

SÍNTESE DE DERIVADOS CATIONIZADOS A PARTIR DOS POLISSACARÍDEOS ALGINATO DE SÓDIO E GOMA ARÁBICA

Palavras-Chave: Polissacarídeos, Alginato de sódio, Goma arábica, COVID-19, Cationização

Autores:

MATHEUS MILANEZ LEONETTI, FEQ – UNICAMP

MSc. CAROLINE SANTINON (co-orientadora), FEQ – UNICAMP

Prof.^a Dr.^a MELISSA GURGEL ADEODATO VIEIRA (orientadora), FEQ – UNICAMP

1. INTRODUÇÃO

A COVID-19 é uma doença infectocontagiosa causada pelo vírus SARS-CoV-2, que desencadeou uma pandemia que perdurou por cerca de três anos. Os sintomas predominantes da infecção incluíam dores de cabeça, febre, fadiga, tosse seca e, em casos mais severos, dores no peito e dificuldade respiratória (OPAS/OMS/ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2020). Embora tenha sido significativamente controlada na atualidade, os cientistas persistem na busca por estratégias para conter a sua proliferação e, assim, prevenir o surgimento de novas variantes. Nesse contexto, tem-se observado um notável progresso no desenvolvimento de materiais dotados de propriedades antimicrobianas ao longo dos últimos anos (ABU ELELLA et al., 2021).

Dessa forma, os compostos quaternários de amônio (CAQs) têm se destacado bastante desde a pandemia, devido às suas propriedades biocidas e surfactantes. Esses tipos de compostos são formados por um átomo de nitrogênio central carregado positivamente, o qual interage com a membrana de diversos grupos de microrganismos, que é carregada negativamente, promovendo trocas iônicas que causam danos em sua estrutura (ABU ELELLA et al., 2021; FLANJAK et al., 2023). Contudo, a aplicação extensiva dessas substâncias revelou-se consideravelmente tóxica, tanto aos seres humanos quanto ao próprio meio ambiente. A ingestão ou inalação de grandes concentrações dos CAQs pode resultar na morte de diversas células por interferir no funcionamento mitocondrial e, com a pandemia, esses compostos passaram a se acumular em grandes quantidades nas matrizes ambientais, como águas residuais e superficiais, sendo dificilmente removidos nas estações de tratamento (MOHAPATRA, 2024).

Com base nisso, o presente estudo se focou na incorporação desses grupos catiônicos em biopolímeros, através de um processo de cationização, de modo a garantir a manutenção das propriedades antimicrobianas dos compostos de amônio e, ao mesmo tempo, utilizar um material que minimiza sua toxicidade. Os biopolímeros selecionados para esse fim foram o alginato de sódio e goma arábica, posto que ambos são polissacarídeos naturais, biodegradáveis, biocompatíveis, não tóxicos e com baixo custo, além de serem muito versáteis e capazes de formar filmes ou géis, além de serem suscetíveis ao processo de cationização (DE ALMEIDA et al., 2022; RONGHUA et al., 2003; DE SOUSA et al., 2020).

O objetivo principal foi testar e analisar a capacidade antiviral dos biopolímeros cationizados visando à minimização da proliferação do vírus causador da COVID-19. Com base nisso, este estudo é inovador ao considerar que nenhuma outra referência na literatura atual aplicou estes polissacarídeos cationizados contra um vírus.

2. METODOLOGIA

2.1. Materiais

Nos experimentos foram utilizados os polissacarídeos alginato de sódio e goma arábica, além do reagente cationizante cloreto de glicidil trimetilamônio (GTMAC), todos adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. Também foi usado, com grau analítico, hidróxido de sódio e álcool absoluto. Todos os experimentos utilizaram água destilada ou ultrapura.

