



RECOBRIMENTO POLIMÉRICO EM EPI USANDO A TÉCNICA DE LAYER-BY-LAYER PARA ATIVIDADE VIRUCIDA CONTRA A COVID-19

Palavras-Chave: coronavírus, layer-by-layer, biopolímeros

Autores(as):

CAROLINA DO PRADO TEIXEIRA, FEQ – UNICAMP

CAROLINE SANTINON, FEQ – UNICAMP

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

INTRODUÇÃO:

A pandemia causada pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2) atingiu repentinamente pessoas no mundo todo, provocando fortes impactos nos sistemas de saúde, na economia e até mesmo nos hábitos cotidianos, levando pesquisadores do mundo todo a encontrar diferentes formas para impedir a contaminação e proteger o maior número de pessoas. Com o intuito de evitar o uso de compostos potencialmente tóxicos ao meio ambiente e aos seres humanos, foram realizados muitos esforços a fim de encontrar biopolímeros que possuem características antimicrobianas e que podem ter diversas aplicações na área farmacêutica, cosmética e biomédica.

Neste contexto, polissacarídeos atóxicos como a k-carragenina e o ágar são amplamente conhecidos pelas suas propriedades gelificantes e de formação de filmes. Sendo assim, é possível intercalar o uso destes biopolímeros para produção de um revestimento em equipamentos de proteção individual, como as máscaras, através da técnica de *layer-by-layer* (LbL). A técnica LbL é amplamente aplicada para formação de nanofilmes com multicamadas (HERNANDEZ-MONTELONGO et al., 2020). Esta técnica se baseia na imersão de um substrato em soluções poliméricas com cargas opostas, a fim de criar multicamadas por meio da interação eletrostática. A técnica LbL recebe grande destaque em razão da ampla variedade de substratos em que pode ser empregada, do controle que oferece da espessura do filme formado, além de utilizar a própria interação eletrostática das moléculas na formação dos filmes, o que faz com que o investimento em energia para o processo seja muito menor do que das outras técnicas (LIPTON et al., 2020).

Neste trabalho foi desenvolvido um recobrimento polimérico no tecido de algodão, visando mimetizar as superfícies de máscaras, utilizando os polissacarídeos k-carragenina e ágar. A principal motivação do projeto é a formação de uma superfície bioativa em máscaras de proteção utilizando polissacarídeos atóxicos e a técnica *layer-by-layer*, a fim de inativar o SARS-CoV-2 e substituir o uso de componentes tóxicos.

METODOLOGIA:

Inicialmente, realizou-se uma etapa de funcionalização do ágar para que o mesmo apresentasse carga positiva e pudesse ser depositado junto à k-carragenina comercial, que intrinsecamente possui carga negativa devido à presença dos grupos OSO_3^- . A funcionalização do ágar foi feita com o reagente cationizante cloreto de glicidiltrimetilamônio em solução alcalina.

Em seguida, foi necessário preparar todas as soluções a serem utilizadas (NaOH e HCl 1 mol/L e de NaCl 0,1 mol/L). Também se preparou uma solução de PEI (polietilenoimina) 1 g/L, utilizando-se a solução de NaCl como solvente, e seu pH foi ajustado para 4. Neste pH, o PEI encontra-se protonado e

a adesão dos biopolímeros é facilitada. Além disso, também vale ressaltar que o PEI tem como função homogeneizar a distribuição de cargas elétricas no substrato (HERNANDEZ-MONTELONGO et al., 2020). Por fim, foram preparadas as soluções polieletrólíticas de 0,1% m/V utilizando-se os biopolímeros e água Milli-Q.

Para o preparo do substrato foram utilizados tecidos 100% algodão, cortados em tiras de 2,5 x 15 cm. Para higienização, uma etapa de lavagem de 16 minutos em banho ultrassônico com água Milli-Q foi realizada, seguida de três enxágues de 5 minutos com água Milli-Q. Os tecidos foram deixados para secagem por 12 h utilizando temperatura ambiente antes da aplicação da técnica LbL. Além disso, também foi necessário o uso de lâminas de vidro, nas quais os tecidos foram fixados. As lâminas também passaram por três lavagens, cada uma com 16 minutos em banho ultrassônico com soluções de detergente (3% V/V), NaOH (1 mol/L) e água Milli-Q. As lâminas também foram deixadas para secar por 12 h em temperatura ambiente.

