



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU**

ADRYELE RIBEIRO ARANTES

**QUATERNIZAÇÃO E ACETILAÇÃO DA GOMA DO CAJUEIRO: EFEITO
DO POSICIONAMENTO REACIONAL NAS PROPRIEDADES FÍSICO-
QUÍMICAS, HEMOCOMPATIBILIDADE E ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA**

PARNAÍBA – PIAUÍ

2022

ADRYELE RIBEIRO ARANTES

QUATERNIZAÇÃO E ACETILAÇÃO DA GOMA DO CAJUEIRO: EFEITO DO
POSICIONAMENTO REACIONAL NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS,
HEMOCOMPATIBILIDADE E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Delta do Parnaíba,
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof.^a Dr.^a. Durcilene Alves da
Silva

PARNAÍBA – PIAUÍ

2022

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Delta do Parnaíba
Biblioteca Central Prof. Cândido Athayde

A662q Arantes, Adryele Ribeiro
Quaternização e acetilação da goma do cajueiro: efeito do posicionamento reacional nas propriedades físico-químicas, hemocompatibilidade e atividade antibacteriana [recurso eletrônico] / Adryele Ribeiro Arantes – 2022

1 Arquivo em PDF.

Tese (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Delta do Parnaíba, 2022.

Orientação: Prof.^a Dr.^a Durcilene Alves da Silva

1. Quaternização. 2. Acetilação. 3. Polissacarídeos. I. Título.

CDD: 631.52

ADRYELE RIBEIRO ARANTES

QUATERNIZAÇÃO E ACETILAÇÃO DA GOMA DO CAJUEIRO: EFEITO DO
POSICIONAMENTO REACIONAL NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS,
HEMOCOMPATIBILIDADE E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: 30 /08 /2022

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Durcilene Alves da Silva
Presidente da Banca Examinadora (Orientadora)

Documento assinado digitalmente
 JEFFERSON ALMEIDA ROCHA
Data: 09/01/2023 22:47:52-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Jefferson Almeida Rocha
Examinador Interno ao Programa

Documento assinado digitalmente
 JHONES DO NASCIMENTO DIAS
Data: 21/12/2022 18:26:16-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Jhones N. Dias
Examinador Externo à Instituição

RESUMO

A goma do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) (GC) é um heteropolissacarídeo aniônico natural com potencial na indústria farmacêutica, alimentícia e aplicações biotecnológicas. Os derivados acetilados apresentam propriedades anfifílicas utilizadas para síntese de nanopartículas carreadoras de fármacos. Enquanto a quaternização melhora a solubilidade, e apresenta atividade antimicrobiana. Diante disso o presente trabalho, objetiva verificar o efeito das modificações por quaternização e acetilação em conjunto, nas propriedades físico-químicas da GC. A modificação da GC teve como reagentes o CCHPTA, NaOH e anidrido acético. Foram realizadas 4 rotas de modificações distintas, onde duas amostras foram modificadas com a ordem quaternização-acetilação e duas amostras com a ordem acetilação-quaternização gerando 4 derivados distintos. A caracterização foi realizada através de espectroscopia na região do infravermelho, massa molar, solubilidade em água, análise elementar, ressonância magnética nuclear (RMN) e microscopia de força atômica (MFA). Realizou-se ensaios hemocompatibilidade e atividade antibacteriana pelo método de contato. Através da espectroscopia de infravermelho foi possível confirmar a modificação das reações propostas, observando a inserção dos grupos funcionais metil de amônio quaternário e ao grupo éster carbonílico do grupo acetila. O RMN confirmou sinais referentes aos grupos acetil entre 1,8 e 2,5 ppm e em 3,1 ppm atribuídos ao N, N, N – trimetil do EPTAC inserido na cadeia. O aumento do percentual de carbono, hidrogênio e nitrogênio está relacionado diretamente com o grau de substituição das reações. A massa molar dos derivados aumentou comparando com GC. A inserção dos grupos funcionais proporcionou uma boa solubilidade aquosa. Uma possível auto-organização pôde ser observada pelo AFM, e também partículas de tamanhos maiores comparados com GC, GCQ (Goma do cajueiro quaternizada) e GCA (Goma do cajueiro acetilada). As modificações apresentaram hemocompatibilidade, quando comparados ao grupo controle. Através do teste de contato realizado com bactérias *S. aureus* e *E.coli* foi possível observar mudanças na atividade antibacteriana sobre a espécie *S. aureus* e *E.coli* quando comparada com a atividade da GC, GCA e GCQ. Ao realizar a inserção dos dois grupos funcionais com características distintas foi possível observar que a reação causada na cadeia do polímero trouxe novas características para o mesmo, onde apresentaram uma melhoria nas características de auto-organização das suas partículas.

Palavras-chave: Quaternização; Acetilação, Polissacarídeos.

ABSTRACT

Cashew gum (*Anacardium occidentale* L.) (CG) is a natural anionic heteropolysaccharide with potential in pharmaceutical, food and biotechnological applications. The acetylated results show amphiphilic properties used for the synthesis of drug nanoparticles. While quaternization improves solubility, it has antimicrobial activity. Therefore, the objective of this work is to verify the effect of the chemicals presented by the quaternization together, on the physical properties. As reagents, CCHPTA, NaOH and acetic anhydride were used. Four different programming routes were offered, where two samples were modified with one order of acetylation-combined and two combinations of differentiated acetylation generating 4 different combinations. The characterization was performed through infrared spectroscopy, molar mass, solubility, elemental analysis, nuclear magnetic resonance (NMR) and atomic force microscopy (AFM). Hemocompatibility and antibacterial activity assays were performed by the contact method. Through infrared spectroscopy it is possible to confirm the modification of the proposals, observing the location of the acetyl functional groups quaternary ammonium spectroscopy and the carbonyl group of the acetyl group. The NMR confirmed references to acetyl groups between 2.8 and 5 ppm and at 3.1 ppm attributed to the N, N, N - trimethyl of the EPTAC inserted in the chain. The increase in the percentage of carbon, hydrogen and is directly related to the degree of substitution. The molar mass of the results increased compared to CG. All of the groups developed a good solubility. A possible self-organization was observed by AFM, and also particles of larger sizes compared to CGQ and CGA. As compatible blood, when compared to the control group. Through the test of *S. aureus* and *E. coli* bacteria it was possible to observe changes in the antibacterial activity on the species *S. aureus* and *E. coli* when the contact with the activity of CG, CGA and CGQ was performed. When performing an insertion of the two functional groups with different characteristics, it was possible to observe that an approach of new polymer chains improved the organizational characteristics of their particles.

Keywords: Quaternization; Acetylation, Polysaccharides.7

LISTA DE ABREVIATURAS

- C** – Goma do cajueiro
- GCQ** – Goma do cajueiro quaternizada
- GCA** – Goma do cajueiro acetilada
- GCQ-A** – Goma do cajueiro quaternizada e acetilada
- GCA-Q** – Goma do cajueiro acetilada e quaternizada
- CPG** - Cromatografia de permeação em gel
- RMN** – Ressonância magnética nuclear
- GS**- Grau de substituição
- MFA** – Microscopia de força atômica
- PZ** – Potencial zeta
- PH** - Porcentagem de hemólise
- UFC**- Unidade formadora de colônia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore do <i>A. occidentale</i> L (A). Exsudato do cajueiro (B)	13
Figura 2. Esquema simplificado da reação de quaternização da goma de cajueiro.	14
Figura 3. Esquema simplificado da reação de acetilação da GC.....	16
Figura 4. Esquema para síntese da GC quaternizada e acetilada	18
Figura 5. Esquema para síntese da GC acetilada e quaternizada.	19
Figura 6. Espectro na região do infravermelho por transformada de Fourier.	25
Figura 7. Espectros de RMN ¹ H de GC.....	26
Figura 8. Espectro de RMN ¹ H. A: Grupo acetil; B: N,N,N – trimetil do EPTAC.....	26
Figura 9. Curvas de CPG para a GC e seus derivados modificados.	28
Figura 10. MFA das amostras: GC, GCQ e GCA.	30
Figura 11. MFA das amostras: GCQ-A1, GCQ-A2, GCA-Q1 e GCA-Q2.....	31
Figura 12. Gráfico de diâmetro médio das partículas.....	31
Figura 13. Hemocompatibilidade da GC e de seus derivados modificados	32

SUMÁRIO

RRESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	11
2.1. Objetivo geral	11
2.2. Objetivos específicos.....	11
3.1. Goma do cajueiro	12
3.2. Modificações químicas da goma de cajueiro por introdução de grupos funcionais.....	13
3.3. Reação de quaternização	14
3.4. Reação de acetilação	15
3.5. Gomas modificadas como agentes antimicrobianos	16
4. METODOLOGIA	17
4.1. Isolamento da GC.....	17
4.2. Síntese da GC quaternizada.....	17
4.3. Síntese da GC acetilada.....	17
4.4. Síntese da GC quaternizada e acetilada.....	18
4.5. Síntese da GC acetilada e quaternizada.....	19
4.6. Caracterização do polímero.....	20
4.7. Análise por microscopia de força atômica (MFA).....	21
4.8. Ensaio DE hemólise	22
4.9. Ensaio antimicrobiano	22
4.9.1. Atividade antibacteriana por contato direto e contagem de ufc.....	23
4.10. Análise estatística	23
5. Resultados.....	23
5.1. caracterizações	23
5.2. Análise por microscopia de força atômica (MFA).....	29
5.3. Ensaio hemólise	32
5.4. Atividade antibacteriana por contato direto e contagem de ufc	33
6. Conclusão.....	34
7. Referências	34

1. INTRODUÇÃO

A procura por substâncias ativas derivadas de produtos naturais tem sido uma das maiores aplicações econômicas das últimas décadas. Os avanços científicos envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais visam obter novos compostos e produtos derivados com propriedades terapêuticas (DOS SANTOS & ALMEIDA, 2016). Os produtos naturais comprometem o desenvolvimento de 50% dos novos medicamentos elaborados (NEWMAN et al., 2012).

O exsudato do caule da árvore *Anacardium occidentale* L., conhecido popularmente como goma de caju, é um produto natural obtido de forma sustentável e de baixo custo. O estudo das propriedades da goma do caju contribuiu para o valor agregado na produção dessa planta comercializada (RIBEIRO et al., 2016). A goma do cajueiro oferece aplicações nano e biotecnológicas devido as suas propriedades (QUELEMES et al., 2013; DIAS et al., 2016). Esta goma é um heteropolissacarídeo aniônico com capacidade de produzir suspensões viscosas e emulsificantes que podem ser usadas nas indústrias alimentícia e farmacêutica (KUMAR et al, 2012; PORTO & CRISTIANINI, 2014).

