentrações de compostos testados.

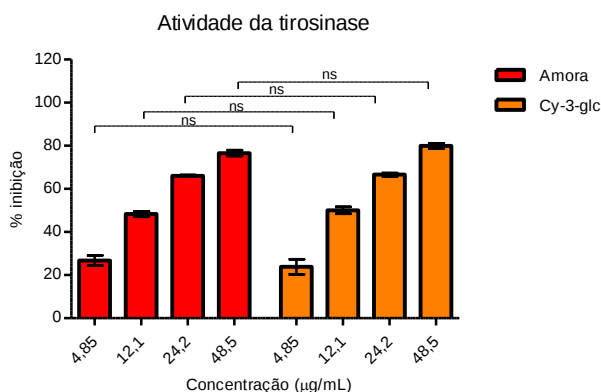


Fig. 4.22 - Percentagens de inibição da tirosinase, após a incubação com o extrato de antocianinas de amora e a cy-3-glc. Os valores representam a média $\pm$ SEM ($n=9$), *** $p<0,001$ (todos os valores são estatisticamente diferentes entre si, exceto os assinalados com ns - valores sem diferenças significativas).

Nestas condições experimentais, quer o extrato de antocianinas de amora quer a cy-3-glc pura inibiram a atividade da tirosinase. Para uma concentração de 48,5 $\mu\text{mol/L}$ (a concentração máxima testada) de extrato de amora, a percentagem de inibição é de $(76,57 \pm 1,34)\%$ e, com a cy-3-glc à mesma concentração, essa percentagem é de $(79,94 \pm 1,16)\%$. Foi também calculado o valor da IC_{50} . Para a tirosinase, o valor da IC_{50} é de $(12 \pm 2) \mu\text{g/mL}$, ou seja, é necessária uma concentração de 12 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de antocianinas de amora, para se verificar uma diminuição da atividade enzimática em 50%. No caso da cy-3-glc, a IC_{50} é de $(11 \pm 2) \mu\text{g/mL}$.

No caso da tirosinase, verifica-se um aumento da percentagem de inibição com o aumento da concentração de extrato e de cy-3-glc e que as mesmas concentrações de extrato e de cy-3-glc apresentam percentagens de inibição semelhantes. No entanto, é importante ter em conta que, nestas situações, a concentração de cy-3-glc no extrato corresponde a 55% da concentração total, pelo que existirão outros componentes que contribuirão para este efeito inibitório. Estudos realizados com extratos de feijão [71] revelam que a cianidina e a cy-3-glc são responsáveis por uma percentagem de inibição da tirosinase mais elevada do que outras antocianinas, o que poderá justificar o sucesso deste extrato e da cy-3-glc enquanto inibidores da tirosinase.

Para além disso, segundo resultados obtidos na literatura [175], o mecanismo de inibição da tirosinase, usando antocianinas, parece ser do tipo competitivo. Estas parecem interagir com o centro ativo da enzima e tornam-no menos disponível para o substrato, *L*-DOPA. Desta forma, os polifenóis presentes no extrato de amora, nomeadamente a cy-3-glc, talvez pela sua estrutura e tamanho, interagirão com o centro ativo da enzima, levando a percentagens de inibição elevadas.

4.5.4. Atividade da hialuronidase

Para estudar o efeito do extrato de antocianinas de amora e da cy-3-glc na redução das rugas e da elasticidade da pele, foram realizados ensaios de inibição enzimática com a hialuronidase. O ácido hialurónico foi usado como substrato e a reação foi estudada através da medição da absorvância a 400 nm. Na **Fig. 4.23**, estão representadas as percentagens de inibição da enzima com as diferentes concentrações de compostos testados.

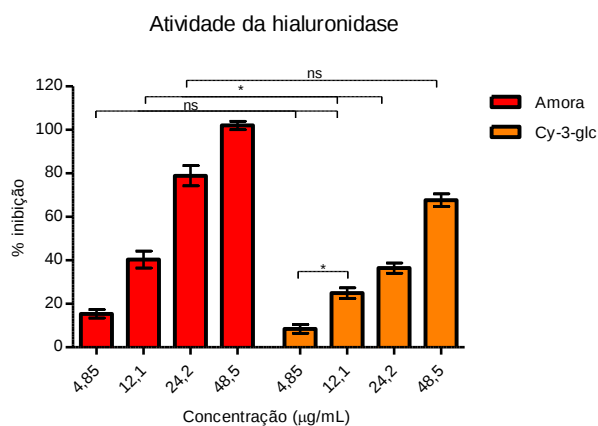


Fig. 4.23 - Percentagens de inibição da hialuronidase, após a incubação com o extrato de antocianinas de amora e a cy-3-glc. Os valores representam a média $\pm$ SEM ($n=9-16$), * $p<0,05$, *** $p<0,001$ (todos os valores são estatisticamente diferentes entre si, exceto os assinalados com ns - valores sem diferenças significativas).

Observando os resultados obtidos, quer o extrato de antocianinas de amora quer a cy-3-glc pura são capazes de inibir a atividade da hialuronidase, nestas condições experimentais. À concentração máxima testada (48,5 $\mu\text{g/mL}$) de extrato de amora, a percentagem de inibição é de $(102,0 \pm 2,0)\%$ e, com a cy-3-glc à mesma concentração, essa percentagem é de $(67,67 \pm 2,90)\%$. Para além disso, calculou-se o valor da IC_{50} . No caso da hialuronidase, o valor da IC_{50} é de $(18 \pm 3) \mu\text{g/mL}$, pelo que é necessária uma concentração de 18 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de antocianinas de amora, para se verificar uma diminuição da atividade enzimática em 50%. Para a cy-3-glc, a IC_{50} foi de $(31 \pm 2) \mu\text{g/mL}$.

Os resultados obtidos usando o extrato completo de antocianinas de amora e a cy-3-glc são diferentes, observando-se que a percentagem de inibição é bastante menor quando a cy-3-glc é usada como inibidor. Apesar de a cy-3-glc ser a antocianina maioritária do extrato de antocianinas de amora, esta não parece ser a principal responsável pela percentagem de inibição obtida com o extrato de amora. De acordo com estudos realizados com a pele e sementes de uva *Vitis rotundifolia* [176], os extratos obtidos a partir das partes da uva que contêm maior teor em antocianinas (a pele da uva madura) não são aqueles que levam a uma maior percentagem de inibição das antocianinas, ao contrário das partes que contêm um alto teor em ácidos fenólicos. Embora se tenha procedido à análise da presença de ácidos fenólicos no extrato, através da técnica de MS, não se verificou um alto teor nestes componentes, no entanto, a sua presença mesmo em baixas concentrações poderá contribuir para o poder inibitório do extrato.

Para além disso, segundo resultados obtidos na literatura [67], polifenóis extraídos de amora mostraram ser capazes de inibir esta enzima. Relativamente ao mecanismo de inibição desta enzima, encontra-se descrito que alguns flavonóides monoméricos e taninos condensados inibem a hialuronidase por um mecanismo do tipo competitivo [177] e, dadas as semelhanças estruturais entre estes e as antocianinas, será provável que esse mecanismo seja o mesmo.

De um modo geral, o extrato de antocianinas de amora foi capaz de inibir as diferentes enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular. À exceção da elastase, onde são necessárias concentrações mais elevadas de extrato para se observar inibição da enzima, todas as restantes enzimas são inibidas fortemente por este extrato. Assim, este extrato poderá ser usado para combater todas as vertentes do processo de envelhecimento, nomeadamente a formação de rugas e o aparecimento de manchas na pele. É importante ter em conta que todos os ensaios de inibição enzimática foram realizadas usando um pH próximo do pH fisiológico e, por isso, dependem das espécies de antocianinas que existem em equilíbrio em solução a esse pH.

Para além disso, é de salientar estes ensaios foram realizados com extrato de antocianinas de amora e cy-3-glc, não tendo sido realizadas experiências com os têxteis por questões de metodologia experimental. O intervalo de concentrações testadas variou de 4,85 µg/mL a 48,5 µg/mL no caso da colagenase, da tirosinase e da hialuronidase tendo sido semelhante ao utilizado nos ensaios de citotoxicidade. No caso da elastase, foram utilizadas concentrações (24,2 µg/mL a 197 µg/mL) que são superiores às libertadas pelos substratos têxteis. Estes ensaios serviram, assim, para comprovar a inibição das enzimas responsáveis pelo envelhecimento por parte do extrato e determinar a IC₅₀ do extrato para cada uma das enzimas.

O objetivo da utilização dos têxteis com uma ação antienvelhecimento não é a total inibição destas enzimas, já que a ação das mesmas faz parte do normal funcionamento da pele. A colagenase, a elastase e a hialuronidase são importantes para a renovação da matriz extracelular e a tirosinase é responsável pela produção de melanina, que é muito importante para dar coloração à pele, ao cabelo e aos olhos e proteger o organismo da radiação UV [54]. Assim, apenas, se pretende diminuir a atividade destas enzimas de forma a prevenir o envelhecimento da pele.

