



FIBRAS ELETROFIADAS DE QUITOSANA MODIFICADA COM CLOREXIDINA VISANDO ATIVIDADE VIRUCIDA

Palavras-Chave: FIBRAS ULTRAFINAS, COVID-19, INATIVAÇÃO VIRAL

Autores/as:

Pedro Paulo de Freitas Vidal, FEQ, UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Marisa Masumi Beppu (orientadora), FEQ, UNICAMP

Dr. Celso Fidelis de Moura Junior (Coorientador), FEQ, UNICAMP

INTRODUÇÃO:

As máscaras cirúrgicas geralmente consistem em pelo menos três camadas de tecido não tecido feito de fibras de polipropileno coladas (ZHANG et al., 2021). No entanto, essas máscaras são feitas de materiais não renováveis, não biodegradáveis e perigosos para o meio ambiente, e seu filtro acaba perdendo sua capacidade de carga e a estabilidade torna-se crítica devido a perda de carga durante o armazenamento ou uso. (SHRUTI et al., 2020).

A produção de filtros com fibras ultrafinas aumentou significativamente a capacidade de remoção de partículas em comparação com a microfibras convencional, pois são capazes de criar filtros com alta porosidade e fibras conectadas, além de serem eficazes no bloqueio de vírus (ZHANG et al., 2021). Uma das formas de produzir essas fibras extremamente finas é por meio da técnica conhecida como eletrofição. A técnica é muito aplicável com polímeros naturais como colágeno, quitosana, gelatina, acetato de celulose, entre outros,

podendo também ser utilizada em misturas com outros polímeros.

A quitosana é um polissacarídeo policíclico de cadeia linear ($pK_a=6,2-6,5$) que pode ser encontrada em certos fungos ou obtida pela N-desacetilação parcial da quitina. Dentre as principais propriedades apresentadas pela quitosana, as mais importantes são a biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades antimicrobianas, além de não ser tóxica ao organismo humano (FATTAHPOUR et al., 2015). No entanto, devido a sua baixa solubilidade, é necessário modificar sua estrutura para torná-lo mais solúvel em uma ampla faixa de pH (BRANCA et al., 2016), além de proporcionar melhor atividade antimicrobiana com a adição de agentes antimicrobianos.

A clorexidina (CHX) é uma biguanida catiônica amplamente utilizada como agente antibacteriano eficaz em aplicações que vão desde desinfetantes comuns até agentes bactericidas em odontologia. (2018). Geralmente é visto emaranhado com um agente biocida que se infiltra gradualmente no meio, fazendo com que o agente antimicrobiano se esgote com o

tempo. Portanto, uma forma de prolongar a vida útil desses materiais seria a ligação cruzada de CHX com uma matriz polimérica, como a quitosana, usando um aglutinante orgânico de titânio (CHEN et al., 2008).

Nesse contexto, este projeto propôs o desenvolvimento de fibras eletrofiadas contendo quitosana modificada com digluconato de clorexidina (DCHX) obtida pela técnica de eletrofiação com o objetivo de atividade virucida, especialmente o SARS-CoV-2.

METODOLOGIA:

Modificação e Caracterização da Quitosana com DCHX

Inicialmente, dissolveu-se 3% em massa de quitosana em água milli-Q, agitando a solução a 70°C por 1 hora. Em seguida, adicionou-se uma solução contendo DCHX e TTE na proporção de 1:8 (m/m) à mistura e continuou-se a agitação por 36 horas a 70 °C, até obter uma solução pastosa e homogênea. A quitosana modificada (Q-CHX) foi obtida por precipitação em etanol, seguida de secagem em estufa a 70 °C por 24 horas.

Em seguida, a amostra foi caracterizada através de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), análise virucida com o coronavírus MHV-3 e teste de citotoxicidade da amostra.

Preparo das Soluções Poliméricas

Primeiramente, uma solução contendo clorofórmio e metanol na proporção de 2:1 (v/v) foi preparada e submetida a um banho ultrassônico por um período de 5 minutos. Em seguida, para obtenção da blenda proporções de PCL/Q-CHX de 100/0, 95/5, 90/10 e 85/15

(m/m) foram adicionadas, e a mistura foi agitada por 12 horas a 50 °C até alcançar uma completa homogeneização. Posteriormente, as soluções foram submetidas a análises de caracterização de condutividade elétrica utilizando um condutivímetro de bancada CG200 (Gehaka) e de viscosidade por meio de um viscosímetro modelo SV-10 (AND, Japão). Todas as análises foram conduzidas em replicadas quintuplicadas e em condições de temperatura ambiente.

Eletrofiação

O processo de eletrofiação foi conduzido à temperatura ambiente e umidade entre 40-50%. A solução polimérica foi adicionada em uma seringa de 10 mL com agulha removível de diâmetro $\phi = 0,70$ mm, acoplada a uma bomba de infusão com vazão de 1 mL/h. Foi utilizado um coletor de cobre do tipo placa para coletar as fibras. A distância entre a agulha e o coletor foi de 10 cm e uma tensão elétrica aplicada de 15 kV. Após a eletrofiação, as membranas foram retiradas do coletor e foram caracterizadas quanto a morfologia e diâmetro das fibras, a partir de microscopia eletrônica de varredura (MEV), FTIR, ângulo de contato, porosidade e atividade virucida e citotoxicidade.