Os polissacarídeos, devido as suas características são utilizados de uma forma vasta e eficiente como agentes antimicrobianos, ganhando assim um maior interesse para estudos acadêmicos e industrial. A atividade biológica desses polissacarídeos depende da sua estrutura molecular: composição, tipo de ligação, grau de substituição, grau de ramificação e conformação estrutural das cadeias principais. Diante disso tem crescido a atenção sobre as técnicas de modificação molecular e a relação entre as atividades biológicas e estrutura dos polissacarídeos.

As modificações químicas nos polissacarídeos podem ser importantes instrumentos para aquisição de novos agentes antimicrobianos (COUTINHO, MUZITANO e COSTA, 2008). Estudos sugerem que os derivados dos polissacarídeos são biologicamente ativos, atribui-se isso a seus grupos hidroxila e à introdução de novos grupos substituintes como -SH, -COOH, -C-O- e NH₂, os quais podem mudar a estrutura dos polissacarídeos nativos e diminuir as ligações intramoleculares e intermoleculares (CHEN et al., 2014).

A modificação por quaternização com amônio quaternário da GC (GCQ) por Quelemes et al. (2017) comprova que a mesma apresenta características que a torna

candidata viável para o desenvolvimento de biomateriais e dispositivos biotecnológicos por apresentar atividade bactericida contra o gênero *Staphylococcus*.

Enquanto a acetilação do CG tem sido realizada com o objetivo de melhorar a estrutura para aplicação em sistemas nanoestruturados biodegradáveis. A acetilação empregando o anidrido acético como agente acilante altera as propriedades dessas substâncias como, por exemplo: polaridade, elasticidade, capacidade de absorção ou troca de íons, resistência a ataque microbiológico e térmico, isso muitas vezes propicia uma maior atividade biológica do composto acetilado (SILVA, 2014; DIAS ET AL., 2016). Diante disso essas modificações de polissacarídeos se torna uma área promissora para exploração de suas reações e propriedades biológicas para posterior aplicação biotecnológicas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito da inserção do grupo acetil e grupos de amônio quaternário nas propriedades físico-químicas, estruturais e biológicas da GC.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar processo de modificação por quaternização e acetilação da GC;
- Analisar a reação da inserção dos grupos acetil e amônio quaternário em rotas distintas de modificação;
- Caracterizar por métodos físico-químicos e estruturais: FTIR, massa molar, potencial Zeta, solubilidade e AFM;
- Avaliar atividade hemolítica e antimicrobiana dos derivados modificados da GC;

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. GOMA DO CAJUEIRO

As Anacardiaceae abrangem cerca de 81 gêneros e 800 espécies, distribuídos em ambientes secos a úmidos, concentrando-se principalmente em terras baixas nas regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo, se expandindo até as regiões temperadas (PELL, 2011). No Brasil essa família é representada por 14 gêneros, onde somente *Anacardium* é endêmico, e 53 espécies amplamente distribuídas no país, sendo 13 endêmicas. Para o Estado do Piauí estão registrados 09 gêneros e 12 espécies, das quais duas espécies pertencem a *Anacardium* (*A. occidentale* e *A. humile*) (SILVA-LUIZ; PIRANI 2015).

A. occidentale L (Figura 1A), conhecida popularmente como cajueiro, é uma árvore tropical indígena do Brasil, amplamente cultivada em outros lugares tropicais, especialmente na Índia (RAZALI, 2008). É uma planta de ampla distribuição no território brasileiro, estudos tem considerado essa espécie como originária do Brasil por características como: distribuição geográfica e comportamento ecológico, com disseminação por quase todo o país (BARROS, 2002).

Essa planta apresenta um exsudato (Figura 1B) que consiste em um heteropolissacarídeo aniônico com capacidade de formar suspensões viscosas e emulsificantes, e facilmente solúvel em água (PAULA, 1998). Pode ser utilizada na área de alimentos como estabilizantes de sucos e doces, e na área da saúde tem grande importância como observado em estudos com atividade antimicrobiana (COSTA, et.al., 2012). O exsudato gomoso é secretado como resposta a injúrias em nível de caule (ACOSTA, 2013).

O exsudato do caule da árvore *A. occidentale* L., de onde é extraído a GC, é um produto natural extraído de forma sustentável e de baixo custo. O estudo das propriedades do GC contribuiu para o valor agregado na produção dessa planta comercializada (CUNHA, PAULA & FEITOSA, 2009; RIBEIRO et al., 2016). O exsudato do cajueiro, é composto principalmente de β -D-galactose (72%), seguida de α -D-glicose (14%), arabinose (4,6%), ramnose (3,2%) e ácido glucurônico (4,6%). Sua cadeia principal contém unidades de galactose unidas por elos do tipo β (1 \rightarrow 3) e na cadeia lateral β (1 \rightarrow 6); proteínas; minerais: nitrogênio, zinco, níquel, manganês, cobre, ferro, cádmio, potássio, alumínio e silício (OFORI-KWAKYE et al. 2010; OKOJIE et al. 2010).



Figura 1. Árvore do *A. occidentale* L (A). Exsudato do cajueiro (B)

Fonte: autoria própria (2021).

Estudos sobre as atividades biológicas da GC apresentaram atividade antimicrobiana (CAMPOS et al., 2012), efeitos curativos (SCHIRATO et al., 2006), propriedades antidiarréicas (ARAÚJO et al. 2015) e gastroprotetoras (CARVALHO et al., 2015). O uso de polissacarídeos vem ganhando destaque nos estudos biotecnológicos devido ao seu baixo custo, biodegradabilidade e baixa toxicidade (RAVEENDRAN et al., 2013). Eles apresentam uma ampla escala de propriedades funcionais e estão desenvolvendo inúmeras aplicações em alimentos, têxteis tintas, cosméticos e produtos farmacêuticos (GERESH et al., 2000).

Estruturalmente os polissacarídeos são compostos de múltiplas unidades de sacarídeos ligados uma à outra através de ligações glicosídicas e possuem características que os diferenciam das outras famílias de biopolímeros (DUMITRIU, 2004). Eles podem apresentar-se na forma neutra, como a goma guar, a celulose e o amido ou como polissacarídeo aniônico como os alginatos, a carragenana, a gelana, xantana, caraia e a GC.

3.2. MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DA GOMA DE CAJUEIRO POR INTRODUÇÃO DE GRUPOS FUNCIONAIS

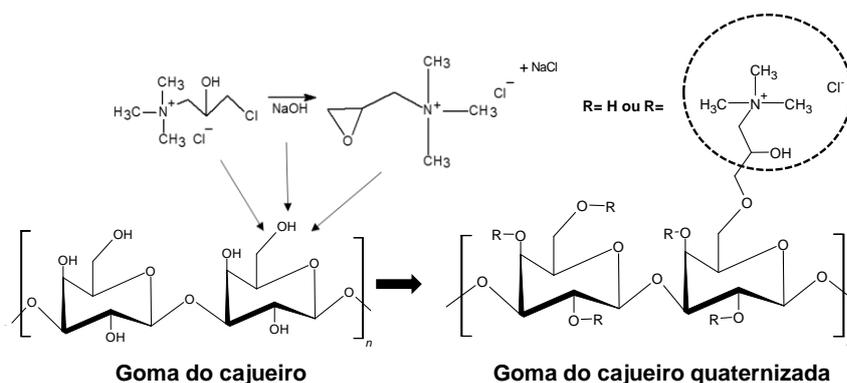
Em 1994 Ebringerovh et al. já relatava a necessidade de aumentar a eficácia da utilização de biomassas e de novos polímeros biodegradáveis, através da modificação para adicionar ou modificar a funcionalidade do mesmo. Os polissacarídeos possuem um grande número de grupos reativos (hidroxil e acetoamino), os quais permitem diferentes rotas de modificações químicas na

estrutura deste polímero pela introdução de novos grupos funcionais usando carboximetilação (SILVA et al., 2004); oxidação (CUNHA, MACIEL, SIERAKOWSKI, DE PAULA E FEITOSA, 2007), sulfatação (NETO, MACIEL, CUNHA, DE PAULA E FEITOSA, 2011) e acetilação (PITOMBEIRA et al., 2015), quaternização (QUELEMES et al., 2017) realizadas para obter novas características físico-químicas.

3.3. REAÇÃO DE QUATERNIZAÇÃO

A reação de quaternização (Figura 2) é caracterizada por substituição nucleofílica sobre o grupo hidroxila da unidade monossacarídica pelo reagente amônio quaternário (Figura 2). Essa reação pode ser explicada do seguinte modo, segundo Yu, Huang, Ying, & Xiao (2007): o NaOH reage com os grupos hidroxilas da GC produzindo grupos alcóxidos; grupos epóxidos também são produzidos a partir do CCHPTA pela aplicação estequiométrica da base; a GC quaternizada (GCQ) é então formada por meio da reação entre a GC alcóxida com o epóxido ou o CCHPTA. As substituições na goma de cajueiro ocorrem mais comumente no C-6 da estrutura da goma (RIBEIRO et al., 2016).

Figura 2. Esquema simplificado da reação de quaternização da goma de cajueiro.



Fonte: Autoria própria (2022).

O amônio quaternário contém compostos carregados positivamente suportando quatro ligações, tendendo a ser solúvel em água e bastante estável, originando uma vasta variação de aplicações como: potencial carreamento de genes

(SONG et al., 2008), ação floculante (PAL, MAL e SIGH, 2007; PAL et al., 2009; SINGH, PAL e ALI, 2014), e atividade antibacteriana (YU et al., 2007; NICHIFOR et al., 2010; HU e WANG, 2016). Sendo assim a quaternização apresenta alterações nas características físico-químicas e propriedades biológicas da GC, gerando um aumento em sua atividade antimicrobiana, e apresentando também biocompatibilidade de eritrócitos, queratinócitos e fibroblastos (QUELEMES et al., 2017).