Após todas as etapas de preparo, partiu-se para aplicação da técnica. Primeiramente, os tecidos secos passaram por uma etapa de oxidação com plasma de oxigênio (100 mTorr) por 15 minutos, a fim de aumentar a presença de cargas positivas no substrato e facilitar a adesão do filme. Em seguida, os tecidos foram fixados nas lâminas de vidro e imersos na solução de PEI por 15 minutos. Para aplicação da técnica LbL foi utilizado o equipamento LbL Nanostructure Pro. A Figura 1 representa o ciclo de imersão nas soluções polieletrólíticas, seguida das lavagens, sendo que a solução aniônica corresponde à k-carragenina e a solução catiônica corresponde ao ágar funcionalizado. O procedimento foi repetido dez vezes, sendo que o tempo de imersão em cada solução polimérica foi de 10 minutos. Após concluído, os tecidos foram deixados para secar em temperatura ambiente.

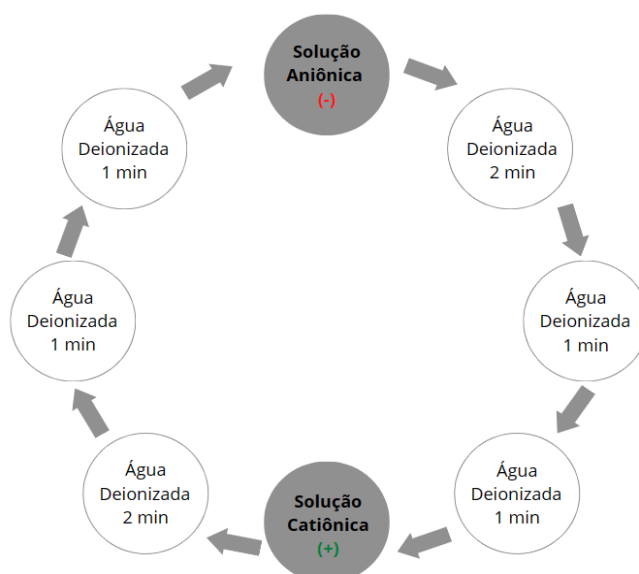


Figura 1: Esquema da aplicação da técnica *layer-by-layer* no recobrimento.

As análises de caracterização FTIR e MEV foram realizadas no Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da FEQ/Unicamp. Para a espectroscopia FTIR, os tecidos recobertos foram analisados pelo método de ATR na faixa 4000-675 cm^{-1} no equipamento Nicolet 6700 (Thermo Scientific, EUA). Já na análise de MEV, as amostras foram revestidas com uma fina camada de ouro (200 Å) para obtenção das imagens no equipamento Sputter Coater (EMITECH, UK).

Para que a atividade antimicrobiana do tecido fosse ampliada para um maior espectro de patógenos, os tecidos recobertos foram imersos em uma solução de AgNO_3 (0,01 M) durante 10 minutos e deixadas para secagem a temperatura ambiente. Esta etapa foi realizada previamente aos ensaios biológicos com o coronavírus.

Os ensaios de atividade virucida foram realizados em Laboratório de Biossegurança Nível 2, utilizando-se o vírus Coronavírus MHV-3 do Laboratório de Virologia, Instituto de Biologia da Unicamp, GenBank (MW620427). Células da linhagem L929 foram cultivadas com concentração inicial de $1,5 \times 10^5$ células/mL em Meio Essencial Mínimo de Dulbecco (DMEM) Gibco® livre de antibióticos e suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após, realizou-se a titulação do vírus com diluições sequenciais, em quadruplicata. A seguir, adicionou-se as células com concentração de 2×10^5 células/orifício. Passadas 48 horas de incubação a 37 °C, analisou-se a citotoxicidade nas células e a atividade antiviral através de microscópio óptico invertido, em comparação com a amostra de controle.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Para análise dos filmes obtidos, os tecidos foram enviados ao Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC), onde foram feitas as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e FTIR, e para o Instituto de Biologia (IB), onde foram feitos testes para avaliar a atividade virucida do tecido revestido.