Em praticamente todas as enzimas foi possível observar um efeito melhor do extrato de amora do que da antocianina pura (tendo em conta a quantidade de cy-3-glc presente no extrato de ser comparado o efeito da concentração de antocianina pura com a de 55% da concentração de extrato). Tal como já foi referido, este resultado pode estar

relacionado com a presença de outros componentes da matriz. Essa possibilidade só pode ser explorada conhecendo o mecanismo de atuação da enzima em condições normais de funcionamento e o mecanismo de inibição de diferentes tipos de compostos. O facto do extrato levar à obtenção de percentagens de inibição superiores ou semelhantes às da cy-3-glc constitui uma vantagem a nível da aplicação industrial, uma vez que não é necessário purificar a cy-3-glc para se obter o máximo de atividade inibitória.

Uma vez que estudos de *docking* com a tirosinase já estavam em curso no grupo, foi selecionada uma outra enzima envolvida na renovação da matriz extracelular (a hialuronidase) com atividade num substrato polimérico não peptídico para o estudo de *docking* molecular.

4.6. Estudos de *docking* molecular com a hialuronidase

Neste estudo computacional sobre a inibição da hialuronidase usando antocianinas, foram avaliadas as interações entre o centro ativo da enzima e diferentes formas da antocianina maioritária do extrato de amora (cy-3-glc).

A hialuronidase é uma endo-*N*-acetil-*D*-hexosaminidase que cliva especificamente a ligação glicosídica β -1,4 entre o GlcA e a GlcNAc que fazem parte das longas cadeias do ácido hialurónico. O substrato mais pequeno desta enzima é um hexassacárido, do qual são clivadas as duas últimas unidades, sendo o produto final da hidrólise o tetrassacárido GlcA – GlcNAc – GlcA – GlcNAc. A hialuronidase pertence à família 56 das glicosidases, e o seu modo de ação foi proposto como um mecanismo de deslocação duplo, que envolve a formação e subsequente hidrólise de um intermediário covalente. A conformação do carbono anomérico do açúcar hidrolisado é mantida, o grupo acetamido anexado ao carbono 2 atua como grupo nucleófilo, enquanto o resíduo carboxílico Glu113 (correspondente ao Glu131 na enzima humana) foi identificado como resíduo ácido/base (doador/aceitador de prótons) [178,179]. Para além deste resíduo catalítico, a Tyr184 (Tyr202 na hialuronidase humana) foi identificada como relevante para a catálise porque estabiliza/polariza a molécula de água necessária à hidrólise. O centro ativo da enzima é ainda enriquecido por vários resíduos aromáticos, característica típica dos locais de ligação de proteínas e enzimas que ligam açúcares [180-183].

Estudos anteriores sugerem que a quercetina e outros flavonóides são inibidores competitivos da hialuronidase [143]. Desta forma, os estudos teóricos focaram-se na análise estrutural da ligação ao centro ativo da enzima. Primeiramente, foi avaliada a

região do centro ativo que interagira com o tetrassacárido, a partir da estrutura PDB com o código 1FCV, tendo-se identificado os resíduos mais relevantes para a interação (Figs. 4.24).

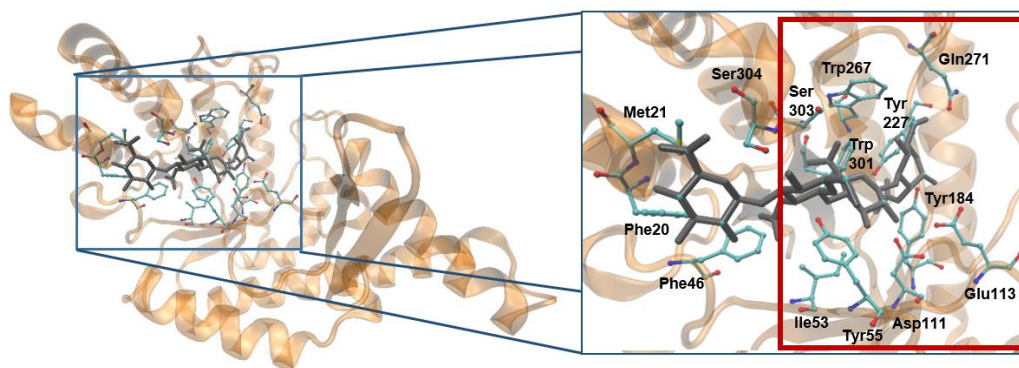


Fig. 4.24 - Estrutura da hialuronidase complexada com o tetrassacárido, evidenciando os resíduos mais importantes do centro ativo. Esta figura foi preparada com recurso ao programa VMD, a partir do código PDB 1FCV. A representação *New Cartoon* evidencia a estrutura da enzima, enquanto o tetrassacárido e os resíduos do centro ativo se encontram representados em paus (*Licorice*) e bolas-e-paus (*CPK*), respetivamente. Os átomos de hidrogénio não se encontram representados para simplificar a visualização.

Os resíduos mais importantes para a interação com o tetrassacárido e que se mantiveram conservados na maioria das soluções obtidas durante a validação do processo de *docking* molecular encontram-se representados na Fig. 4.25.

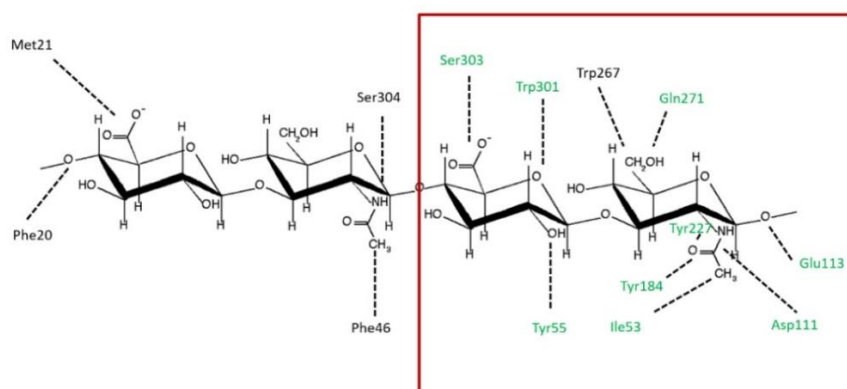


Fig. 4.25 - Representação esquemática do tetrassacárido e dos resíduos do centro ativo da hialuronidase que se encontram a menos de 4 Å do mesmo. A verde encontram-se evidenciados os resíduos mais importantes do centro ativo e que se mantiveram conservados na maioria das soluções obtidas durante a validação do processo de *docking* molecular (Asp - aspartato; Gln - glutamina; Glu - glutamato; Ile - isoleucina; Met - metionina; Phe - fenilalanina; Ser - serina; Trp - triptofano; Tyr - tirosina).

Entre o tetrassacárido e a hialuronidase, verifica-se que a maioria das interações estabelecidas entre o substrato e os resíduos da enzima são interações de hidrogénio, principalmente entre os grupos hidroxilo do tetrâmero do ácido hialurónico e os grupos polares (hidroxilo ou carboxílico) das cadeias laterais dos resíduos Tyr55, Asp111,

Glu113, Tyr184, Tyr227, Gln271 e Ser303. Para além disso, são estabelecidas interações de *VdW* e dispersivas com a cadeia alifática do resíduo de Ile53 e com o anel aromático do Trp301. O nicho aromático (Tyr184, Tyr227 e Trp301) e os resíduos polares Asp111 e Gln271 parecem importantes para manter a unidade a clivar no local adequado para a catálise pelo Glu113 e as unidades seguintes do substrato são estabilizadas por interações com a Ser303 e a Ser304 e por empilhamento π - π com os resíduos Tyr55 e Trp301.

Tendo em conta que o protocolo de *docking* molecular utilizado gerou com sucesso o modo de ligação verificado na cristalografia de raios-X [142], procedeu-se à simulação da ligação das moléculas de quercetina e de quercetina-3-glucósido, de cy-3-glc maioritárias a pH 7 (a pseudobase carbinol e a chalcona), da molécula de 3-desoxicianidina (também designada de luteolinidina) e da sua respetiva chalcona, usando as condições de *docking* molecular previamente definidas e validadas. Como esperado, visto que a região de *docking* molecular focou-se no centro ativo da enzima, os vários compostos interagiram no mesmo local que o tetrassacárido (**Fig. 4.26**).

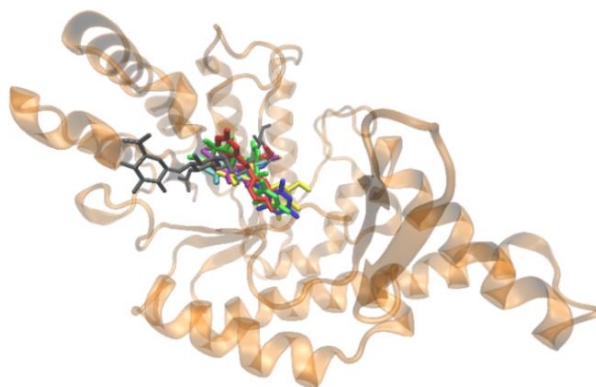


Fig. 4.26 - Estrutura da hialuronidase complexada com o tetrassacárido (cinzento) e com os ligandos estudados: quercetina (roxo), quercetina-3-glucósido (vermelho), cy-3-glc (amarelo), cy-3-glc na forma de chalcona (verde); luteolinidina (azul claro) e luteolinidina na forma de chalcona (azul escuro). Esta figura foi preparada com recurso ao programa VMD, a partir do código PDB 1FCV. A representação *New Cartoon* evidencia a estrutura da enzima e o tetrassacárido e os ligandos encontram-se na representação *paus* (*Licorice*).