3.4. REAÇÃO DE ACETILAÇÃO

O grupo acetil é um dos mais comuns dentre os vários grupos protetores usados na proteção de hidroxilas em razão da sua estabilidade em condições reacionais ácidas e por ser de fácil remoção por hidrólise alcalina branda. A combinação mais simples de reagentes utilizados em acetilação emprega anidrido acético na presença de um catalisador ácido ou básico (PEARSON, 1999), podendo-se também empregar ácidos carboxílicos e cloretos de ácido (OTERA, 2003). A acetilação é utilizada para converter moléculas com baixo grau de complexidade em moléculas com maior grau de complexidade estrutural (ALMEIDA; CALADO; BARRETO, 2005)

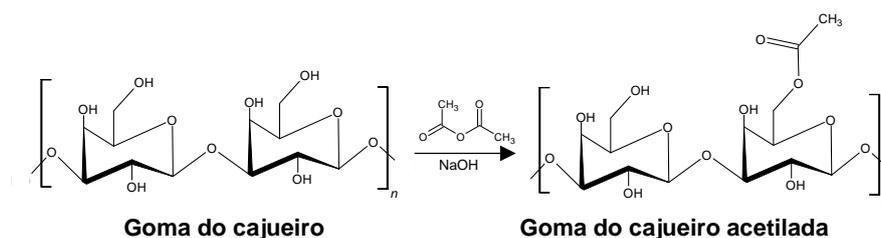
A modificação química de açúcares por meio da reação de acetilação utilizando o anidrido acético como agente acilante altera as propriedades dessas substâncias como, por exemplo: polaridade, elasticidade, capacidade de absorção ou troca de íons, resistência a ataque microbiológico e térmico, isso muitas vezes propicia uma maior atividade biológica do composto acetilado (SILVA, 2014). Na reação de acetilação, destacam-se três elementos: o polissacarídeo, o anidrido acético e o catalisador que pode ser a piridina (XU et al., 2010), a iodina (REN et al., 2007), o ácido perclórico e o ácido sulfúrico (CHENG et al., 2009; HU et al., 2011), a 4-dimetilaminopiridina (4-DMAP) e a N-bromosuccinimida (NBS). A piridina demonstra bons resultados nas reações, porem além de apresentar odor desagradável, apresenta toxicidade não se adequando para ser implementada em larga escala. Por outro lado, a 4-DMAP é excessivamente cara o que dificulta seu uso a nível industrial. Diante disso, tem sido reportada a N-bromosuccinimida (NBS) como um novo e altamente efetivo catalisador para acetilação de uma longa variedade de alcoóis com anidrido acético em condições suaves e existindo evidências de que a

NBS pode ser usada em reações de acetilação em polissacarídeos (ZHANG et al., 2014).

O uso de anidridos de ácidos carboxílicos (alifáticos ou cíclicos) é uma alternativa interessante, visto que evita muitas vezes o uso de solventes ou solventes menos agressivos como o método via cloreto de ácidos, ou seja, os anidridos podem ser utilizados nas funções de reagente e solvente, quando líquidos; quando sólidos necessitam de ser dissolvidos (SANTOS, 2015).

Reações livres de solventes utilizando apenas NaOH e anidrido acético. Devido à alcalinidade do NaOH, ocorre um enfraquecimento das ligações de hidrogênio intermoleculares, o que cria um inchaço, o que permite uma maior acessibilidade à estrutura do polímero, aumentando a área superficial e diminuindo o grau de polimerização (RODRIGUES, JACKSON & MONTROSS, 2016). Facilitando assim a reação de acilação entre os hidroxilos reativos da GC e o anidrido acético (SILVA et al, 2019) (Figura 3).

Figura 3. Esquema simplificado da reação de acetilação da GC.



Fonte: Autoria própria (2022).

3.5. GOMAS MODIFICADAS COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS

A maioria das paredes celulares de bactérias gram-negativas e bactérias gram-positivas contêm vários lipopolissacarídeos carregados negativamente os quais desempenham papéis importantes para sua sobrevivência. O mecanismo da ação bactericida dos biocidas polications envolve interação destrutiva com a parede celular e/ou membranas citoplasmáticas (Kenawy et al., 2002). No caso de polímeros biocidas, geralmente toda a macromolécula é bioativa, pois as unidades repetidas são construídas de grupos catiônicos antimicrobianos, como amônio quaternário, fosfônio, sulfônio e guanidínio.

As interações desses polímeros com as paredes celulares microbianas carregadas negativamente resultam na desestabilização das células dos

microrganismos. Essa interação pode ocorrer de três maneiras diferentes: por simples atração de cargas opostas; mediante a interação de cargas opostas juntamente com a penetração do polímero antibacteriano camada por camada, e pela interação de cargas opostas com ruptura completa da membrana, (Kyziol et al., 2020).

4. METODOLOGIA

4.1. ISOLAMENTO DA GC

O isolamento da GC foi realizado de acordo com Rodrigues (1998), em que 10 g do exsudato foram deixadas em agitação com 100 ml de água Mili-Q durante 24 h. Logo após este período foi adicionado 2g de NaCl e solução de NaOH para ajustar o pH para 7,0. A seguir 300 mL de etanol foi adicionado e a solução foi mantida na geladeira durante 24h. O precipitado formado é lavado com etanol e a seguir com acetona e seco sob fluxo de ar quente constante.

4.2. SÍNTESE DA GC QUATERNIZADA

Para a reação de quaternização foi seguida a metodologia proposta por Quelemes et al. (2017). A goma do cajueiro (1g) foi dissolvido em água destilada (1,5 mL) à temperatura ambiente, e deixada sobre agitação constante por 30 minutos até uma pasta homogênea ser formada. Uma outra solução contendo amônio quaternário (Cloreto de 3-cloro-2-hidroxiopropil trimetil amônio - CCHPTA) e NaOH 5 mols/L foi preparada e adicionada a solução contendo a goma do cajueiro solubilizada, em uma proporção molar de Goma/ CCHPTA /NaOH – 1/6/6, com posterior agitação por mais 30 minutos. A reação foi conduzida a temperatura de 50°C por 14h em banho-maria. Após este período ácido clorídrico (HCl) 1 mol/L diluído foi adicionado para baixar o pH a 5,5, ao adicionar HCl na mistura a reação de auto ionização não continuará, visto que o meio alcalino é essencial para realizar a reação (Pal et al. 2008). Sendo, em seguida o produto reacional, dialisado (4 a 5 dias). Após a diálise o polímero foi precipitado em acetona na proporção de 1:4 (solução: acetona), armazenada por 24 h para efetiva precipitação e seca sob fluxo de ar quente.

4.3. SÍNTESE DA GC ACETILADA

Porções acetil foram quimicamente introduzidas no polissacarídeo CG usando uma adaptação da metodologia proposta por Silva et al. (2019). 1g de CG foi suspenso em 8 mL de anidrido acético e agitado por 5 min. Em seguida, 6 mL de uma

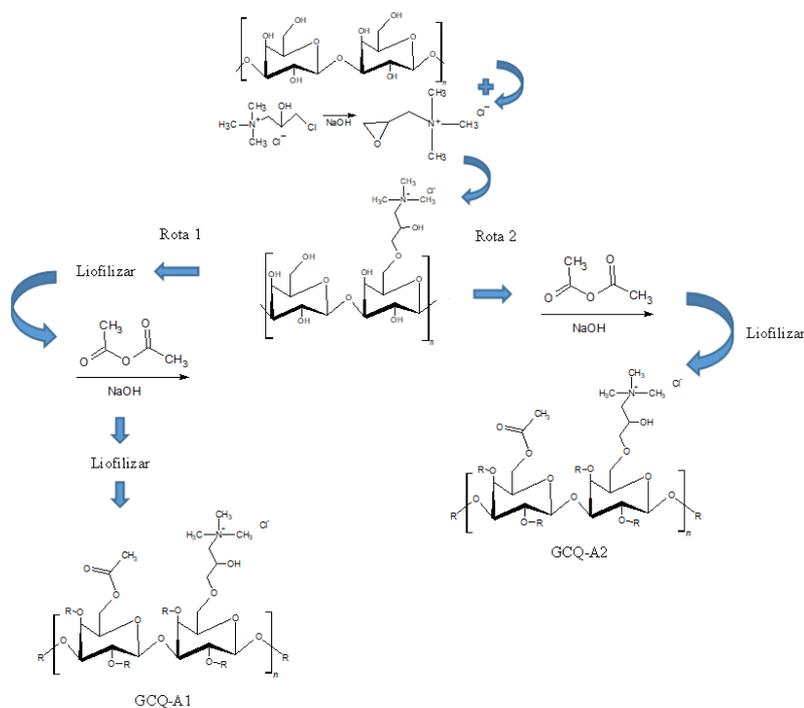
solução aquosa de NaOH a 50% foi adicionado sob agitação contínua. A mistura foi agitada durante 3 horas a 90 °C. A suspensão obtida como produto de reação foi dialisada por 48 h, após o qual foi congelada e liofilizada.

4.4. SÍNTESE DA GC QUATERNIZADA E ACETILADA

Para a síntese da GC quaternizada e acetilada foram seguidas duas rotas de modificações (Figura 4), onde primeiramente a goma do cajueiro isolada passou pelo processo de quaternização utilizando o CCHPTA. Para a execução da rota de modificação 1, a goma do cajueiro previamente quaternizada passou pelo processo de secagem, sendo necessário a solubilização dessa mesma para o início do processo de acetilação realizada utilizando NaOH 5 mol/L e anidrido acético, a suspensão obtida como produto da reação

foi dialisada por 48 h, após o qual foi congelada e liofilizada, obtendo-se a goma do cajueiro quaternizada e acetilada 1 (GCQ-A1).