2.2. Síntese dos polissacarídeos cationizados

A modificação química do alginato de sódio e da goma arábica seguiram o mesmo procedimento em sistemas distintos, onde aproximadamente 5 g do polissacarídeo foi dissolvido em 50 mL de água deionizada. Posteriormente, adicionou-se 15,16 g de GTMAC (0,1 M). Após esta etapa, cerca de 0,06 g de NaOH foram dissolvidos em 10 mL de água deionizada e adicionados à mistura inicial, colocando-a em banho termostático a 70 °C durante 1 hora para que ocorresse o processo de cationização (SANTINON; BEPPU; VIEIRA, 2023). Por fim, a mistura foi transferida para um béquer de 50 mL e fechado com papel parafilm, para ser congelada até o dia posterior e, então, colocada na liofilizadora por alguns dias.

Figura 1 - Aparência das blendas de alginato de sódio cationizado e goma arábica.



2.3. Preparo das blendas

Após o processo de modificação química, foram preparadas três blendas de alginato de sódio cationizado (AC) e goma arábica natural (G) nas proporções de 25G:75AC, 50G:50AC e 75G:25AC com o intuito de avaliar o efeito da redução viral pela quantidade de polissacarídeo modificado. Para isto, o alginato de sódio foi cationizado de acordo com a Seção 2.2 e posteriormente adicionou-se a goma arábica natural para formação das blendas em diferentes concentrações. As soluções foram congeladas e liofilizadas, sendo mostradas na Figura 1.

2.4. Atividade virucida e citotoxicidade

Os derivados catiônicos dos biopolímeros e as blendas preparadas foram submetidos a uma análise de comportamento biológico no laboratório de biossegurança nível 3 do Instituto de Biologia da UNICAMP. Para esse estudo, a linhagem celular empregada foi a L-929 com o coronavírus MHV-3, em um meio de cultura de DMEM com 2 a 10% de soro fetal bovino (FBS). Foram realizadas diluições sequenciais em placas de 96 poços com concentração de 2×10^5 células/poço e, então, foram colocadas em contato com os polissacarídeos por um período de 5 minutos. O ensaio foi realizado em quadruplicata. As placas de 96 poços foram levadas a incubadora a 37 °C e 5% de CO₂ durante 48 horas. Em seguida, efetuou-se a microscopia óptica invertida para observação da viabilidade celular e o efeito citopático.

2.5. Análises de caracterização

2.5.1. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Ambos os biopolímeros modificados foram submetidos à análise de FTIR, realizada a partir da mistura dos compostos com pó de brometo de potássio para formação de pastilhas. A leitura foi feita na

faixa de 4000-650 cm^{-1} no equipamento Thermo Scientific, Nicolet 6700 (Madison, EUA). O propósito dessa análise foi avaliar a presença e intensidade das bandas referentes aos grupos catiônicos incorporados.

2.5.2. Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

As amostras sólidas foram dispersas em lâminas de vidro para o procedimento de recobrimento metálico de ouro com espessura de aproximadamente 200 Å. A análise de MEV foi realizada utilizando-se o equipamento Leo Electron Microscopy/ Oxford (Leo 440i, Cambridge, Inglaterra) com ampliações de 500, 1000 e 1500x.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Atividade antiviral e citotoxicidade

Inicialmente, foram testados os polissacarídeos alginato de sódio cationizado e goma arábica cationizada, em relação com as formas comerciais. De acordo com a Tabela 1, apenas o alginato de sódio cationizado apresentou uma porcentagem de redução viral significativa (96,84 %) em contato com o vírus MHV-3 após 5 minutos. Sendo assim, optou-se por seguir o estudo apenas com este polissacarídeo modificado e usando a goma arábica comercial sem modificação para a preparação de blendas com diferentes concentrações. Assim como esperado, a porcentagem de redução viral das blendas se mostrou vinculada com a concentração do alginato de sódio cationizado na matriz. A formulação 25G:75AC alcançou 94,12% de redução viral. Para ser considerado virucida, é necessário que o material seja capaz de reduzir 99,99% (redução de 4 log) (MAXMAQ, 2024). No entanto, devido a restrições práticas, apenas o tempo de 5 minutos de contato pôde ser testado, mas é possível que tempos maiores de contato com o material possam aumentar a porcentagem de inativação.