A análise estrutural dos complexos formados entre a hialuronidase e os ligandos estudados permite identificar as várias interações estabelecidas. Os ligandos mantêm a maioria dos contactos com a enzima considerados relevantes para a associação do substrato: interações de hidrogénio, principalmente entre os grupos hidroxilo dos polifenóis e os grupos polares das cadeias laterais dos resíduos Tyr55, Asp111, Glu113, Tyr184, Tyr227, Ser303, Ser304 e Asp305. Para além disso, são estabelecidas interações de *VdW* e dispersivas com os anéis aromáticos dos resíduos Tyr55, Tyr184, Tyr227 e Trp301. A presença destes resíduos aromáticos no centro ativo possibilita a

existência de um nicho que fortalece as interações hidrofóbicas entre estes e os anéis aromáticos dos ligandos, ajuda a definir o modo de interação e a manter o substrato ou ligando numa posição adequada para a catálise ou inibição da enzima. Este tipo de encaixe estrutural é comum em proteínas e enzimas que ligam hidratos de carbono, e foi identificado como relevante para a associação molecular [180].

De acordo com a literatura, o mecanismo de inibição da hialuronidase é do tipo competitivo [143,184]. Um dos resíduos mais importantes para a reação catalisada pela hialuronidase do veneno de abelha é o Glu113. Tal como mencionado anteriormente, a hialuronidase catalisa um mecanismo de reação ácido/base, em que o Glu113 atua como doador de prótons e o grupo acetamido do ácido hialurónico atua como base nucleofílica [142]. Esta identificação do Glu113 como resíduo catalítico está de acordo com os estudos de mutagénese na proteína do esperma humano, a hialuronidase PH-20. A substituição de Glu113 por glutamina na proteína PH-20 resultou numa proteína sem atividade, pelo que este resíduo é fundamental para a atividade da hialuronidase [185]. Dado que o alinhamento da sequência da hialuronidase de veneno de abelha com hialuronidases humanas comprova a conservação dos resíduos do sítio ativo, é possível inferir que o mecanismo catalítico é semelhante para ambas [142].

Na **Tabela 4.27** encontram-se representados os valores de ΔG_{lig} para as melhores soluções de *docking* molecular obtidas para cada um dos ligandos testados, bem como os grupos mais próximos e a respetiva distância ao resíduo catalítico Glu113, e na **Fig. 4.27** encontram-se representadas as interações estabelecidas entre os diferentes ligandos e o centro ativo da hialuronidase.

Tabela 4.27- Valores para as melhores soluções de *docking* molecular obtidas para cada um dos ligandos testados; identificação do grupo de cada composto mais próximo do Glu113, assim como as respetivas distâncias

Ligando	ΔG_{lig} (kcal/mol)	Grupo mais próximo do Glu113	Distância ao Glu113 (Å)
Tetrassacárido	-3,55	Oxigénio 4	2,70
Quercetina	-5,94	Anel B	2,94
Quercetina-3-glucósido	-5,83	Glucose	3,90
	-5,58	Anel B	3,00
	-4,17	Anel A e C	3,42
Cy-3-glc	-6,34	Anel B	2,73
	-5,97	Glucose	2,64
Cy-3-glc (chalcona)	-5,03	Anel B	4,21
Luteolinidina	-6,31	Anel B	3,36
Luteolinidina (chalcona)	-6,01	Anel B	4,15

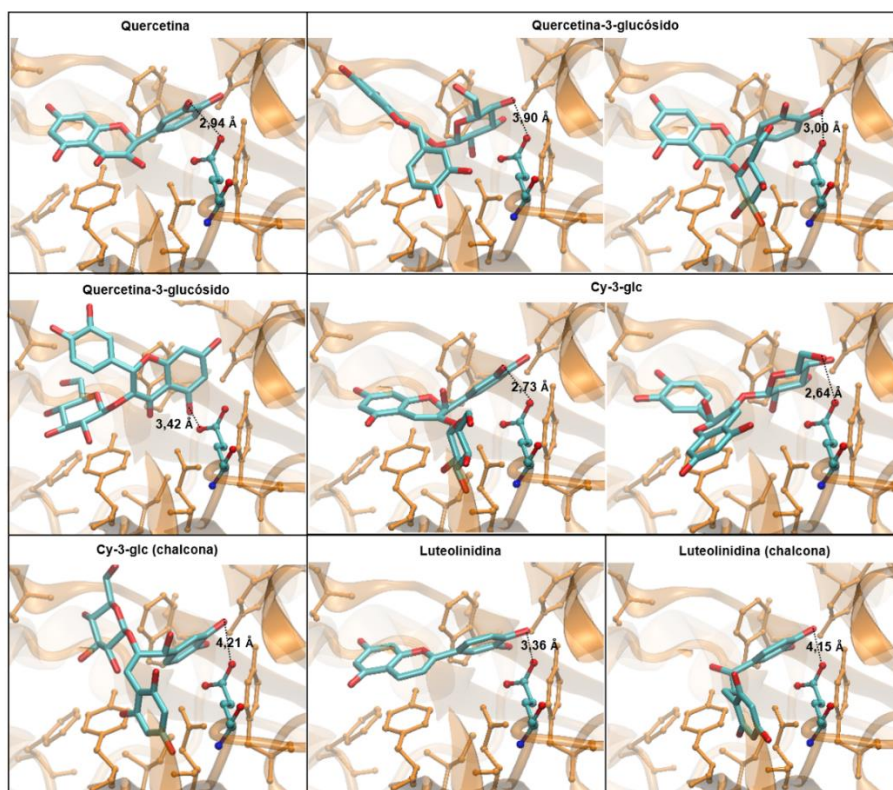


Fig. 4.27 - Interações estabelecidas entre os diferentes ligandos e o centro ativo da hialuronidase, evidenciando a distância ao resíduo Glu113. Esta figura foi preparada com recurso ao programa VMD, a partir do código PDB 1FCV. A representação *New Cartoon* evidencia a estrutura da enzima, os ligandos encontram-se na representação paus (*Licorice*) e os resíduos do centro ativo, nomeadamente o Glu113, na representação bolas-e-paus (*CPK*). Os átomos de hidrogénio não se encontram representados para simplificar a visualização.

Todos os valores de ΔG_{lig} obtidos para os diferentes ligandos são mais negativos do que os obtidos para o tetrassacárido (o produto final da hidrólise do ácido hialurónico), o que poderá ser indicativo de uma boa afinidade entre estes compostos e a enzima. Esta observação está de acordo com a literatura [143], onde já tinha sido observado que as moléculas de quercetina e quercetina-3-glucósido têm uma afinidade superior à do substrato. Os resultados de *docking* molecular indicam que os valores de ΔG_{lig} dos ligandos estudados variam entre -4,1 e -6,3 kcal/mol. Estes valores de afinidade são semelhantes aos sugeridos anteriormente para vários compostos fenólicos (inclusive a quercetina-3-glucósido) da *Ravenala madagascariensis* relativamente à hialuronidase de veneno de abelha (ΔG_{lig} entre -4,0 e -7,0 kcal/mol) [143]. No entanto, a ordem de afinidade prevista pelo *docking* molecular não está em concordância com a ordem obtida nos ensaios cinéticos experimentais (resultados obtidos pelo grupo), onde foi observado que a quercetina apresentava uma percentagem de inibição mais elevada do que a cianidina e a luteolinidina. Em estudos anteriores com inibidores da hialuronidase, foram também observadas diferenças

análogas para alguns compostos. Por exemplo, a epicatequina apresenta uma maior capacidade de inibição do que a rutina (34,4% e 23,7%), mas os resultados obtidos no *docking* são opostos (a energia de ligação obtida para a epicatequina é -4,8 kcal/mol e para a rutina é -7,1 kcal/mol). Este facto deve-se provavelmente à diferença significativa de tamanho molecular dos vários compostos avaliados (um composto de maiores dimensões poderá estabelecer mais interações com a enzima e, por isso, favorecer o valor de ΔG_{lig} , no entanto, experimentalmente, este pode não ser o melhor inibidor). Deste modo, foram analisados os modos de interação dos ligandos e as principais interações moleculares com os resíduos da enzima, por forma a clarificar as diferentes atividades inibitórias [143].