Figura 4. Esquema para síntese da GC quaternizada e acetilada

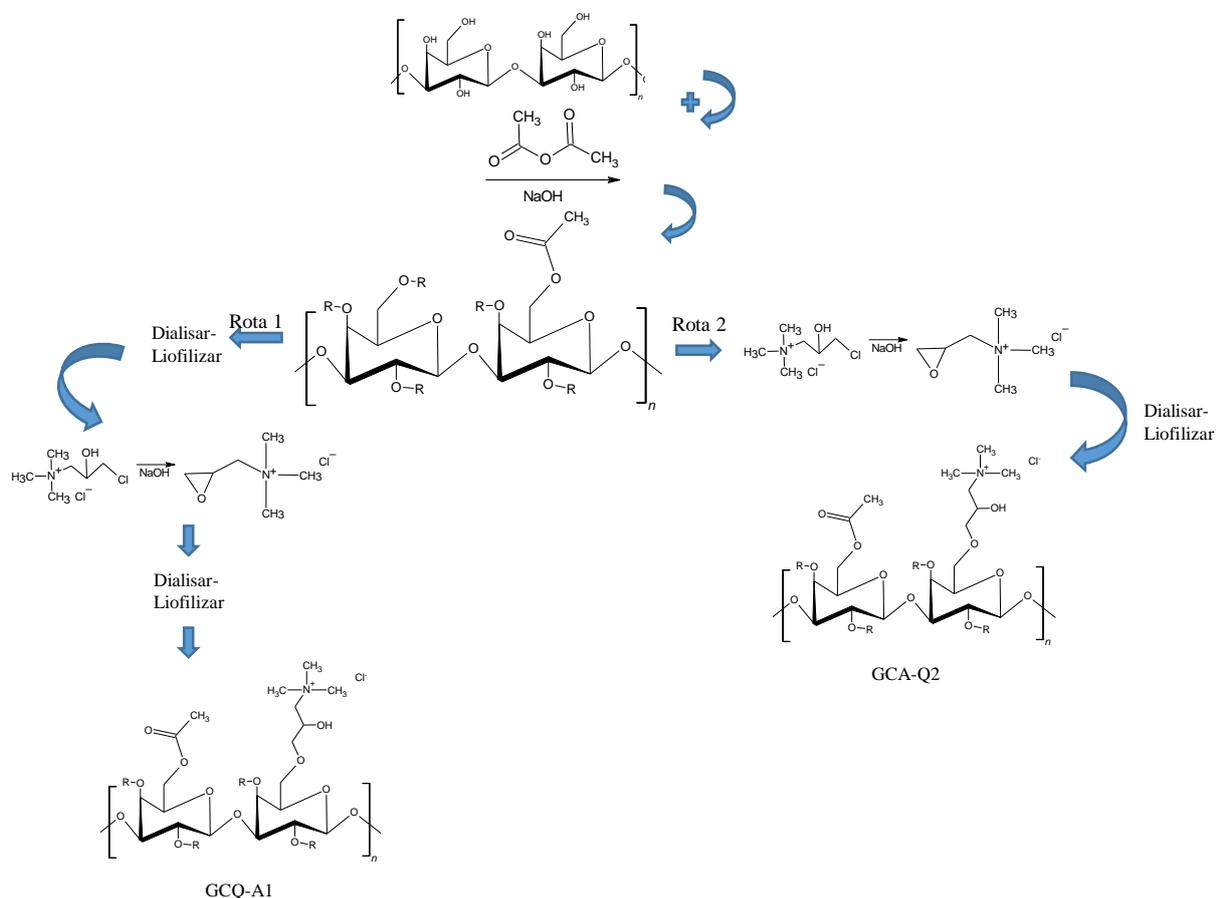


A rota de modificação 2 foi realizada sem que a goma previamente quaternizada fosse liofilizada, sendo o processo de acetilação realizado logo em seguida. A suspensão obtida como produto da reação foi dialisada por 48 h, após o qual foi congelada e liofilizada, obtendo-se a GC quaternizada e acetilada 2 (GCQ-A2).

4.5. SÍNTESE DA GC ACETILADA E QUATERNIZADA

Para a síntese da GC acetilada e quaternizada foram seguidas duas rotas de modificações (Figura 5), onde primeiramente a GC isolada passou pelo processo de acetilação realizada utilizando NaOH 5 mol/L e anidrido acético, para em seguida realizar as rotas de modificações sugeridas. Para a execução da rota de modificação 1, a GC previamente acetilada passou pelo processo de secagem, sendo necessário a solubilização dessa mesma para o início do processo de quaternização utilizando o Cloreto de (3-Cloro-2-hidroxipropil) trimetilamônio – (CCHPTA) e NaOH 5 mol/L, a suspensão obtida como produto da reação foi dialisada por 48 h, após o qual foi congelada e liofilizada, obtendo-se a GC acetilada e quaternizada 1 (GCA-Q1).

Figura 5. Esquema para síntese da GC acetilada e quaternizada.



A rota de modificação 2 foi realizada sem que o processo de liofilização da goma previamente acetilada fosse realizado, sendo assim o processo de quaternização realizado logo em seguida. A suspensão obtida como produto da reação foi dialisada por 48 h, após o qual foi congelada e liofilizada, obtendo-se a GC acetilada e quaternizada 2 (GCA-Q2).

4.6. CARACTERIZAÇÃO DO POLÍMERO

Medidas de espectro na região de infravermelho foram realizadas utilizando um espectrômetro de infravermelho por transformada de Forrier (Nicolet iS5 - iD7 ATR - Thermo Fisher Scientific) utilizando-se a técnica de reflexão total atenuada, com espectro variando de 4000 a 550 cm^{-1} . As medições do potencial zeta (mV) foram realizadas usando uma solução aquosa de 10 mg/mL, analisada pelo dispositivo Malvern Zetasizer Nano ZS90.

Para obtenção dos espectros de RMN ^1H , os derivados modificados foram dissolvidos em uma mistura de D₂O (0,4 mL) e acetona-d₆ (0,3 mL). Os espectros foram obtidos no espectrômetro de RMN Agilent a 400 MHz a 50 °C. O sinal HDO foi usado como referência. O sinal foi deconvoluído e as integrações foram computadas de acordo com o protocolo GSD (BERNSTEIN et al., 2013), utilizando o software Mnova 14.2.0. O grau de substituição (GS) dos grupos acetil foi calculado conforme proposto por Pitombeira et al (2015). O valor DS é dado pela equação 1 onde A é a área integral de prótons acetil em 1,8-2,4 ppm e B é o valor integral para os prótons polissacarídeos OH e H-1 a H-6 observado de 3,0 – 5,0 ppm.

$$GS = \frac{10A}{(3B + A)} \quad (Eq. 1)$$

A composição elementar dos derivados modificados da CG foi obtida através de análise elementar usando um Perkin Elmer 2400 Series II CHN com detector de condutividade térmica. O grau de substituição (GS) dos derivados GC foi obtido pela porcentagem de nitrogênio utilizando a Eq. 2 (Huang, Yu, & Xiao, 2007; Banerjee et al., 2013). O GS foi determinado como o número de grupos hidroxilas substituídas por unidade de açúcar da GC, onde N é a quantidade de nitrogênio (%) determinada por análise elementar.

$$GS = \frac{162,2 * N(\%)}{1400 - 151,5 * N(\%)} \quad (\text{Eq. 2})$$

A distribuição de massa molar foi determinada por cromatografia de permeação em gel (CPG) em equipamento Shimadzu LC-20AD acoplado a um detector de índice de refração (RID-10A). Para a análise utilizou-se coluna polysep linear, 300×7,8 mm, utilizando NaNO₃(aq) 0,1 mol/L como eluente. A medida foi feita a 30°C, com fluxo de 1mL/min e o volume injetado da amostra foi de 50 µL. Utilizando padrões de Pululana (P-82, Shodex) e a seguinte curva da Eq. 3.

$$\text{Log } M = 14,52278 - 1,16825 * Ve. \quad (\text{Eq. 3})$$

A solubilidade dos polissacarídeos foi determinada a temperatura ambiente 29 °C (+3°C), adaptado de Leal et al (2014). A determinação da solubilidade foi efetuada pela adição de 20 mg de polissacarídeo e 1 ml de água destilada em tubos previamente pesados. A suspensão foi homogeneizada por 12 horas, centrifugada a 10.000 rpm durante 10 min, e separado o precipitado, depois secado em centrifuga a vácuo. Após a secagem realizou-se a pesagem e verificou-se o valor da massa solúvel através da Eq. 4.

$$\text{Massa solúvel} = \text{massa da amostra (mg)} - \text{massa do precipitado (mg)} \quad (\text{Eq. 4.})$$

A porcentagem de solubilidade foi determinada de acordo com a equação 5:

$$\text{Solubilidade} = \frac{\text{Massa do polissacrideo solubilizado}}{\text{Massa inicial do polissacarideo}} \times 100 \quad (\text{Eq. 5.})$$

4.7. ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)

As amostras foram preparadas na concentração de 5 mg/mL e deixadas em banho ultrassônico por 30 minutos. Posteriormente foi retirada uma alíquota de 10 µL de cada amostra e depositada em uma superfície de mica, em seguida foi deixada por

15 minutos em uma estufa a uma temperatura de 36 °C, para a secagem e realização da análise. O equipamento utilizado para a análise foi o TT-AFM (AFM Workshop - EUA) no modo contato intermitente, utilizando as pontas de Si da TED PELLA (TAP300-G10) em uma frequência de amplitude de 247,21 kHz. O programa Gwyddion 2.45, foi utilizado para tratar as imagens e obter o tamanho (nanômetros) das partículas. A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada no programa GraphPad Prism 6, bem como obter histogramas de tamanho das nanopartículas.