Tabela 1 - Dados médios de redução da infectividade viral e viabilidade celular

Amostra	Tempo de contato (min)	% de redução viral	Viabilidade celular
Alginato comercial	5	0,00	Não citotóxico
Alginato cationizado	5	96,84	Não citotóxico
Goma arábica comercial	5	0,00	Não citotóxico
Goma arábica <u>cationizada</u>	5	0,00	Não citotóxico
Blenda 25G:75AC	5	94,12	Não citotóxico
Blenda 50G:50AC	5	71,98	Não citotóxico
Blenda 75G:25AC	5	0,00	Não citotóxico

A não efetividade da goma arábica cationizada pode ser explicada pelo caráter aniônico da estrutura química, de acordo com o estudo reportado por De Almeida et al. (2022), que mesmo usando diferentes tempos e temperaturas de reação, alcançaram no máximo 12% do grau de substituição, sendo que o ideal é considerado acima de 20% (PRADO; MATULEWICZ, 2014). A presença dos grupos carboxílicos desprotonados presentes nos resíduos de ácido D-glucurônico da goma arábica garante ao polissacarídeo uma carga negativa, impedindo que a reação de cationização ocorra de maneira efetiva. A mesma interpretação foi discutida para o polissacarídeo kappa-carragenina cationizada previamente, que também não demonstrou efetividade contra bactérias e vírus (SANTINON; BEPPU; VIEIRA, 2022). Todos os polissacarídeos apresentaram alta viabilidade celular (> 85%), garantindo a não toxicidade do material mesmo após a modificação química.

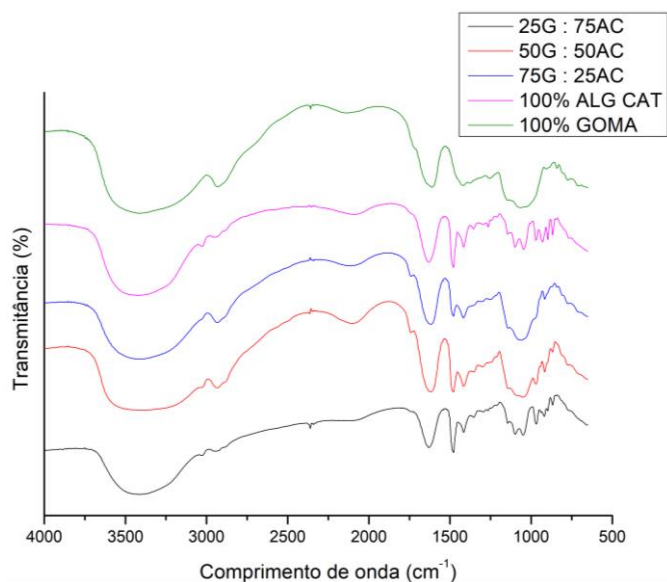
3.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros no infravermelho para as blendas de alginato de sódio cationizado e goma arábica foram representados na Figura 2. Todas as blendas apresentaram um pico na faixa de 3000 a 3500 cm^{-1} , referente ao grupo O-H característico de cada polissacarídeo, além do pico em torno de 2950 cm^{-1} para as ligações C-H. Ademais, também foi observada a presença de um pico acentuado em torno de 1625 cm^{-1} para todas as blendas e os biopolímeros puros, referente à ligação C=O do grupo carboxilato. Os vários

picos presentes na faixa de 1000 a 750 cm^{-1} estão relacionados também aos próprios grupos característicos desses polissacarídeos, tais como as ligações C-O.

Por fim, comparando aos dados descritos na literatura para o alginato de sódio e goma arábica não

Figura 2 - Espectro de FTIR das blendas de alginato de sódio cationizado (AC) e da goma arábica (G).



foram observados novos picos referentes às ligações C-H e C-N do composto quaternário de amônio nos valores de, respectivamente, 1480 cm^{-1} e 1430 cm^{-1} , que confirmam a cationização dos biopolímeros (ABU ELELLA et al., 2021; DE ALMEIDA et al., 2022; RONGHUA et al., 2003; DE SOUSA et al., 2020).