Apesar da quercetina e da quercetina-3-glucósido estarem descritas na literatura [143] como inibidores positivos da enzima, os valores de ΔG_{lig} associados a estas moléculas são ligeiramente menos negativos que os obtidos para os restantes ligandos estudados, embora se encontrem dentro do erro esperado para este tipo de ensaios [186]. No caso da quercetina, esta apresenta um ΔG_{lig} de -5,94 kcal/mol e a interação pelo anel B é favorecida. Estes resultados são concordantes com os obtidos na literatura [187], onde também é sugerido um modo de interação pelo anel B e apresentam um ΔG_{lig} de -5,15 kcal/mol. Tal como o substrato, a quercetina interage com o Glu113, encontrando-se a uma distância inferior a 3 Å. Para além disso, estabelece interações de hidrogénio com os resíduos Asp111, Tyr184, Ser304 e Asp305 e interage por empilhamento π - π com os resíduos Tyr55 e Trp301. Relativamente à quercetina-3-glucósido, verifica-se que esta pode interagir com a hialuronidase pela glucose, pelo anel B ou pelos anéis A e C. Apesar do valor de ΔG_{lig} ser mais negativo no caso da glucose, verifica-se que é nesta situação que o ligando fica mais afastado do Glu113 e que há perda do empilhamento π - π com a Tyr55. A interação pelo anel B é muito semelhante à da quercetina. A interação pelos anéis A e C encontra-se em concordância com os resultados obtidos na literatura (onde o valor de ΔG_{lig} é -6,08 kcal/mol) [143] embora, neste caso, se verifique um afastamento em relação ao resíduo Glu113, quando comparado com a estrutura em que o ligando interage pelo anel B. Deste modo, a interação entre a enzima e a quercetina-3-glucósido deve ser parecida ou ligeiramente inferior à da respetiva aglicona (o que também é sugerido pelos valores de ΔG_{lig}), devido à competição entre os vários modos de interação.

Atendendo aos valores de ΔG_{lig} , a pseudobase carbinol da cy-3-glc e a luteolinidina são as estruturas que têm maior afinidade para com a enzima, quando interagem pelo anel B. No caso da cy-3-glc, a interação pelo anel B é favorecida (ΔG_{lig}

é mais negativo do que no caso da interação pela glucose). Nesta situação, o modo de interação do núcleo flavânico é muito semelhante ao da quercetina. O anel B encontra-se bastante próximo dos resíduos Asp111, Glu113 e Tyr184, e os anéis A e C interagem por empilhamento π - π com a Tyr55. Quando a cy-3-glc interage pela glucose, esta região fica mais próxima do Glu113 e da Tyr184 e, apesar, do anel B interagir por empilhamento π - π com a Tyr55, esta interação não é tão favorecida como na primeira situação. Na forma de chalcona, a cy-3-glc apresenta uma afinidade menor para a enzima. Esta estrutura interage pelo anel B, mas fica bastante mais afastada do Glu113 (distância superior a 4 Å) e perde a interação por empilhamento π - π com a Tyr55. Tal poderá dever-se ao facto de esta ter uma maior liberdade de movimento devido à quebra do anel C e, por isso, ficar mais afastada. Relativamente à luteolinidina, esta também interage pelo anel B, de um modo muito semelhante à quercetina, embora se afaste ligeiramente do Glu113 e deixe de interagir com o Asp111. A ausência da glucose e a inexistência de um grupo OH no local de ligação de glucose poderão justificar uma menor interação com o centro ativo da enzima relativamente à cy-3-glc e à quercetina (respetivamente). A luteolinidina na forma de chalcona interage pelo anel B, no entanto fica bastante mais afastada do Glu113 (distância superior a 4 Å) e perde a interação com a região Tyr55, Ser303, Ser304 e Asp305. Mais uma vez, a quebra do anel C poderá contribuir para uma maior liberdade de movimento e para uma menor interação com a enzima.

Tendo em conta todos estes resultados, é possível concluir que, neste caso, a interação com o Glu113 parece ser fundamental para determinar a inibição da hialuronidase, tal como as interações estabelecidas com os resíduos Tyr55, Asp111 Tyr184 e Trp301. Os valores de ΔG_{lig} complementados pelas várias interações estabelecidas entre a quercetina, quercetina-3-glucósido, forma pseudobase carbinol da cy-3-glc e luteolinidina com os resíduos do centro ativo sugerem uma grande afinidade para a enzima. No entanto, ambas as formas de chalcona da luteolinidina e da cy-3-glc revelaram uma menor afinidade, o que indica a sua inferior prevalência em solução.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos experimentalmente para a cy-3-glc, admitindo que as formas maioritárias em solução são as da pseudobase carbinol, já que se verificou uma percentagem de inibição elevada para este composto. Para além disso, estes resultados também são concordantes com os obtidos para o extrato de antocianinas de amora. Apesar de este apresentar uma percentagem de inibição superior à da cy-3-glc, é importante ter em conta que outros componentes da matriz poderão contribuir para este efeito inibitório, nomeadamente as quercetinas.

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

5.1. Conclusões

A execução deste projeto revelou-se muito importante para estudar as propriedades biológicas das antocianinas da amora e a sua aplicabilidade em substratos têxteis.

Através deste estudo, é possível concluir que o extrato de antocianinas de amora pode ser usado com sucesso para o tingimento dos substratos têxteis, apresentando maior eficácia no caso da malha de algodão comparativamente à poliamida. Neste trabalho, foram determinadas as condições ótimas de tingimento para o algodão, tendo-se verificado que um tingimento realizado a 90 °C com extrato sem ajuste de pH e na ausência ou na presença de mordente (a baixas concentrações) parece favorecer o processo de tingimento (por exemplo, o provete **Alg_na@am(4x)**, $L^* = 26,92$, $a^* = 29,44$, $b^* = 6,42$, $\Delta E = 69,11$ e com uma percentagem de lixiviação de 23,01%). Todas as técnicas de caracterização utilizadas (colorimetria, FTIR-ATR e XPS) confirmaram a imobilização das antocianinas nos substratos têxteis.

A realização de ensaios de libertação revelou-se determinante para comprovar que as antocianinas são libertadas dos substratos têxteis para o suor artificial, pelo que estes têxteis poderão exercer o seu efeito funcional na pele. Adicionalmente, os ensaios de citotoxicidade comprovaram que os substratos têxteis obtidos mostraram não ter toxicidade para as células.

Para além disso, através deste estudo, foi possível concluir que os têxteis tingidos poderão ser utilizados para combater o processo de envelhecimento, já que o extrato de antocianinas utilizado no tingimento apresenta um efeito inibitório das enzimas que são sobre-expressas durante o envelhecimento (colagenase, elastase, tirosinase e hialuronidase), diminuindo assim a formação de rugas e a hiperpigmentação da pele.

Assim, este projeto apresenta resultados bastante positivos que podem ser abordados de duas formas distintas. Em primeiro lugar, é possível concluir que as antocianinas poderão ser uma alternativa aos corantes sintéticos usados na indústria têxtil, independentemente do efeito funcional esperado. Com o mesmo extrato natural e usando diferentes condições de tingimento, foram obtidos têxteis com diferentes cores, como cor-de-rosa, roxo, cinza, azul, verde e amarelo. Em segundo lugar, os têxteis tingidos aparentam ter um efeito protetor e antienvelhecimento e poderão constituir uma

boa alternativa às formulações cosméticas atualmente existentes (daí pertencerem ao grupo dos cosmetotêxteis).

No que diz respeito à sustentabilidade do nosso Planeta, o uso de antocianinas no tingimento de substratos têxteis também se revela promissor. Uma parte significativa da produção agrícola resulta em frutas que não apresentam o formato, a cor e o calibre desejados pelo consumidor, o que constitui uma das causas do atual desperdício alimentar. Assim, a utilização de extratos provenientes de resíduos das indústrias agroalimentares na indústria têxtil é um processo altamente sustentável e económico, uma vez que permite reduzir os desperdícios de diversas indústrias e, ao mesmo tempo, valorizar vários resíduos industriais e diminuir os custos de produção dos têxteis (o custo de um corante natural é cerca de 15 vezes menor do que o custo de um corante sintético [188]). Para além disso, a extração das antocianinas das amoras é um processo barato e amigo do ambiente, já que pode ser realizada em grande escala com recurso a água. Dado que os processos de tingimento para as imobilizar nos substratos têxteis também já se encontram desenvolvidos na área da indústria têxtil e são economicamente viáveis, no final, o custo da produção deste tipo de cosmetotêxteis será baixo. As novas tendências de mercado mostram que a população procura produtos de origem natural para utilizar no seu dia-a-dia, pelo que a comercialização de têxteis funcionais ou máscaras faciais com agentes naturais e a preços reduzidos poderá ser do interesse dos consumidores.

Assim, este projeto comprova que, aproveitando a cor das antocianinas e as propriedades benéficas para a saúde, estas poderão ser consideradas bons substituintes de alguns pigmentos sintéticos no tingimento de substratos têxteis, originando produtos visualmente atrativos e com efeitos vantajosos para pele.

5.2. Perspetivas Futuras

Em termos de perspetivas futuras, seria interessante prosseguir este projeto num contexto mais industrial. Em parceria com o CITEVE já têm vindo a ser realizados tingimentos em maior escala e têm vindo a ser avaliadas as características colorimétricas dos têxteis e o seu índice de proteção UV. Seria interessante prosseguir com estudos complementares, nomeadamente finalizar o processo de otimização das condições de tingimento em contexto industrial e realizar tingimentos com outros substratos, como a lã.

Para além disso, seria importante estudar a encapsulação das antocianinas em nanopartículas inorgânicas para incorporação em têxteis, como um potencial sistema de libertação controlada destes compostos para as células da pele, de modo a verificar se este tipo de sistemas torna os cosmetotêxteis mais eficientes.