4.8. ENSAIO DE HEMÓLISE

A atividade hemolítica da GC e dos derivados modificados foram testadas utilizando eritrócitos humanos (hemácias), coletados em EDTA (1,8 mg/mL), lavados três vezes e ressuspensos em solução salina estéril (0,9%), como descrito por Sahariah et al. (2015). Para o teste foi utilizado a porção solúvel obtida de cada amostra após o teste de solubilidade. A correção da concentração da solução foi ajustada para iniciar o teste na concentração 2000 a 31,25 µg/mL. Triton-X (0,1% v/v) e solução salina foram usados como controles de hemólise positivo e negativo, respectivamente. As misturas foram incubadas por 1 h a 37°C e centrifugadas a 10.000g por 1 min. O valor de absorvância do sobrenadante (A) foi medido a um comprimento de onda de 492 nm, sob leitura espectrofotométrica. A porcentagem de hemólise (PH) foi calculada utilizando-se a fórmula a seguir (Eq. 6):

$$PH = \frac{(A_{Goma} - A_{salina})}{(A_{Triton} - A_{salina})} \times 100; (Eq. 6)$$

4.9. ENSAIO ANTIMICROBIANO

Foi avaliada a atividade antimicrobiana da GC e seus derivados modificados sobre bactérias, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Para a realização dos experimentos, as estirpes foram previamente semeadas em placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton, sendo essas, incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a uma temperatura de 35 ± 2 °C, em condições aeróbicas. Após 24 horas, colônias isoladas foram coletadas com alça de platina e suspensas em solução salina estéril [NaCl 0,85% (p/v)], até que se obtivesse uma absorvância variando entre 0,08 a 0,13 monitorando o comprimento de onda de 625 nm, o que corresponde a 0,5 na escala de McFarland (aproximadamente 1-2×10⁸ UFC/mL). Em

seguida, esta suspensão foi diluída em meio de cultura para preparação do inoculo com concentração bacteriana de 5×10^5 UFC/mL,

4.9.1. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA POR CONTATO DIRETO E CONTAGEM DE UFC

A atividade antibacteriana da goma do cajueiro e dos seus derivados modificados foi examinada por ensaio de contato direto e contagem de UFC (LI et al, 2020). Cada amostra de goma (1mg) foi imergida em 1,5 mL de suspensão bacteriana descrita anteriormente (5×10^5 UFC mL⁻¹). Em seguida, todos os meios foram incubados em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Uma suspensão bacteriana sem goma foi usada como controle para cada bactéria. Após 24 h, as suspensões bacterianas foram diluídas com solução salina (0,85%) e inoculadas (100 μL) em placas de ágar Mueller-Hinton com alça de drigalski. A contagem de UFC bacteriana foi realizada após 24 h de incubação, e o efeito bactericida foi calculado em relação ao controle. (Eq. 7).

$$\text{Efeito Inibitório} = [(UFC_1 - UFC_2)/UFC_1] \times 100 \quad (\text{Eq.7})$$

UFC_1 e UFC_2 representam unidades formadoras de colônias de controle e das amostras, respectivamente.

4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram analisados pelo teste de Turkey ANOVA, considerado estatisticamente significativo quando valor de $p < 0,05$. Os resultados foram expressos em média e \pm desvio padrão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÕES

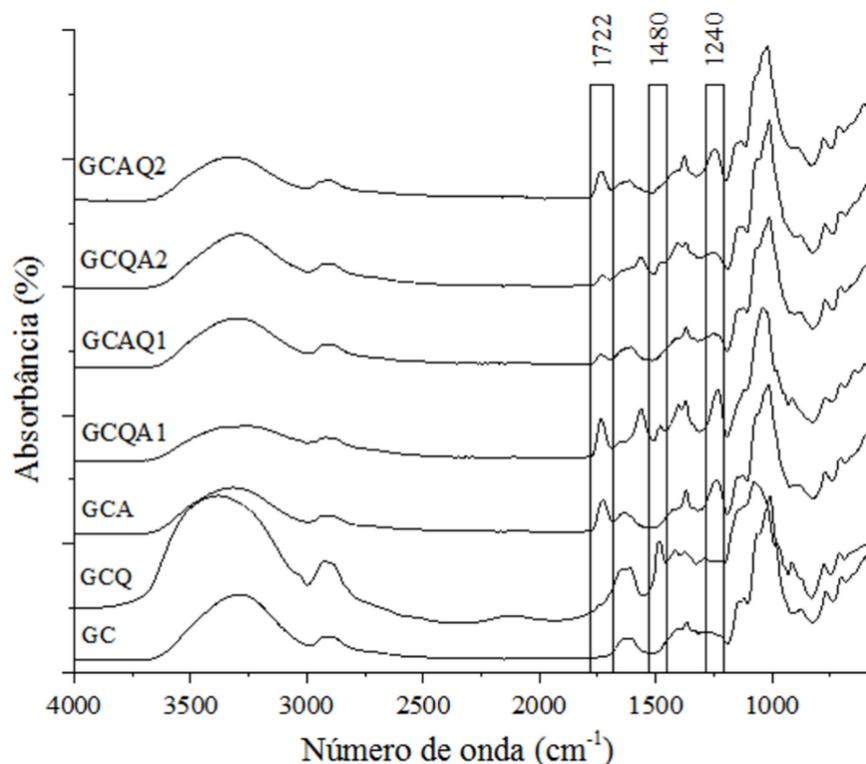
A reação de quaternização e acetilação de polissacarídeos possuem o mesmo alvo comum, a substituição nucleofílica das hidroxilas disponíveis ao longo da cadeia polimérica. Na rota escolhida de quaternização, tem-se como agente eterificante o reagente CCHPTA, em meio basico. O NaOH reage com os grupos hidroxilas da GC produzindo grupos alcóxidos, sendo também produzidos grupos epóxidos a partir do CCHPTA pela aplicação estequiométrica da base o produto quaternizado GCQ è

formado então por meio da reação entre a GC alcóxida com o epóxido ou o CCHPTA (figura 4) (YU et al, 2007).

Para o processo de acetilação a GC foi submetida a uma modificação química, através da inserção do grupo acetil em sua estrutura em um processo sem o uso de solventes, usando apenas NaOH e anidrido acético. Devido a alcalinidade do NaOH, acontece um enfraquecimento das ligações de hidrogênio intermoleculares, gerando uma dilatação, o que permite maior acessibilidade à estrutura do polímero, aumentando a área de superfície e diminuindo o grau de polimerização (RODRIGUES, JACKSON, & MONTROSS, 2016). Facilitando assim a reação de acilação entre as hidroxilas reativas da goma e o anidrido acético (SILVA et al, 2019).

Através da análise de espectro na região do infravermelho (Figura 6) para a goma do cajueiro foi possível observar bandas na região de 3400 cm^{-1} e em 2920 cm^{-1} características respectivamente de grupos O-H e C-H, e adicionalmente bandas em 1030 , 1080 e 1150 cm^{-1} atribuídas às vibrações de alongamento de C-O-C de ligações glicosídicas e ligações de O H de álcoois (QUELEMES, 2017; PITOMBEIRA, 2015). Os produtos da reação de quaternização nas amostras GCQ, GCQ-A1 e GCQ-A2, apresentaram banda em torno de 1480 cm^{-1} , correspondente a deslocamento de ligações C-H simétricas (relativo aos grupos metil de amônio quaternário). Uma banda discreta no 1407 cm^{-1} região do modo de alongamento vibracional das ligações C-N também é visível, o que pode ser atribuído a indicação de modificação estrutural pelo CCHPTA (RIBEIRO, 2020). As bandas em 1240 cm^{-1} (devido à vibração de estiramento C-O) e 1722 cm^{-1} (atribuídas a C=O), são encontrados nas amostras GCA, GCQ-A1, GCA-Q1, GCQ-A2 e GCA-Q2 atribuem-se ao grupo éster carbonílico do grupo acetila (RIBEIRO, 2017).

Figura 6. Espectro na região do infravermelho por transformada de Fourier.



Legenda: Espectros FTIR da GC, GCQ, GCA, GCQ-A1, GCQ-A2, GCA-Q1 e GCA-Q2.

Os espectros de RMN ^1H para GC (figura 7) e seus derivados modificados encontram-se representados na figura 8. Os deslocamentos em 3,5 a 4,0 ppm correspondem a H-2 a H-5. Os sinais em 4,3 e 4,8 indicam o H-1 da galactose e ramnose, respectivamente. A região de deslocamento químico de 4,6 para 5,0 refere-se aos prótons anoméricos (VASCONCELOS SILVA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019). Os espectros dos 4 modificados da GC apresentaram sinais entre 1,8 e 2,5 ppm os quais estão relacionados ao grupo acetil inserido na cadeia do polissacarídeo. Os sinais 3,0 e 5,5 ppm são característicos dos prótons H-1 a H-6 presentes no polissacarídeo. Foram destacados também sinais em 3,1 ppm atribuídos ao N, N, N – trimetil do EPTAC inserido na cadeia (Pitombeira, 2015; Quelemes, 2017; Silva, 2018; Jin, 2022).

Figura 7. Espectros de RMN 1H de GC.

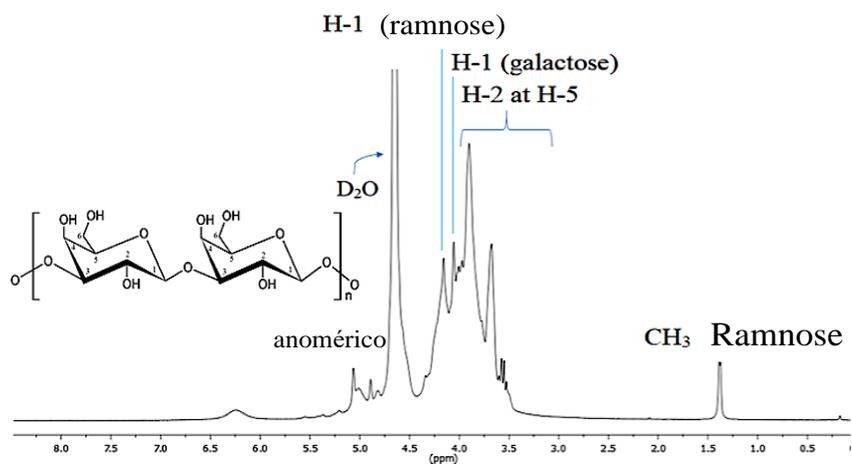
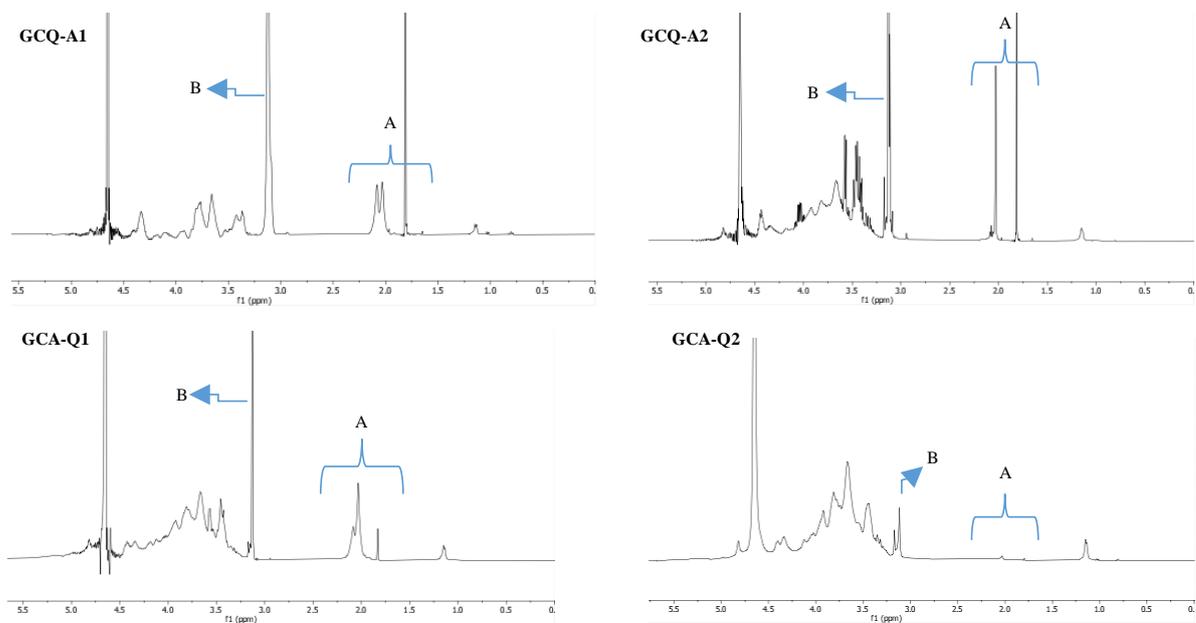


Figura 8. Espectro de RMN 1H.