3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias das blendas de alginato de sódio cationizado e goma arábica, assim como as suas formas puras, foram representadas na Figura 3. Tanto o alginato de sódio quanto a goma arábica aparentaram manter a sua forma pura com cristais grandes, mesmo após a modificação química. Entretanto, o alginato apresentou um caráter cristalino mais rugoso em comparação à goma,

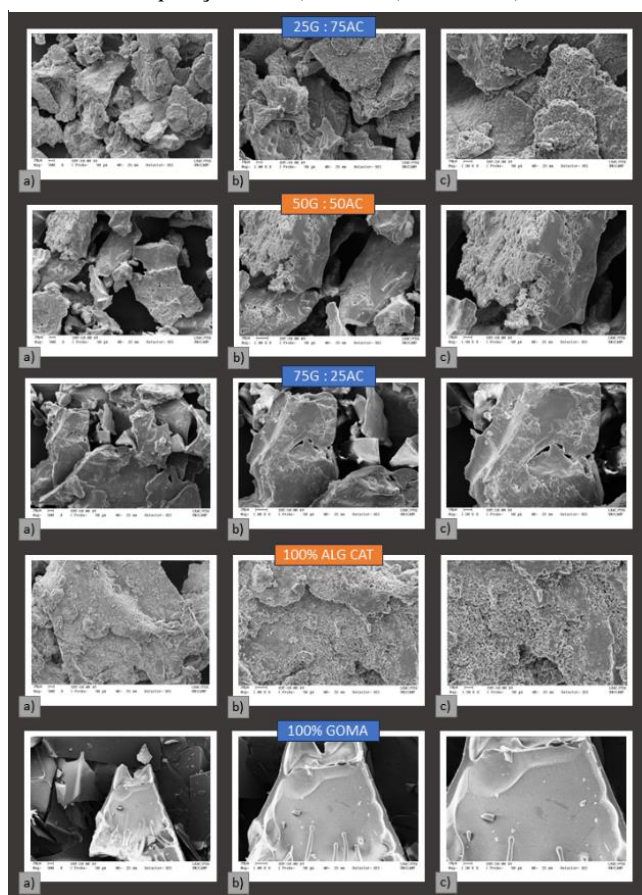
possivelmente por ter maior facilidade na formação de géis. Isso ocorre, posto que as unidades de ácido manurônico e gulurônico do alginato permitem a formação de várias zonas de junção (principalmente na presença de íons como o Ca^{2+}), formando uma rede tridimensional de gel complexa e irregular, e, conseqüentemente, gerando uma superfície mais rugosa. A goma arábica, por ser um polissacarídeo mais complexo e ramificado, apresenta uma menor capacidade de gelificação, formando géis menos estáveis e, portanto, cristais com superfícies mais lisas (ABKA-KHAJOUEI et al., 2022; ISOBE et al., 2020).

Em fontes como Abu Elella et al. (2021), verificou-se um resultado semelhante do MEV para o alginato de sódio; e em Ali et al. (2023), no MEV, também foram observadas características similares ao da goma arábica natural do atual projeto.

4. CONCLUSÃO

A cationização do biopolímero alginato de sódio foi realizada com sucesso, conforme foi verificado pelo FTIR realizado para todas as blendas. O alginato cationizado puro apresentou uma redução da carga viral de 96,84% e sem citotoxicidade às células L929. A mesma modificação não ocorreu de maneira satisfatória na goma arábica, o que pode ser atribuído ao seu perfil aniônico ou da sua forma de filme adquirida após a cationização. Para as blendas, verificou-se que, de acordo com o aumento da

Figura 3 - Micrografias das blendas de alginato de sódio (AC) e da goma arábica (G) após a etapa de cationização, sob ampliações de a) 500x; b) 1000x e c) 1500x.



quantidade de goma arábica e a redução da quantidade de alginato, houve uma queda na porcentagem de redução viral, sendo 94,12%, 71,98% e 0,00% para 25G:75AC, 50G:50AC e 75G:25AC, respectivamente. Todas as blendas estudadas não apresentaram citotoxicidade.