Por limitações temporais, não foi possível realizar mais ensaios biológicos; no entanto, no futuro, seria essencial executá-los, nomeadamente os estudos de transporte e permeabilidade e os ensaios de cicatrização, usando linhas celulares de queratinócitos e fibroblastos e recorrendo ao sistema *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing* (ECIS), bem como a realização de ensaios de quantificação de colagénio, elastina, ácido hialurónico e melanina em linhas celulares.

Numa fase mais avançada do projeto, seria fundamental realizar estudos em voluntários, de modo a compreender se estes substratos têxteis provocam alguma reação alérgica *in vivo*.

Para concluir, é possível dizer que este projeto permitiu demonstrar que as antocianinas poderão ser usadas para produzir cosmetotêxteis, que tenham como principais funções prevenir o envelhecimento e contribuir para o bem-estar e saúde da pele. Contudo, é importante referir que ainda serão necessários mais estudos neste sentido, de modo a confirmar todos os benefícios da sua utilização.

6. Referências bibliográficas

1. Frond, A.D., et al. (2019), "Phytochemical Characterization of Five Edible Purple-Reddish Vegetables: Anthocyanins, Flavonoids, and Phenolic Acid Derivatives", *Molecules*. 24, 1536, 1-22.
2. D'Archivio, M., et al. (2007), "Polyphenols, Dietary Sources and Bioavailability", *Ann. Ist. Super. Sanità*. 43, 4, 348-361.
3. Fraga, C.G., et al. (2019), "The Effects of Polyphenols and Other Bioactives on Human Health", *Food Funct*. 10, 2, 514-528.
4. Ganesan, K., Xu, B. (2017), "A Critical Review on Polyphenols and Health Benefits of Black Soybeans", *Nutrients*. 9, 455, 1-17.
5. Beckman, C. (2000), "Phenolic-Storing Cells: Keys to Programmed Cell Death and Periderm Formation in Wilt Disease Resistance and in General Defence Responses in Plants?", *Physiol. Mol. Plant P*. 57, 101-110.
6. Han, X., Shen, T., Lou, H. (2007), "Dietary Polyphenols and Their Biological Significance", *Int. J. Mol. Sci*. 8, 9, 950-988.
7. Castro-Barquero, S., et al. (2018), "Relationship Between Mediterranean Dietary Polyphenol Intake and Obesity", *Nutrients*. 10, 1523, 1-13.
8. Bravo, L. (1998), "Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance", *Nutr. Rev*. 56, 11, 317-333.
9. Cory, H., et al. (2018), "The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review", *Front. Nutr*. 5, 87, 1-9.
10. Costa, C., et al. (2017), "Current Evidence on the Effect of Dietary Polyphenols Intake on Chronic Diseases", *Food Chem. Toxicol*. 110, 286-299.
11. Zillich, O., et al. (2015), "Polyphenols as Active Ingredients for Cosmetic Products", *Int. J. Cosmet. Sci*. 37, 455-464.
12. Panche, A.N., Diwan, A.D., Chandra, S.R. (2016), "Flavonoids: An Overview", *J. Nutr. Sci*. 5, 1-15.
13. Kumar, S., Pandey, A.K. (2013), "Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview", *Sci. World J*. 2013, 1-16.
14. Khoo, H.E., et al. (2017), "Anthocyanidins and Anthocyanins: Colored Pigments as Food, Pharmaceutical Ingredients, and the Potential Health Benefits", *Food Nutr. Res*. 61, 1, 1-21.
15. Castañeda-Ovando, A., et al. (2009), "Chemical Studies of Anthocyanins: A Review", *Food Chem*. 113, 4, 859-871.
16. Sun, W., et al. (2016), "Biochemical and Molecular Characterization of a Flavonoid 3-O-glycosyltransferase Responsible for Anthocyanins and Flavonols Biosynthesis in *Freesia hybrida*", *Front. Plant Sci*. 7, 410, 1-14.
17. Andersen, Ø., Jordheim, M. (2013) *Basic Anthocyanin Chemistry and Dietary Source*, in "Anthocyanins in Health and Disease". CRC Press 2, 13-90.
18. Brooks, M.S.L., Celli, G.B. (2019) *Chemistry of Anthocyanins*, in "Anthocyanins from Natural Sources: Exploiting Targeted Delivery for Improved Health". RSC 2, 34-76.
19. Sancho, R.A.S., Pastore, G.M. (2012), "Evaluation of the Effects of Anthocyanins in Type 2 Diabetes", *Food Res. Int.* 46, 1, 378-386.

20. Gould, K., Davies, K.M., Winefield, C. (2009) *Anthocyanin Biosynthesis in Plant Cell Cultures: A Potential Source of Natural Colourants*, in "Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications". Springer 5, 108-167.
21. He, J.J., et al. (2010), "Different Anthocyanin Profiles of the Skin and the Pulp of Yan7 (Muscat Hamburg x Alicante Bouschet) Grape Berries", *Molecules*. 15, 3, 1141-1153.
22. He, J., Giusti, M.M. (2010), "Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties", *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 1, 163-187.
23. Oliveira, J., Mateus, N., de Freitas, V. (2014), "Previous and Recent Advances in Pyranoanthocyanins Equilibria in Aqueous Solution", *Dyes Pigm.* 100, 190-200.
24. Mazza, G., Brouillard, R. (1987), "Recent Developments in the Stabilization of Anthocyanins in Food Products", *Food Chem.* 25, 207-225.
25. Andersen, O.M., Markham, K.R. (2005) *The Anthocyanins*, in "Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications". CRC Press 10, 471-552.
26. Wahyuningsih, S., et al. (2016), "The Effect of pH and Color Stability of Anthocyanin on Food Colorant ", *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 193, 1-9.
27. G.H, L., et al. (2006), "The Effect of Light, Temperature, pH and Species on Stability of Anthocyanin Pigments in Four Berberis Species", *Pak. J. Nutr.* 5, 90-92.
28. Patras, A., et al. (2010), "Effect of Thermal Processing on Anthocyanin Stability in Foods: Mechanisms and Kinetics of Degradation", *Trends Food Sci. Technol.* 21, 3-11.
29. Remini, H., et al. (2018), "Recent Advances on Stability of Anthocyanins", *J. Agron.* 13, 257-286.
30. Moncada, M., et al. (2003), "Complexation of Aluminum(III) by Anthocyanins and Synthetic Flavylum Salts", *Inorg. Chim. Acta.* 356, 51-61.
31. Giusti, M.M., Wrolstad, R.E. (2003), "Acylated Anthocyanins from Edible Sources and Their Applications in Food Systems", *Biochem. Eng. J.* 14, 3, 217-225.
32. Kong, J.-M., et al. (2003), "Analysis and Biological Activities of Anthocyanins", *Phytochemistry*. 64, 5, 923-933.
33. Horbowicz, M., et al. (2008), "Anthocyanins of Fruit and Vegetables – Their Occurrence, Analysis and Role in Human Nutrition", *Veg. Crop. Res. Bull.* 68, 5-22.
34. de Pascual-Teresa, S., Sanchez-Ballesta, M.T. (2008), "Anthocyanins: From Plant to Health", *Phytochem. Rev.* 7, 2, 281-299.
35. Gould, K., Davies, K.M., Winefield, C. (2008) *Role of Anthocyanins in Plant Defence*, in "Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications". Springer Science 2, 22-28.
36. Landi, M., Tattini, M., Gould, K.S. (2015), "Multiple Functional Roles of Anthocyanins in Plant-Environment Interactions", *Environ. Exp. Bot.* 119, 4-17.
37. Lila, M.A. (2004), "Anthocyanins and Human Health: An In Vitro Investigative Approach", *J. Biomed. Biotechnol.* 2004, 306-313.
38. Pizzino, G., et al. (2017), "Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health", *Oxid. Med. Cell Longev.* 2017, 1-13.
39. Martin, J., et al. (2017) *Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments*, in "Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health". Intech 205-255.
40. Fukumoto, L.R., Mazza, G. (2000), "Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds", *J. Agric. Food Chem.* 48, 8, 3597-3604.