Os espectros obtidos pelo FTIR estão ilustrados na Figura 2. A presença de um pico em torno de 3300 cm^{-1} está relacionada aos grupos hidroxila, presentes nos dois polissacarídeos utilizados. Também se observa um pico em aproximadamente $2800\text{-}2900 \text{ cm}^{-1}$, que é atribuído às ligações C-H (FAHMY et al, 2021). Além disso, foi observado um pico em aproximadamente 1400 cm^{-1} , relacionado à ligação C-N, que aparece devido à cationização do ágar. Outro pico observado é em torno de 1200 cm^{-1} , referente aos grupos éster sulfato, presentes na carragenina (SANTINON et al, 2023). Por fim, os últimos picos observados foram em torno de 1010 cm^{-1} , que se refere à ligação C-O-C, contida em éteres cíclicos, e em torno de 1600 cm^{-1} , relacionado à flexão e ao alongamento da ligação -OH (DUMAN et al, 2020). Os picos evidentes em torno de 2350 cm^{-1} foram desconsiderados, pois referem-se à variação de CO_2 do ambiente.

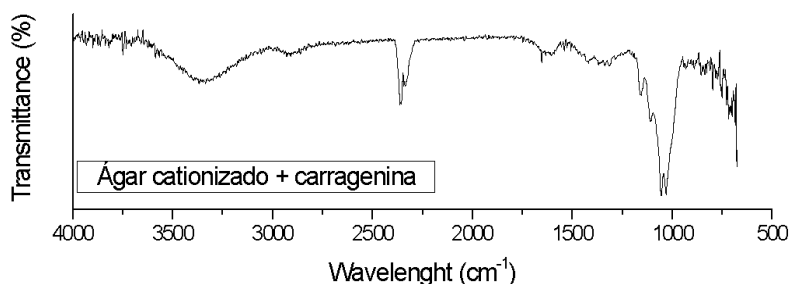


Figura 2: Espectro de FTIR dos tecidos recobertos com ágar cationizado/carragenina e carragenina cationizada/alginato de sódio.

As imagens obtidas a partir do MEV estão ilustradas pela Figura 3. Sabe-se que as fibras do tecido de algodão sem tratamento algum se apresentam de forma lisa, cilíndrica e achatada (GIACOMINI, 2019). A partir da Figura 3, observa-se que existem reticulações nas fibras do tecido, indicando a deposição dos biopolímeros. Além disso, pode-se notar que a deposição não foi uniforme, havendo regiões em que a aderência foi maior. Tal situação se deve ao fato de que as fibras de algodão configuram um substrato não regular (MATSUSHITA, 2014).

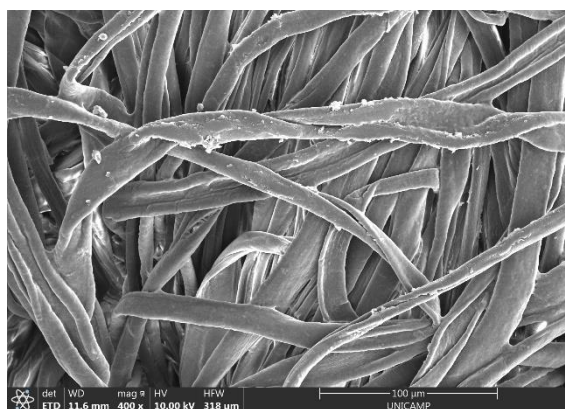


Figura 3: Microscopias do tecido de algodão recobertos por nanocamadas de ágar cationizado e carragenina.

A atividade virucida da amostra desenvolvida está apresentada na Tabela 1. De acordo com o resultado, é possível confirmar que o revestimento polimérico com íons prata na camada superior (Ag^+), foi capaz de inativar 99,99% do patógeno testado em relação à amostra de controle. O resultado está de acordo com outros trabalhos da literatura que aplicam nanopartículas metálicas para a inativação do vírus causador da COVID-19. Como a concentração de prata é relativamente baixa, o tecido revestido não apresentou toxicidade frente às células testadas.