Legenda: **A:** Grupo acetil; **B:** N,N,N – trimetil do EPTAC

Na análise elementar foi possível observar um acréscimo nas razões C/H devido a inserção do grupo acetil, o aumento da porcentagem de nitrogênio nas gomas modificadas está relacionado a incorporação do grupo de amônio quaternários. O aumento do percentual de carbono, hidrogênio e nitrogênio está relacionado diretamente com o grau de substituição das reações (Quelemes, 2017). (Tabela 1).

Aplicando as equações 1 e 2 o grau de substituição para o grupo quaternário foi calculado por análise elementar e RMN ^1H (Tabela 1). O maior grau de substituição foi obtido na modificação GCQ-A1 0,38 (N%) e 0,48 (^1H). Para a substituição por N% que está relacionada a inserção do grupo de amônio quaternário os valores do GS aparecem próximos aos encontrados em trabalhos com polissacarídeos modificados por agentes quaternizantes (Quelemes, 2017; Ribeiro, 2020; de Sousa, 2020).

Tabela 1. Dados de análise elementar e valores de grau de substituição

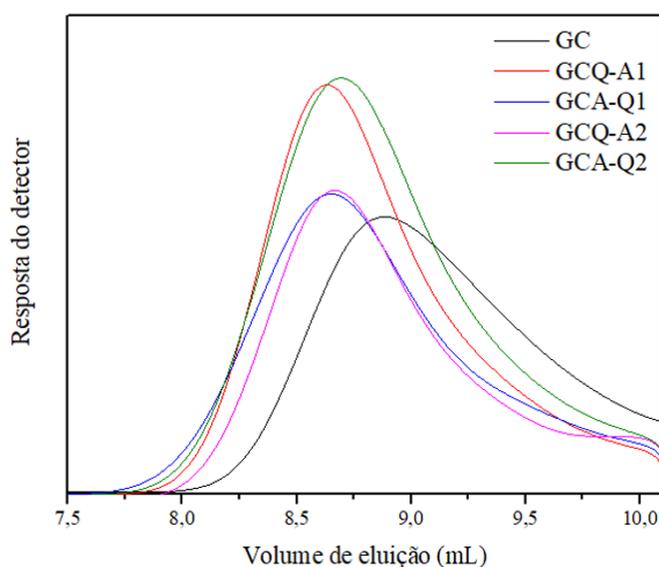
Amostra	Análise elementar (%)			GS	GS
	C	H	N	Grupo quaternário (N%)	Grupo acetil (^1H)
GC	37,75	6,13	0,07	-	-
GCQ-A1	39,28	7,89	2,46	0,38	0,48
GCQ-A2	39,74	8,18	2,49	0,39	0,14
GCA-Q1	39	6,85	0,57	0,07	0,03
GCA-Q2	39,49	6,68	0,89	0,11	0,22

Os valores do GS obtidos por ^1H para a acetilação apresenta valores mais brandos que os valores encontrados na literatura com a goma do cajueiro acetilada relatado por Pitombeira (2015) onde observou-se GS de 2.8 empregando-se piridina e anidrido acético. Valores diferentes foram encontrados por Silva (2019) em seu estudo de acetilação livre de solventes onde obteve GS de 0.33, utilizando uma rota de acetilação semelhante a utilizada no presente estudo. Quelemes (2017) obteve em sua proposta de quaternização em razão molar 1/6/6/ um GS de 0.73. De um modo geral os melhores valores de substituição foram obtidos com a quaternização tendo sido conduzida inicialmente e posteriormente a acetilação. Nas rotas aqui propostas sem o uso de solventes, o melhor valor de GS foi obtido tendo a reação de acetilação conduzida em uma única etapa e a posterior a quaternização (GCQ-A1).

A figura 9 mostra o perfil de distribuição da massa molar de GC e seus derivados, exibindo uma distribuição monomodal da massa molar, os picos

representados foram gerados pelo detector de índice de refração. Corresponde então que a concentração molecular total, eluiu entre os volumes 8,5 e 9,5 mL.

Figura 9. Curvas de CPG para a GC e seu derivados modificados.



Curvas de CPG da GC, GCQ, GCA, GCQ-A1, GCQ-A2, GCA-Q1 e GCA-Q2.

A massa molar da GC isolado determinada por CPG é de ordem $10^3 - 10^4$ g / mol. (ANDERSON, 1974). A massa ponderal média (M_w) da GC foi de $2,12 \times 10^4$ g/mol, seus derivados não apresentaram grandes alterações na sua massa, onde o ganho de massa pode estar relacionado a inserção de novos grupos funcionais e a pouca quebra da cadeia do polímero (Tabela 2). Os resultados encontrados se assemelham aos reportados anteriormente em relação a GC e GC modificada com anidrido propiônico e amônio quaternário que variam entre $1,0 \times 10^4$ e $9,0 \times 10^5$ (PITOMBEIRA et al., 2001, RICHTER, 2018).

Tabela 2. Dados de massa molar, potencial zeta e solubilidade

Amostra	Massa molar M_w (g/mol)	Potencial Zeta (ζ) mV	Solubilidade (%)
GC	$2,12 \times 10^4$	-17,2	$97,3 \pm 0,5$
GCQ	-	25,7	$96,3 \pm 2,7$
GCA	-	-37,3	$89,6 \pm 2,3$
GCQ-A1	$2,67 \times 10^4$	-24,5	$95,3 \pm 1,6$
GCA-Q1	$2,98 \times 10^4$	-17,4	$92 \pm 2,2$

GCQ-A2	$2,34 \times 10^4$	-6,48	$85,8 \pm 3$
GCA-Q2	$2,56 \times 10^4$	-22,3	$94,5 \pm 1,5$

A solubilidade dos derivados modificados da GC foi avaliada por meio do coeficiente de solubilidade. Os derivados modificados de GC apresentaram solubilidade inferior ao valor da solubilidade da GC, entretanto obteve-se uma solubilidade de massa média de 92%, podendo assim considerar uma boa solubilidade aquosa (Tabela 2). De acordo com Sajomsang et al (2009), a modificação por amônio quaternário pode proporcionar propriedades como alta solubilidade para o polissacarídeo. A acetilação para alguns estudos (PITOMBEIRA et al., 2015, LIMA et al., 2018) promoveu uma alta hidrofobização. No presente estudo, a inserção do grupo acetil diminuiu a solubilidade comparado com GC, entretanto os derivados ainda demonstraram boa solubilidade em água.

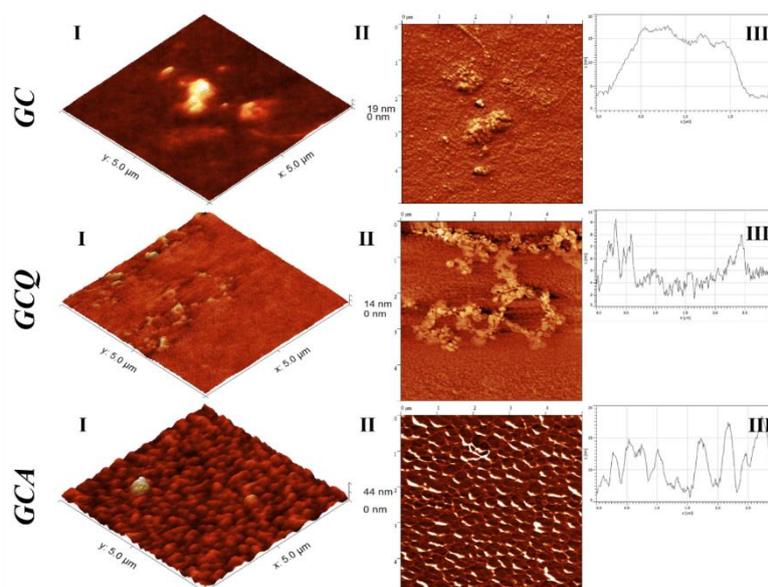
As reações de acetilação aparecem na literatura realizadas com vários catalisadores, como hidróxido de sódio (COLUSSI et al., 2017; RIBEIRO et al., 2017), piridina (PITOMBEIRA et al., 2015, DIAS et al., 2016) e ácido sulfúrico (LIMA et al., 2017). Os tipos de catalisadores, concentração, tempo de reação e temperatura são parâmetros que afetam no grau de substituição do polissacarídeo, podendo influenciar nas características solúveis do polissacarídeo onde um grau de substituição baixo proporciona uma melhor solubilidade e graus mais elevados de acetilação contribuem para a insolubilidade (SILVA, 2018; BERGLUND, 2020). As reações de acetilação realizadas neste trabalho apresentam um baixo GS, o que corrobora com o fator da sua boa solubilidade. Avaliando a carga de superfície através do potencial Zeta (Tabela 2) foi possível observar as cargas negativas, onde as amostras GCQ-A1 e GCA-Q2 apresentaram números mais próximos de -30 mV em módulo para potencial zeta indicando que os modificados se comportam como bons polieletrólitos, devido à presença de grupos quaternário.