41. Miguel, M. (2011), "Anthocyanins: Antioxidant and/or Anti-inflammatory Activities", *J. Appl. Pharm. Sci.* 1, 7-15.
42. Yazhen, S., et al. (2020) *Anthocyanins: Novel Antioxidants in Diseases Prevention and Human Health*, in "Flavonoids - A Coloring Model for Cheering up Life". *Intech* 5, 1-16.
43. Cisowska, A., Wojnicz, D., Hendrich, A.B. (2011), "Anthocyanins as Antimicrobial Agents of Natural Plant Origin", *Nat. Prod. Commun.* 6, 1, 149-156.
44. Majiene, D., et al. (2014), "Antioxidative and Antimicrobial Activity of Anthocyanin-Rich Extracts from Fruits of Blackcurrant and Cherry", *Acta Hort.* 1040, 173-177.
45. Vendrame, S., Klimis-Zacas, D. (2015), "Anti-inflammatory Effect of Anthocyanins Via Modulation of Nuclear Factor- κ B and Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Cascades", *Nutr. Rev.* 73, 6, 348-358.
46. Li, S., et al. (2019), "The Anti-inflammatory Effects of Dietary Anthocyanins against Ulcerative Colitis", *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2588, 1-18.
47. Lin, B.-W., et al. (2017), "Effects of Anthocyanins on the Prevention and Treatment of Cancer", *Br. J. Pharmacol.* 174, 11, 1226-1243.
48. Wang, L.-S., Stoner, G.D. (2008), "Anthocyanins and Their Role in Cancer Prevention", *Cancer Lett.* 269, 281-290.
49. Zhang, J., et al. (2019), "Neuroprotective Effects of Anthocyanins and Its Major Component Cyanidin-3-O-glucoside (C3G) in the Central Nervous System: An Outlined Review", *Eur. J. Pharmacol.* 858, 1-10.
50. Reis, J.F., et al. (2016), "Action Mechanism and Cardiovascular Effect of Anthocyanins: a Systematic Review of Animal and Human Studies", *J. Transl. Med.* 14, 315, 1-16.
51. Turrini, E., Ferruzzi, L., Fimognari, C. (2017), "Possible Effects of Dietary Anthocyanins on Diabetes and Insulin Resistance", *Curr. Drug Targets.* 18, 629-640.
52. Nomi, Y., Iwasaki-Kurashige, K., Matsumoto, H. (2019), "Therapeutic Effects of Anthocyanins for Vision and Eye Health", *Molecules.* 24, 3311, 1-18.
53. Fernandes, I., et al. (2014), "Bioavailability of Anthocyanins and Derivatives", *J. Funct. Foods.* 7, 54-66.
54. Junqueira, L.C., Carneiro, J. (2013) *Pele e Anexos*, in "Histologia Básica: Texto e Atlas". *Grupo Editorial Nacional* 18, 353-366.
55. Iftimia, N., et al. (2013), "Combined Reflectance Confocal Microscopy / Optical Coherence Tomography Imaging for Skin Burn Assessment", *Biomed. Opt. Express.* 4, 680-695.
56. Nafisi, S., Maibach, H.I. (2018) *Skin Penetration of Nanoparticles*, in "Emerging Nanotechnologies in Immunology". *Elsevier* 3, 47-88.
57. Menon, G.K., Dryer, L., Kalafsky, R. (2009) *Approaches to the Development of Cosmetic Products to Counter the Effects of Skin Aging*, in "Skin Aging Handbook". *William Andrew Publishing* 11, 265-290.
58. Gilaberte, Y., et al. (2016) *Anatomy and Function of the Skin*, in "Nanoscience in Dermatology". *Academic Press* 1, 1-14.
59. Binic, I., et al. (2013), "Skin Ageing: Natural Weapons and Strategies", *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013, 1-10.

60. Ndlovu, G., et al. (2013), "In vitro Determination of the Anti-aging Potential of Four Southern African Medicinal Plants", *BMC Complement. Altern. Med.* 13, 304, 1-7.
61. Gelse, K., Poschl, E., Aigner, T. (2003), "Collagens-Structure, Function, and Biosynthesis", *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 12, 1531-1546.
62. Kristensen, J.H., Karsdal, M.A. (2016) *Elastin*, in "Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin". *Academic Press* 30, 197-201.
63. Papakonstantinou, E., Roth, M., Karakiulakis, G. (2012), "Hyaluronic Acid: A Key Molecule in Skin Aging", *Dermatoendocrinol.* 4, 3, 253-258.
64. Nanashima, N., et al. (2018), "Blackcurrant Anthocyanins Increase the Levels of Collagen, Elastin, and Hyaluronic Acid in Human Skin Fibroblasts and Ovariectomized Rats", *Nutrients.* 10, 495, 1-15.
65. Thring, T.S., Hili, P., Naughton, D.P. (2009), "Anti-collagenase, Anti-elastase and Anti-oxidant Activities of Extracts from 21 Plants", *BMC Complement Altern. Med.* 9, 27, 1-11.
66. Wittenauer, J., et al. (2015), "Inhibitory Effects of Polyphenols from Grape Pomace Extract on Collagenase and Elastase Activity", *Fitoterapia.* 101, 179-187.
67. Marquina, M.A., et al. (2002), "Hyaluronidase Inhibitory Activity from the Polyphenols in the Fruit of Blackberry (*Rubus fruticosus* B.)", *Fitoterapia.* 73, 7, 727-729.
68. Arkopharma Laboratories. (14/05/2020) in <https://www.arkopharma.com/fr-FR/perles-de-peau-besoins-anti-rides-partir-de-40-ans>.
69. Cichorek, M., et al. (2013), "Skin Melanocytes: Biology and Development", *Postepy Dermatol. Alergol.* 30, 1, 30-41.
70. Zuo, A.-R., et al. (2018), "The Antityrosinase and Antioxidant Activities of Flavonoids Dominated by the Number and Location of Phenolic Hydroxyl Groups", *Chin. Med.* 13, 51, 1-12.
71. Tsuda, T., Osawa, T. (1997), "Inhibition of Tyrosinase Activity by the Anthocyanin Pigments Isolated from *Phaseolus vulgaris* L.", *Food Sci. Technol. Int.* 3, 1, 82-83.
72. Tobin, D.J. (2017), "Introduction to Skin Aging", *J. Tissue Viability.* 26, 1, 37-46.
73. Ganceviciene, R., et al. (2012), "Skin Anti-aging Strategies", *Dermatoendocrinol.* 4, 3, 308-319.
74. Zhi, Q., et al. (2020), "The Anthocyanin Extracts from Purple-Fleshed Sweet Potato Exhibited Anti-photoaging Effects on Ultraviolet B-Irradiated BALB/c-nu Mouse Skin", *J. Funct. Foods.* 64, 1-9.
75. Yetisen, A.K., et al. (2016), "Nanotechnology in Textiles", *ACS Nano.* 10, 3, 3042-3068.
76. Paul, R. (2014) *Functional Finishes for Textiles: An Overview*, in "Functional Finishes for Textiles: Improving Comfort, Performance and Protection". *Woodhead Publishing* 1, 1-14.
77. Saba, N., Jawaid, M. (2017) *Epoxy Resin Based Hybrid Polymer Composites*, in "Hybrid Polymer Composite Materials". *Woodhead Publishing* 3, 57-82.
78. Reay, D., Ramshaw, C., Harvey, A. (2013) *Application Areas – Miscellaneous Process Industries*, in "Process Intensification: Engineering for Efficiency, Sustainability and Flexibility". *Butterworth-Heinemann* 10, 349-391.

79. Ledwani, L., Sangwai, J. (2020) *Eco-friendly Surface Modification and Nanofinishing of Textile Polymers to Enhance Functionalisation*, in "Nanotechnology for Energy and Environmental Engineering". Springer 23, 529-559.
80. Pereira, C., et al. (2020) *Nanoengineered Textiles: From Advanced Functional Nanomaterials to Groundbreaking High-Performance Clothing*, in "Handbook of Functionalized Nanomaterials for Industrial Applications". Elsevier 21, 611-714.
81. Iheaturu, N., et al. (2019), "Advancements in Textile Finishing", *IOSR J. Polymer. Text. Eng.* 6, 23-31.
82. Riaz, S., et al. (2018), "Functional Finishing and Coloration of Textiles with Nanomaterials", *Color. Technol.* 134, 327-346.
83. Thangavel, K., Duraisamy, G. (2014) *Environmental Analysis of Textile Value Chain: An Overview*, in "Roadmap to Sustainable Textiles and Clothing, Textile Science and Clothing Technology". 6, 153-188.
84. Broadbent, A.D. (2003) "Basic Principles of Textile Coloration". *Society of Dyers and Colourists*, 28, 230-231.
85. Phan, K., et al. (2020), "The Potential of Anthocyanins from Blueberries as a Natural Dye for Cotton: A Combined Experimental and Theoretical Study", *Dyes Pigm.* 176, 1-19.
86. Nelson, G. (2002), "Application of Microencapsulation in Textiles", *Int. J. Pharm.* 242, 1, 55-62.
87. Wang, H., Tang, Z., Zhou, W. (2016), "A Method for Dyeing Cotton Fabric with Anthocyanin Dyes Extracted from Mulberry (*Morus rubra*) Fruits", *Coloration Technol.* 132, 222-231.
88. Chakraborty, J.N. (2014) *Dyeing with Natural Dyes*, in "Fundamentals and Practices in Colouration of Textiles". Woodhead Publishing India 20, 233-261.
89. Chattopadhyay, D.P. (2011) *Chemistry of Dyeing*, in "Handbook of Textile and Industrial Dyeing". Woodhead Publishing 4, 150-183.
90. Buschmann, H.J., Dehabadi, V.A., Wiegand, C. (2015) *Medical, Cosmetic and Odour Resistant Finishes for Textiles*, in "Functional Finishes for Textiles". Woodhead Publishing 10, 303-330.
91. Tiwari, D., et al. (2017), "Cosmetotextiles Used as a Medicine ", *Int. J. Res. Pharm. Chem.* . 814-828.
92. Nalankilli, G. (2018), "Integration of Cosmetics with Textiles: An Emerging Area of Functional Textiles - A Review", *LTTFD.* 2, 122-124.
93. Union, C.o.t.E. (1976), "Cosmetics Directive 76/768/EEC ", *Official Journal of the European Communities.* 262, 169 - 200.
94. Barel, A.O., Maibach, H.I. (2014) *Cosmetotextiles - A New Aspect of Technical Textiles*, in "Handbook of Cosmetic Science and Technology". CRC Press 51, 525-537.
95. Upadhyay, H., Jahan, S., Upreti, M. (2016), "Cosmetotextiles: Emerging Trend in Technical Textiles", *IOSR J. Polymer. Text. Eng.* 3, 6, 8-14.
96. Bechtold, T., Mahmud-Ali, A., Mussak, R. (2007), "Anthocyanin Dyes Extracted from Grape Pomace for the Purpose of Textile Dyeing", *J. Sci. Food Agric.* 87, 14, 2589-2595.
97. Velmurugan, P., et al. (2017), "Extraction of Natural Colorant from Purple Sweet Potato and Dyeing of Fabrics with Silver Nanoparticles for Augmented Antibacterial Activity Against Skin Pathogens", *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* . 173, 571-579.