REFERÊNCIAS

- ABKA-KHAJOU EI, R., TOUNSI, L., SHAHABI, N., PATEL, A. K., ABDELKAFI, S., MICHAUD, P. Structures, Properties and Applications of Alginates. **Marine Drugs**, v. 20, p. 1-18, 2022.
- ABU ELELLA, M. H., ABDEL-AZIZ, M. M., ABD EL-GHANY, N. A. Synthesis of a high-performance antimicrobial O-quaternized alginate – A promising potential antimicrobial agent. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 55, p. 75-86, 2021.
- ALI, A., GANIE, S. A., MIR, T. A., MAZUMDAR, N. Synthesis, Characterization and Disinfection Efficiency Evaluation of Quaternary Ammonium Iodide Derivatives of Gum Arabic. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 31, p. 4210-4222, 2023.
- DE ALMEIDA, W. S., MARINHO FILHO, J. D., ARAÚJO, A. J., BARROS, A. B., & DA SILVA, D. A. Synthesis, characterization and biocompatibility of quaternized derivatives of gum arabic. **Materials Today Communications**, v. 33, 104611, 2022.
- DE SOUSA, A. K. A., RIBEIRO, F. O. S., DE OLIVEIRA, T. M., DE ARAÚJO, A. R., DIAS, J. DO N., ALBUQUERQUE, P., SILVA-PEREIRA, I., DE JESUS OLIVEIRA, A. C., QUELEMES, P. V., LEITE, J. R. S. A., & DA SILVA, D. A. Quaternization of angico gum and evaluation of anti-staphylococcal effect and toxicity of their derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 1175–1183, 2020.
- FLANJAK, L., LYPIROU, L., SAKKAS, V., ROSLEV, P. Ecotoxicity and rapid degradation of quaternary ammonium compounds (QACs) subjected to combined vacuum UV and UV-C treatment. **Chemosphere**, v. 346, 140584, 2023.
- ISOBE, N. et al. Primary structure of gum arabic and its dynamics at oil/water interface. **Carbohydrate Polymers**, v. 249, 116843, 2020.
- MAXMAQ. **Guia completo de desinfecção e sanitização: entenda as principais diferenças e aplicações**. Disponível em: <<https://maxmaq.com.br/blog/guia-desinfeccao-sanitizacao/>>. Acesso em: 13 jul. 2024.
- MOHAPATRA, S., XIAN, J. L. L., GALVEZ-RODRIGUEZ, A., EKANDE, O. S., DREWES, J. E., GIN, K. Y. H. Photochemical fate of quaternary ammonium compounds (CAQs) and degradation pathways prediction through computational analysis. **Journal of Hazardous Materials**, v. 465, 133483, 2024.
- OPAS/OMS | ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Folha informativa Covid-19 - Escritório da OPAS e da OMS no Brasil**, 2020. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/covid19>>. Acesso em: 20 de jan. de 2024.
- PRADO, H. J.; MATULEWICZ, M. C. Cationization of polysaccharides: A path to greener derivatives with many industrial applications. **European Polymer Journal**, Elsevier Ltd, 1 mar. 2014. Acesso em: 9 maio. 2021.
- RONGHUA, H., YUMIN, D., & JIANHONG, Y. Preparation and in vitro anticoagulant activities of alginate sulfate and its quaternized derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 52(1), p. 19–24, 2003.
- SANTINON, C.; BEPPU, M. M.; VIEIRA, M. G. A. Chemical modifications in the structure of seaweed polysaccharides as a viable antimicrobial application: A current overview and future perspectives. **Argal Research**, v. 66, 102796, 2022.
- SANTINON, C.; BEPPU, M. M.; VIEIRA, M. G. A. Optimization of kappa-carrageenan cationization using experimental design for model-drug release and investigation of biological properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 308, p. 120645, 15 maio 2023.