Amostra	Tempo de Ação	Dose Máxima Não Tóxica	Inativação Viral (%)
Tecido de algodão revestido	5 minutos	Não tóxico	99,99%

Tabela 1: Atividade virucida da amostra contra o coronavírus (MHV-3).

CONCLUSÕES:

Diante do exposto no presente trabalho, concluiu-se que a deposição dos filmes e a atividade virucida foram obtidas de forma satisfatória. A partir das análises de caracterização, observou-se a presença dos principais grupos funcionais dos biopolímeros utilizados e as imagens espectroscópicas confirmam que as camadas de ágar funcionalizado e k-carragenina foram depositadas no substrato. Através da análise da atividade virucida, concluiu-se que o material desenvolvido é bastante promissor, com alta inativação viral e atóxico, o que viabiliza sua aplicação em revestimentos de máscaras de tecido futuramente.

REFERÊNCIAS:

DUMAN, O.; POLAT, T.G.; DIKER, C.O; TUNÇ, S. Agar/k-carrageenan composite hydrogel adsorbent for the removal of Methylene Blue from water. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 160, p. 823–835, 2020.

FAHMY, H.M.; ALY, A.A.; SAYED, S.M.; ABOU-OKEIL, A. K-carrageenan/Na-alginate wound dressing with sustainable drug delivery properties. *Polymers for Advanced Technologies*, v. 32, p. 1793-1801, 2021.

GIACOMONI, FERNANDO. Estudo comparativo do tingimento com corante cochonilha em tecido de algodão cationizado com polímeros naturais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Engenharia Química. Paraná, 2019.

HERNANDEZ-MONTELONGO, J.; LUCCHESI, E.G.; GONZALEZ, I.; MACEDO, W.A.A.; NASCIMENTO, V.F.; MORAES, A.M.; BEPPU, M.M.; COTTA, M.A. Hyaluronan/chitosan nanofilms assembled layer-by-layer and their antibacterial effect: A study using *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 141, p. 499–506, 2016.

HERNANDEZ-MONTELONGO, J.; NASCIMENTO, V.F.; HERNANDEZ-MONTELONGO, R.; BEPPU, M.M.; COTTA, M.A. Fractal analysis of the formation process and morphologies of hyaluronan/chitosan nanofilms in layer-by-layer assembly. *Polymer*, v. 191, p. 122-283, 2020.

HERNANDEZ-MONTELONGO, J.; NASCIMENTO, V.F.; MURILLO, D.; TAKETA, T.B.; SAHOO, P.; SOUZA, A.A.; BEPPU, M.M.; COTTA, M.A. Nanofilms of hyaluronan/chitosan assembled layer-by-layer: An antibacterial surface for *Xylella fastidiosa*. *Carbohydrate Polymers*, v. 136, p. 1–11, 2016.

LIPTON, J.; WENG, G.M.; RÖHR, J.A.; WANG, H.; TAYLOR, A.D. Layer-by-Layer Assembly of Two-Dimensional Materials: Meticulous Control on the Nanoscale. *Matter*, v. 2, p. 1148-1165, 2020.

MATSUSHITA, A.F. Preparação e Caracterização de Nanopartículas de Ag e ZnO e Incorporação em Fibras de Tecido de Algodão. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2014.

ROCHA NETO, J.B.M.; LIMA, G.G.; FIAMINGO, A.; GERMINIANI, L.G.L.; TAKETA, T.B.; BATAGLIOTI, R.A.; SILVEIRA, G.A.T.; SILVA, J.V.L.; CAMPANA-FILHO, S.P.; OLIVEIRA JR, O.N.; BEPPU, M.M. Controlling antimicrobial activity and drug loading capacity of chitosan-based layer-by-layer films. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 172, p. 154–161, 2021.

SANTINON, C. Desenvolvimento de recobrimento virucida a partir de polímero natural funcionalizado para aplicação em superfícies bioativas. 2021. Exame de Qualificação. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

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, 2023.