98. Cramer, H., et al. (2011) "Anthocyanin Dyes in Titanium Dioxide Nanoparticle-dye Sensitized Solar Cells". *IEEE*, 11.
99. Évora, A., et al. (2017), "The Effect of Anthocyanins from Red Wine and Blackberry on the Integrity of a Keratinocyte Model Using ECIS", *Food Funct.* 8, 11, 3989-3998.
100. Blum, F. (2014), "High Performance Liquid Chromatography", *Br. J. Hosp. Med.* 75, C18-21.
101. Fernandes, I., et al. (2010), "Influence of Anthocyanins, Derivative Pigments and Other Catechol and Pyrogallol-Type Phenolics on Breast Cancer Cell Proliferation", *J. Agric. Food Chem.* 58, 3785-3792.
102. Azevedo, J., et al. (2014), "Migration of Phenolic Compounds from Different Cork Stoppers to Wine Model Solutions: Antioxidant and Biological Relevance", *Eur. Food Res. Technol.* 239, 951-960.
103. Teixeira, N., et al. (2018), "Wine Industry By-product: Full Polyphenolic Characterization of Grape Stalks", *Food Chem.* 268, 110-117.
104. Wilson, I.D. (2011), "High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (HPLC-MS)-Based Drug Metabolite Profiling", *Methods Mol. Biol.* 708, 173-190.
105. Banerjee, S., Mazumdar, S. (2012), "Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte", *Int. J. Anal. Chem.* 2012, 1-40.
106. Musci, M., Yao, S. (2017), "Optimization and Validation of Folin-Ciocalteu Method for the Determination of Total Polyphenol Content of Pu-erh Tea", *Int. J. Food Sci. Nutr.* 68, 913-918.
107. Koşar, M., Goger, F., Baser, K.H.C. (2011), "In vitro Antioxidant Properties and Phenolic Composition of *Salvia halophila* Hedge from Turkey", *Food Chem.* 129, 374-379.
108. Bradford, M.M. (1976), "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding", *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
109. Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996), "The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay", *Anal. Biochem.* 239, 70-76.
110. Jaffer, M., et al. (2019), "Green Vegetation: A Promising Source of Color Dyes", *Green Process. Synth.* 8, 215-222.
111. Khanmirzaee, S., Montazer, M., Pashae, A. (2020), "Dyeing of Cotton Fabric with Antibacterial Properties Using Direct Dye and CTAB", *J. Nat. Fibers.* 17, 223-234.
112. Ragain, J. (2016), "A Review of Color Science in Dentistry: Colorimetry and Color Space", *J. Dent. Oral Disord. Ther.* 4, 1-5.
113. Pardo, P., et al. (2014), "A Low-Cost Real Color Picker Based on Arduino", *Sensors.* 14, 11943-11956.
114. Pinto, T.V., et al. (2016), "Naphthopyran-Based Silica Nanoparticles as New High-Performance Photoresponsive Materials", *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 8, 7221-7231.
115. Stuart, B. (2004) "Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications". *John Wiley & Sons, Ltd.*, 3, 45-70.

116. Coates, J. (2006) *Interpretation of Infrared Spectra, a Practical Approach*, in "Encyclopedia of Analytical Chemistry". John Wiley & Sons, Ltd. 12, 10815-10837.
117. Skoog, D.A., Holler, F. J., Nieman, T. A. (1998) "Principles of Instrumental Analysis". Brooks Cole, 3, 389-436.
118. Baker, M.J., et al. (2014), "Using Fourier Transform IR Spectroscopy to Analyze Biological Materials", *Nat. Protoc.* 9, 8, 1771-1791.
119. Grdadolnik, J. (2002), "ATR-FTIR Spectroscopy: Its Advantages and Limitations", *Acta Chim. Slov.* 49, 631-642.
120. Li, H., et al. (2009) *Amyloids and Protein Aggregation—Analytical Methods*, in "Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation". John Wiley & Sons, Ltd. 2009, 1-32.
121. Konno, H. (2016) *X-ray Photoelectron Spectroscopy*, in "Materials Science and Engineering of Carbon". Butterworth-Heinemann. 8, 153-171.
122. Thermo Scientific - XPS. (14/05/2020) in <https://xpssimplified.com/whatisxps.php>.
123. Mather, R.R. (2009) *Surface Modification of Textiles by Plasma Treatments*, in "Surface Modification of Textiles". Woodhead Publishing. 13, 296-317.
124. Hosokawa, M., et al. (2012) *Characterization Methods for Nanostructure of Materials*, in "Nanoparticle Technology Handbook ". Elsevier. 5, 267-315.
125. Wagener, S., et al. (2016), "Textile Functionalization and Its Effects on the Release of Silver Nanoparticles into Artificial Sweat", *Environ. Sci. Technol.* 50, 5927-5934.
126. Standardization, I.-I.O.f. (2013), "Textiles - Tests for Colour Fastness - Part E04 - Colour Fastness to Perspiration", 105 - E04.
127. Fernández, B., Lobo, L., Pereiro, R. (2019) *Atomic Absorption Spectrometry | Fundamentals, Instrumentation and Capabilities*, in "Encyclopedia of Analytical Science ". Academic Press. 1, 137-143.
128. Davidowski, L. (2011), "Determination of Aluminum in Serum in Customer-Validated Applications using THGA and Longitudinal Zeeman Atomic Absorption", *PerkinElmer, Inc.* 1, 1-4.
129. López-García, J., et al. (2014), "HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation", *J. Funct. Biomater.* 5, 43-57.
130. Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, S.J. (1995), "A Critical Assessment of the Use of Microculture Tetrazolium Assays to Measure Cell Growth and Function", *Growth Regul.* 5, 69-84.
131. Remoué, N., et al. (2013), "Development of an in vitro Model of Menopause Using Primary Human Dermal Fibroblasts", *Int. J. Cosmet. Sci.* 35, 546-554.
132. Kim, Y.J., Uyama, H., Kobayashi, S. (2004), "Inhibition Effects of (+)-Catechin-Aldehyde Polycondensates on Proteinases Causing Proteolytic Degradation of Extracellular Matrix", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 256-261.
133. Bras, N.F., et al. (2010), "Inhibition of Pancreatic Elastase by Polyphenolic Compounds", *J. Agric. Food Chem.* 58, 10668-10676.
134. Kubo, I., et al. (2003), "Tyrosinase Inhibition Kinetics of Anisic Acid", *Z. Naturforsch., C, J. Biosci.* 58, 713-718.