5.2. ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)

Na análise dos polímeros por microscopia de força atômica foi possível observar morfologicamente a ação reacional dos grupos funcionais inseridos nas amostras modificadas. Comparando os grupos controles GC, GCQ e GCA (Figura 10), observamos que o grupo GCA apresentam uma estruturação de partículas

homogênea, o que pode estar relacionada as cargas negativas e hidrofóbicas desse grupo, visto que a formação de partículas está atribuída a carga superficial, alterações na superfície e nível de hidrofobicidade do polímero (ZAMPIERI, 2009).

Figura 10. MFA das amostras: GC, GCQ e GCA.



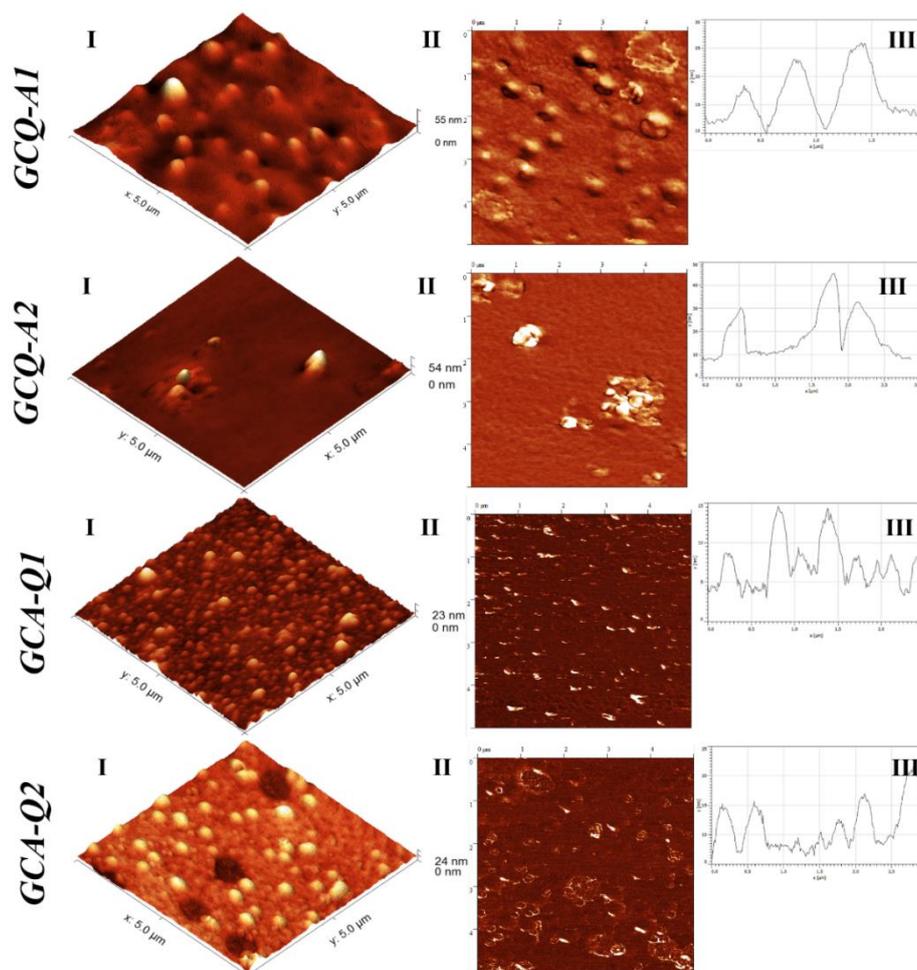
Em (I) são imagens 3D, em (II) são imagens 2D – Z-PHASE e em (III) são histogramas de amplitude para tamanho de partículas. Todas as imagens possuem resolução de 512×512 pixels.

A GCQ como se apresenta mais hidrofílica obteve uma distribuição mais heterogênea (Figura 10. II) se assemelhando a GC. Ribeiro (2020) em seu estudo também reporta GC com uma distribuição de partículas mais heterogênea, atribuindo a uma polimerização associada ao pH da amostra.

Os derivados GCQ-A1, GCQ-A2, GCA-Q1 e GCA-Q2 (Figura 11), apresentaram uma conformação de auto estruturação de partículas que variam entre 24 nm e 55 nm. Sendo o GCQ-A1 o que apresentou o maior diâmetro médio de partículas $32,71 \pm 1,24$ nm (Figura 12). Os derivados GCA-Q1 e GCA-Q2

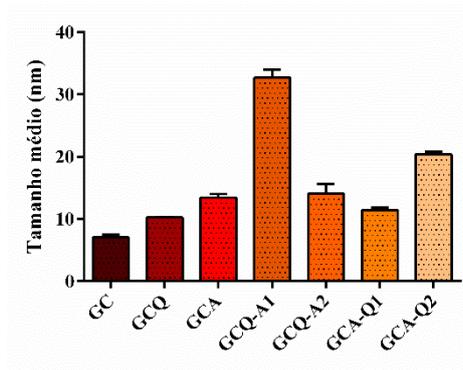
demonstraram uma amplitude de partículas (Figura 11. III) semelhante a GCA e uma distribuição mais homogênea, o que pode ser associado com a substituição dos grupos funcionais inseridos, visto que esses derivados apresentaram em FTIR bandas maiores para os grupos acetil e baixas para o grupo de amônio quaternário, enfatizando assim as características hidrofóbicas na dispersão dessas partículas.

Figura 11. MFA das amostras: GCQ-A1, GCQ-A2, GCA-Q1 e GCA-Q2.



Legenda: Em (I) são imagens 3D, em (II) são imagens 2D – Z-PHASE e em (III) são histogramas de amplitude para tamanho de partículas. Todas as imagens possuem resolução de 512×512 pixels.

Figura 12. Gráfico de diâmetro médio das partículas.

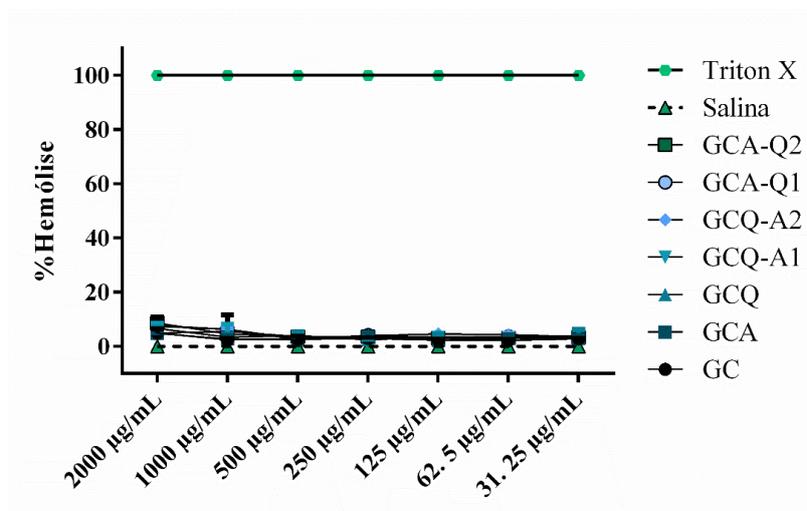


Legenda: Os resultados foram expressos como média \pm Erro Padrão da Média (EPM). Um $p < 0,5$ foi considerado significativamente estatístico.

5.3. ENSAIO HEMÓLISE

O ensaio de hemólise avalia a liberação de hemoglobina devido a danos nas membranas das hemácias. Nesse estudo, a porção solúvel obtida de cada amostra após o teste de solubilidade dos derivados de GC analisados (GCA, GCQ, GCQ-A1, GCQ-A2, GCA-Q1 e GCA-Q2), nas concentrações de 2000 a 31,25 $\mu\text{g/mL}$, não promoveram hemólise acima de 10% (Figura 13), evidenciando boa biocompatibilidade com eritrócitos, mesmo na mais alta concentração testada. O que corrobora com o fator dos grupos acetil e amônio quaternário apresentarem hemocompatibilidade (TEJERO et al., 2015; QUELEMES, 2017 e DOURADO, 2020).

Figura 13. Hemocompatibilidade da GC e de seus derivados modificados

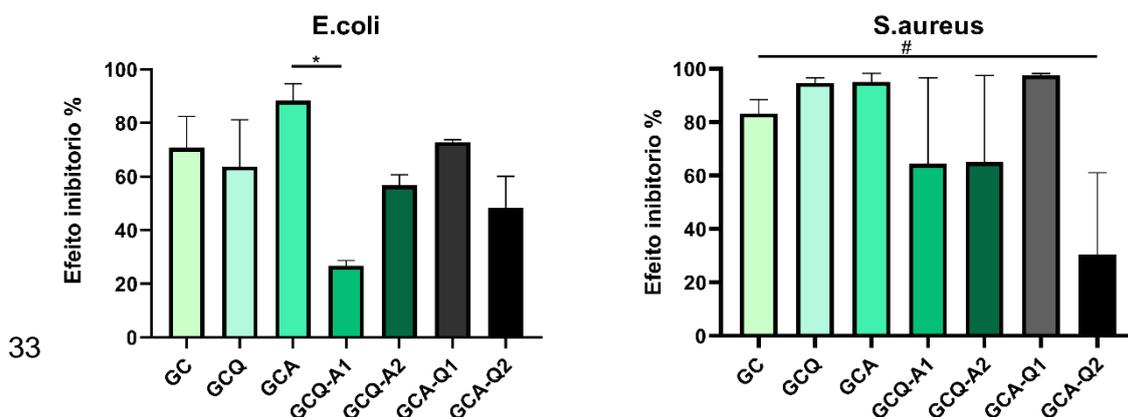


5.4. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA POR CONTATO DIRETO E CONTAGEM DE UFC

As porcentagens médias de inibição da GC e seus derivados modificados contra bactérias *S. aureus* e *E. coli* foram medidas por teste de contato direto e apresentadas na figura 14. Tanto a GC isolada como os seus modificados apresentaram um percentual de inibição próximo ou maior que 50% de inibição. Quando comparados com a GC isolada e com os modificados GCA e GCQ, observa-se que os modificados que passaram pelo processo de inserção dos dois grupos funcionais tiveram uma queda na atividade inibitória, onde somente o modificado GCA-Q1 apresentou um pequeno aumento na sua atividade inibitória para *S. aureus* comparando com GC, GCA e GCQ.

O processo de quaternização insere grupos de amônio quaternário carregados positivamente e aumenta a solubilidade em água, esses efeitos podem contribuir para uma melhor interação eletrostática entre esses polycations e a superfície celular bacteriana carregada negativamente (JENNINGS et al., 2015; TEJERO et al., 2015), aumentando assim, o dano provocado pela GCQ nas membranas dos *Staphylococcus* spp.. A reação de acetilação do radical hidroxil também pode exercer significativa influência para a atividade antiestafilocócica (SOUZA, 2013). Entretanto as ações inibitórias das bactérias não estão relacionadas somente a interação de cargas, as cadeias alquílicas mais longas por exemplo, proporcionam melhor compatibilidade com a estrutura em bicamada da parede celular bacteriana, o que permite que o polímero se difunda mais facilmente através da parede celular bacteriana (RIBEIRO,2020). Sendo assim o aumento da massa molar desse modificado GCA-Q1 pode estar relacionado a essa inibição maior quando comparada aos outros modificados.

Figura 14. Efeito inibitório.



6. CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi realizado a modificação por inserção dos grupos acetil e amônio quaternário do polissacarídeo extraído do cajueiro. Diante das caracterizações realizadas sobre os polímeros modificados foi possível observar que apesar de apresentarem bandas características do grupo acetil observadas através do FTIR, esse grupo teve um baixo grau de substituição e sinais considerados fracos quando comparados com os sinais referentes ao grupo de amônio quaternário no RMN, algumas hipóteses podem ser levantadas diante desse fator como por exemplo a substituição desses grupos no momento das modificações no polissacarídeo, ou a reação do catalisador NaOH com o grupo acetil ao invés das hidroxilas. Foi possível concluir também que a carga negativa prevalece sobre a positiva no momento da reação visto que os modificados apresentaram esse tipo de carga. Carga essa que pode estar relacionada a melhor auto estruturação das partículas dos derivados modificados. É possível que a diminuição do efeito inibitório dos modificados estejam relacionadas a essas cargas. Entre tanto a falta de atividade antibacteriana não descarta o uso dos polímeros modificados neste trabalho em outros tipos de aplicações biotecnológicas visto que os derivados obtiveram uma boa estruturação de partículas, solubilidade, carga satisfatórias e hemocompatibilidade, sendo entre os quatro modificados o GCQ-A1 o que apresentou essas melhores características.

7. REFERÊNCIAS

ANDERSON, Douglas MW; BELL, Philip C.; MILLAR, John RA. Composition of gum exudates from *Anacardium occidentale*. *Phytochemistry*, v. 13, n. 10, p. 2189-2193, 1974

BARBOSA FILHO, Valter Menezes et al. Phytochemical constituents, antioxidant activity, cytotoxicity and osmotic fragility effects of Caju (*Anacardium microcarpum*). *Industrial Crops and Products*, v. 55, p. 280-288, 2014.

BERGLUND, Jennie et al. Acetylation and sugar composition influence the (in) solubility of plant β -mannans and their interaction with cellulose surfaces. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, v. 8, n. 27, p. 10027-10040, 2020.

CHEN, Yi et al. Acetylation and carboxymethylation of the polysaccharide from *Ganoderma atrum* and their antioxidant and immunomodulating activities. *Food chemistry*, v. 156, p. 279-288, 2014.

CORREIA, Suzimone de J.; DAVID, Juceni P.; DAVID, Jorge M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. *Química Nova*, v. 29, p. 1287-1300, 2006.

COUTINHO, Marcela AS; MUZITANO, Michele F.; COSTA, Sônia S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual de Química*, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

DAHAKA, Akash P. et al. Antimicrobial screening of different extract of *Anacardium occidentale* Linn. leaves. *International Journal of ChemTech Research*, v. 1, n. 4, p. 856-858, 2009.

DE ARAÚJO, Simone et al. Aplicações Farmacológicas e Tecnológicas da Goma do Cajueiro (*Anacardium Occidentale* L.)—um Produto Obtido da Flora Brasileira. *REVISTA GEINTEC-GESTAO INOVACAO E TECNOLOGIAS*, v. 8, n. 1, p. 4292-4305, 2018. Dias, S. F. L.,

DE SOUSA, Ana KA et al. 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.

DIAS, Sávia Francisca Lopes et al. Acetylated cashew gum-based nanoparticles for transdermal delivery of diclofenac diethyl amine. *Carbohydrate polymers*, v. 143, p. 254-261, 2016.

DOURADO, Flaviane de França. MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEO OBTIDO A PARTIR DE EXSUDATO COM ANIDRIDO PROPIÔNICO. 2020.

FENNER, Raquel et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, p. 369-394, 2006.

JIN, Zheng; HU, Gaowei; ZHAO, Kai. Mannose-anchored quaternized chitosan/thiolated carboxymethyl chitosan composite NPs as mucoadhesive carrier for drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, v. 283, p. 119174, 2022.

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

Kumar, A., Moin, A., Shruthi, R., Ahmed, A., & Shivakumar, H. G. (2012). Cashew Gum: A Versatile Hydrophylic Polymer: A Review. *Current Drug Therapy*, 7, 2–12.

KYZIOŁ, Agnieszka et al. Tackling microbial infections and increasing resistance involving formulations based on antimicrobial polymers. *Chemical Engineering*

Journal, v. 385, p. 123888, 2020.

LI, Yuanhong et al. Drug-free and non-crosslinked chitosan scaffolds with efficient antibacterial activity against both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Carbohydrate polymers*, v. 241, p. 116386, 2020.

LIMA, Mayrla R. et al. Hydrophobization of cashew gum by acetylation mechanism and amphotericin B encapsulation. *International journal of biological macromolecules*, v. 108, p. 523-530, 2018.

LUZ, Cíntia Luíza da Silva. *Anacardiaceae R. Br. na flora fanerogâmica do estado de São Paulo*. 2011. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Mohanraj, v. J., y. Chen. (2006). Nanoparticles – a review., *trop. J. Pharm. Res.* 5, 1, 561573

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

PAULA, R. C. M.; HEATLEY, F.; BUDD, P. M. Characterization of *Anacardium occidentale* Exudate Polysaccharide. *Polymer International*. v.45, p. 27- 35, 1998.

PELL, S. K. Molecular systematics of the cashew family (Anacardiaceae). Ph. D Dissertation. Department of Biological Sciences, Louisiana State University, Baton Rouge, LA, USA, 2004.

Pitombeira, N. A. O., Veras Neto, J. G., Silva, D. A., Feitosa, J. P A., Paula, H. C. B., & de Paula, R. C. M. (2015). Self-assembled nanoparticles of acetyled cashew gum: Characterization and evaluation as potential drug carrier. *Carbohydrate Polymers*, (6)117, 610–615.

Polímeros: Ciência e Tecnologia, 3, 33–36.

Porto, B. C. & Cristianini, M. (2014). Evaluation of cashew tree gum (*Anacardium occidentale* L.) emulsifying properties. *LWT – Food Science and Technology*, 59, 1325–1331.

Quelemes, P. V., Araruna F. B., de Faria, B. E. F., Kuckelhaus, S. A. S., Silva, D. A., Mendonça, R. Z., Eiras, C., Soares, M. J. S., & Leite, J. R. S. A. (2013). Development and Antibacterial Activity of Cashew Gum-Based Silver Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 4969–4981.

QUELEMES, Patrick V. et al. Quaternized cashew gum: An anti-staphylococcal and biocompatible cationic polymer for biotechnological applications. *Carbohydrate polymers*, v. 157, p. 567-575, 2017.

RAZALI, N.; et al. A. Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale*). *Food Chemistry*. v.111, p. 38–44, 2008.

Ribeiro, A. J., Souza, F. R. L., Bezerra, J. M. N. A., Oliveira, C., Novotny, D.,

Soares, M. F. L., Nunes, L. C. C., Silva-Filho, E. C., Veiga, F., & Sobrinho, J. L. S. (2016). Gums' based delivery systems: review on cashew gum and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 147, 188–200

RIBEIRO, Andresa C. et al. Synthesis and characterization of acetylated amylose and development of inclusion complexes with rifampicin. *Carbohydrate polymers*, v. 157, p. 267-274, 2017.

RIBEIRO, Fábio de Oliveira Silva et al. Structural characterization, antifungal and cytotoxic profiles of quaternized heteropolysaccharide from *Anadenanthera colubrina*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 165, p. 279-290, 2020.

RODRIGUES, Carla Inês Soares; JACKSON, Joshua J.; MONTROSS, Michael D. A molar basis comparison of calcium hydroxide, sodium hydroxide, and potassium hydroxide on the pretreatment of switchgrass and miscanthus under high solids conditions. *Industrial Crops and Products*, v. 92, p. 165-173, 2016.

RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M.; COSTA, S. M. O. Methods of isolation of natural gums: comparison through cashew gum (*Anacardium occidentale* L.). Original title: Métodos de isolamento de gomas naturais: comparação através da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). **Polímeros: ciência e tecnologia**, v. 1, p. 31-36, 1993. de gomas

Sajomsang, W., Gonil, P. & Tantayanon, S. (2009). Antibacterial activity of quaternary ammonium chitosan containing mono or disaccharide moieties: Preparation and characterization. *Int. J. Biol. Macromol.*, 44, 419–427.

SCHIRATO, G.V.; MONTEIRO, F. M. F.; SILVA, F. O.; LIMA-FILHO, J. L.; LEÃO, A. M. A. C.; PORO, A. L. F. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.36, n.1, p.149-154, 2006.

SILVA, Eliadna de Lemos Vasconcelos et al. Solvent-free synthesis of acetylated cashew gum for oral delivery system of insulin. *Carbohydrate polymers*, v. 207, p. 601-608, 2019.

Souza, Diego Ramon dos Santos. Síntese, caracterização e estudo antibacteriano de 1, 3, 4 – oxadiazóis derivados de N-acilhidrazonas. / Diego Ramon dos Santos Souza – Cuité: CES, 2013.

TEJERO, R., LÓPEZ , D., LÓPEZ -FABAL, F., GÓMES-GARCÉS, J. L., FERNANDEZ - GARCÍA, M. High Efficiency Antimicrobial Thiazolium and Triazolium Side-Chain Polymethacrylates Obtained by Controlled Alkylation of the Corresponding Azole Derivatives. *Biomacromolecules*, 16, 1844–1854, 2015

ZAMPIERI, A. L. T. D. C. (2009). Desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea da isoflavona genisteína em nanocápsulas poliméricas.

ZHANG, Hui-zhu et al. Pullulan acetate nanoparticles prepared by solvent diffusion method for epirubicin chemotherapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 71, n. 1, p. 19-26, 2009.