135. Gonzalez-Pena, D., et al. (2013), "Hyaluronidase Inhibiting Activity and Radical Scavenging Potential of Flavonols in Processed Onion", *J. Agric. Food Chem.* 61, 4862-4872.
136. Christensen, R. (2001) *Analysis of Variance and Generalized Linear Models*, in "International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences". Elsevier 4, 473-480.
137. Armstrong, R. (2014), "When to Use the Bonferroni Correction", *Ophthalmic Physiol. Opt.* 34, 502-508.
138. Meng, X.-Y., et al. (2011), "Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery", *Curr. Comput. Aided Drug Des.* 7, 146-157.
139. Pagadala, N.S., Syed, K., Tuszynski, J. (2017), "Software for Molecular Docking: a Review", *Biophys. Rev.* 9, 91-102.
140. McConkey, B., Sobolev, V., Edelman, M. (2002), "The Performance of Current Methods in Ligand-Protein Docking", *Curr. Sci.* 83, 845-856.
141. Morris, G.M., et al. (2009), "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility", *J. Comput. Chem.* 30, 16, 2785-2791.
142. Marković-Housley, Z., et al. (2000), "Crystal Structure of Hyaluronidase, a Major Allergen of Bee Venom", *Structure.* 8, 1025-1035.
143. Mohamed, E.M., et al. (2020), "Bioassay-Guided Isolation, Metabolic Profiling, and Docking Studies of Hyaluronidase Inhibitors from *Ravenala madagascariensis*", *Molecules.* 25, 7, 1-12.
144. Hanwell, M.D., et al. (2012), "Avogadro: an Advanced Semantic Chemical Editor, Visualization, and Analysis Platform", *J. Cheminformatics.* 4, 1-17.
145. Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. (1996), "VMD: Visual Molecular Dynamics", *J. Mol. Graph.* 14, 33-38.
146. Oszmiański, J., et al. (2015), "Analysis of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Wild Blackberry Fruits", *Int. J. Mol. Sci.* 16, 14540-14553.
147. Fernandes, A., et al. (2009), "Antioxidant and Biological Properties of Bioactive Phenolic Compounds from *Quercus suber* L", *J. Agric. Food Chem.* 57, 11154-11160.
148. Hirsch, G., et al. (2013), "Antioxidant Activity of Blackberry (*Rubus* sp.) Genotypes from the Southern Region of Brazil", *Bol. Cent. de Pesqui. de Process. de Aliment.* 31, 83-98.
149. Haar, S., Schrader, E., Gatewood, B. (2013), "Comparison of Aluminum Mordants on the Colorfastness of Natural Dyes on Cotton", *Cloth. Text. Res. J.* 31, 97-108.
150. Crini, G., Badot, P.-M. (2008), "Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature", *Prog. Polym. Sci.* 33, 399-447.
151. Wen, Y., et al. (2016), "A Polyamide Resin Based Method for Adsorption of Anthocyanins from Blackberry", *New J. Chem.* 40, 3773-3780.
152. Sigurdson, G.T., Giusti, M.M. (2014), "Bathochromic and Hyperchromic Effects of Aluminum Salt Complexation by Anthocyanins from Edible Sources for Blue Color Development", *J. Agric. Food Chem.* 62, 6955-6965.
153. Chang, H., et al. (2013), "Characterization of Natural Dye Extracted from Wormwood and Purple Cabbage for Dye-Sensitized Solar Cells", *Int. J. Photoenergy.* 2013, 1-8.

154. Favaro, L.I.L., et al. (2018), "Physicochemical Characterization of a Crude Anthocyanin Extract from the Fruits of Jussara (*Euterpe edulis* Martius): Potential for Food and Pharmaceutical Applications", *J. Braz. Chem. Soc.* 29, 2072-2088.
155. Chung, C., Lee, M., Choe, E.K. (2004), "Characterization of cotton fabric scouring by FT-IR ATR spectroscopy", *Carbohydr. Polym.* 58, 417-420.
156. Pereira, C., et al. (2011), "Designing Novel Hybrid Materials by One-Pot Co-condensation: From Hydrophobic Mesoporous Silica Nanoparticles to Superamphiphobic Cotton Textiles", *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 3, 2289-2299.
157. Ortega, R., Carter, E., Ortega, A. (2016), "Nylon 6,6 Nonwoven Fabric Separates Oil Contaminates from Oil-in-Water Emulsions", *PLoS One.* 11, 1-9.
158. Zarshenas, K., Raisi, A., Aroujalian, A. (2015), "Surface Modification of Polyamide Composite Membranes by Corona Air Plasma for Gas Separation Applications", *RSC Adv.* 5, 19760–19772.
159. Guerrini, L., et al. (2009), "Electrospinning and Characterization of Polyamide 66 Nanofibers With Different Molecular Weights", *Mater. Res-Ibero-Am. J.* 12, 181-190.
160. Moulder, J.F. (1995.) *Standard XPS Spectra of the Elements*, in "Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy.". *Perkin-Elmer Corporation* 2, 33-195.
161. Belgacem, M.N., et al. (1995), "Surface Characterization of Cellulose Fibres by XPS and Inverse Gas Chromatography", *Cellulose.* 2, 145-157.
162. Hamzah, M., et al. (2018), "Surface Chemistry Changes and Microstructure Evaluation of Low Density Nanocluster Polyethylene under Natural Weathering: A Spectroscopic Investigation", *J. Phys. Conf. Ser.* 984, 1-14.
163. Pereira, C., et al. (2018), "Multifunctional Mixed Valence N-doped CNT@MFe 2 O 4 Hybrid Nanomaterials: from Engineered One-pot Coprecipitation to Application in Energy Storage Paper Supercapacitors", *Nanoscale.* 10, 12820–12840.
164. Liu, Z., et al. (2014), "Interfacial Adhesion of Polyamide 66 Fibres to an Aqueous Polyurethane–Acrylic Hybrid Polymer Adhesive", *J. Adhesion.* 90, 310-326.
165. Ding, Y., et al. (2017), "Synthesis of Short-chain Passivated Carbon Quantum Dots as the Light Emitting Layer towards Electroluminescence", *RSC Adv.* 7, 28754-28762.
166. Begum, S., et al. (2019), "Surface Modification of Polyamide 6,6 Fabrics with an Alkaline Protease -Subtilisin", *J. Eng. Fiber. Fabr.* 11, 64-74.
167. Klotz, K., et al. (2017), "The Health Effects of Aluminum Exposure", *Dtsch. Ärztebl. Int.* 114, 653-659.
168. Pennington, J.A.T. (1988), "Aluminium Content of Foods and Diets", *Food Addit. Contam.* . 5, 161-232.
169. Stahl, T., Taschan, H., Brunn, H. (2011), "Aluminium Content of Selected Foods and Food Products", *Environ. Sci. Eur.* 23, 37.
170. Zeiner, M., Juranović Cindrić, I. (2018), "Harmful Elements (Al, Cd, Cr, Ni, and Pb) in Wild Berries and Fruits Collected in Croatia", *Toxics.* 6, 1-10.
171. Safety, S.C.o.C. (2019), "The Safety of Aluminium in Cosmetic Products", *European Commission.*
172. Elisia, I., et al. (2008), "Evaluation of Viability Assays for Anthocyanins in Cultured Cells", *Phytochem. Anal.* 19, 479-486.

173. Mohd Maidin, N., et al. (2018), "Polyphenols Extracted from Red Grape Pomace by a Surfactant Based Method Show Enhanced Collagenase and Elastase Inhibitory Activity", *J. Chem. Technol. Biot.* 93, 7, 1916-1924.
174. Madhan, B., et al. (2007), "Role of Green Tea Polyphenols in the Inhibition of Collagenolytic Activity by Collagenase", *Int. J. Biol. Macromol.* 41, 16-22.
175. Évora, A. (2017) "Bioatividade de Pigmentos Antociânicos e de Novos Derivados Lipofílicos para Aplicação na Indústria Cosmética", in *Departamento de Química e Bioquímica*, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
176. Bralley, E., et al. (2008), "Inhibition of Hyaluronidase Activity by Vitis rotundifolia. (Muscadine) Berry Seeds and Skins", *Pharm. Biol.* 45, 667-673.
177. Bralley, E., et al. (2008), "Inhibition of Hyaluronidase Activity by Select Sorghum Brans", *J. Med. Food.* 11, 307-312.
178. Jedrzejewski, M., Stern, R. (2005), "Structures of Vertebrate Hyaluronidases and Their Unique Enzymatic Mechanism of Hydrolysis", *Proteins.* 61, 227-238.
179. Chao, K.L., Muthukumar, L., Herzberg, O. (2007), "Structure of Human Hyaluronidase-1, a Hyaluronan Hydrolyzing Enzyme Involved in Tumor Growth and Angiogenesis", *Biochemistry.* 46, 23, 6911-6920.
180. Cerqueira, N., et al. (2012) *Glycosidases – A Mechanistic Overview*, in "Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology". *Intech* 6, 117-134.
181. Brás, N.F., Fernandes, P.A., Ramos, M.J. (2018), "Understanding the Rate-Limiting Step of Glycogenolysis by Using QM/MM Calculations on Human Glycogen Phosphorylase", *ChemMedChem.* 13, 1608-1616.
182. Brás, N.F., et al. (2018), "Mechanistic Pathway on Human α -Glucosidase Maltase-Glucoamylase Unveiled by QM/MM Calculations", *J. Phys. Chem. B.* 122, 3889-3899.
183. Brás, N.F., Fernandes, P.A., Ramos, M.J. (2010), "QM/MM Studies on the β -Galactosidase Catalytic Mechanism: Hydrolysis and Transglycosylation Reactions", *J. Chem. Theory Comput.* 6, 421-433.
184. Kuppusamy, U.R., Khoo, H.E., Das, N.P. (1990), "Structure-Activity Studies of Flavonoids as Inhibitors of Hyaluronidase", *Biochem. Pharmacol.* 40, 2, 397-401.
185. Arming, S., et al. (1997), "In vitro Mutagenesis of PH-20 Hyaluronidase from Human Sperm", *Eur. J. Biochem.* 247, 3, 810-814.
186. Fukunishi, Y., et al. (2018), "Prediction of Protein-compound Binding Energies from Known Activity Data: Docking-score-based Method and its Applications", *Mol. Inform.* 37, 1-11.
187. Ahmed, M., Aldesouki, H., Badria, F. (2019), "Effect of Phenolic Compounds from the Rind of Punica granatum on the Activity of Three Metabolism-related Enzymes", *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1, 1-13.
188. Mishra, A., Gautam, S. (2020), "Application of Natural Dyes for Herbal Textiles", *InTech.* 1, 1-25.