Morfologia e Diâmetro das Fibras:

As fibras foram caracterizadas utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) da marca ZEISS, modelo Evo MA-15. Foram obtidas micrografias com magnitudes de 500x, 2000x e 5000x para analisar a morfologia e dispersão das fibras. Os diâmetros médios foram avaliados usando parâmetros estatísticos como média e desvio-padrão.

FTIR

Os testes foram conduzidos em um espectrômetro modelo Cary 630-FTIR

Spectrometer (Agilent) com um acessório de refletância total atenuada (ATR). Foram realizadas 64 varreduras por cada amostra na região espectral de 400 a 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

Ângulo de Contato

A molhabilidade das fibras foi avaliada a partir das medidas do ângulo de contato formado entre uma gota de água Milli-Q® e a superfície das fibras em intervalos de tempo de 3 a 5 s utilizando um goniômetro Easy Drop DAS 150 (Krüss, Alemanha). Uma câmera forneceu a imagem das gotas na superfície e o software do equipamento forneceu o valor do ângulo de contato.

Atividade Virucida e Citotoxicidade

A avaliação da atividade virucida foi realizada em um laboratório NB-2 (Biosafety level 2) com linhagem celular L-929, testando os betacoronavírus (cepa MHV-3). O meio de cultura para o vírus foi composto por Meio Essencial Mínimo de Dulbecco contendo 2 a 10% de soro fetal bovino. Foram realizadas diluições sequenciais do vírus na base 10 em microplacas de 96 poços contendo amostras das fibras, e as placas foram incubadas a 37 °C com 5% de CO_2 para avaliar a atividade viral.

A citotoxicidade das fibras foi avaliada por meio de testes na linhagem celular L-929 para Determinação da Dose Máxima Não Tóxica (DMTD), a fim de definir a concentração que não causa toxicidade às células.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Caracterização da Q-CHX Sintetizada

A estrutura da Q-CHX sintetizada foi inicialmente caracterizada por espectroscopia

FTIR e comparada com os espectros de quitosana e DCHX, conforme mostrado na Figura 1. A quitosana, um polissacarídeo natural, exibe um pico de absorção característico em torno de 3300 - 3500 cm^{-1} , associado a a vibração de estiramento dos grupos O-H e N-H ligados ao anel piranósido (DELGADILLO-ARMENDARIZ et al., 2014).

Após a incorporação da DCHX na estrutura da quitosana para formar a Q-CHX, observou-se um aumento na intensidade desses picos, atribuído às vibrações dos grupos hidroxila presentes na molécula de clorexidina. Esta intensificação sugere uma presença significativa de clorexidina incorporada à quitosana.

Além disso, o espectro FTIR de Q-CHX revelou picos correspondentes às ligações C-O presentes na estrutura DCHX. Esses picos não são observados no espectro da quitosana pura, apoiando ainda mais a evidência de que a DCHX foi integrada com sucesso na quitosana. Esses resultados confirmam a incorporação bem-sucedida de DCHX na molécula de quitosana, substituindo predominantemente os grupos OH da quitosana.

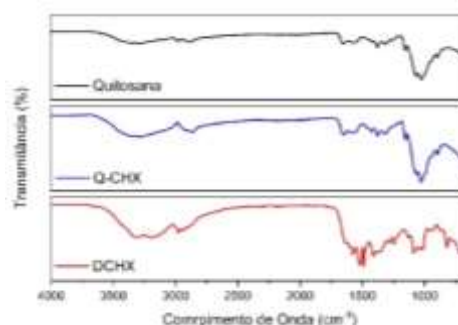


Figura 1 – Espectros de FTIR de quitosana, Q-CHX e DCHX.

Os resultados dos testes virucidas realizados com Q-CHX contra o vírus MHV-3 (pertencente à mesma família e gênero do

SARS-CoV-2) demonstram que esse material apresenta notável eficiência na inativação do vírus, atingindo uma taxa de inativação de 99% após apenas 5 minutos de contato com o material viral. As propriedades virucidas do Q-CHX, decorrentes da combinação de quitosana modificada com clorexidina, mostram potencial promissor para combater infecções virais, incluindo aquelas causadas por vírus da mesma família do SARS-CoV-2.

Um mecanismo potencial para a inativação do vírus por Q-CHX envolve seu modo de ação no envelope viral. A quitosana, como um polímero catiônico, pode interagir com os componentes carregados negativamente do envelope viral, como glicoproteínas e fosfolípidios. Essa interação interrompe a integridade da membrana viral, levando ao vazamento de componentes virais essenciais e subsequente inativação do vírus. Além disso, a clorexidina, conhecida por suas propriedades antimicrobianas de amplo espectro, contribui ainda mais para a inativação do vírus, pois promove a lise do envelope viral, promovendo a deterioração das cadeias de carbono dos nucleotídeos, visando estruturas virais essenciais e inibindo a replicação viral (Fernandez et al., 2022).

Além disso, a natureza não citotóxica do Q-CHX é uma vantagem significativa para sua potencial aplicação em tratamentos antivirais. A falta de efeitos citotóxicos observados nas células L929 indica que é improvável que Q-CHX cause alterações celulares adversas ou iniba a atividade enzimática dessas células. Esse recurso é crucial para um tratamento antiviral seguro e eficaz, pois garante que o

agente terapêutico atinja especificamente o vírus sem prejudicar as células saudáveis.

Caracterização das Soluções

Poliméricas

A Figura 2 apresenta os resultados de condutividade elétrica e viscosidade das soluções poliméricas eletrofiáveis em função da proporção de Q-CHX na composição das blendas.

Com o aumento da proporção de Q-CHX na composição da blensa é possível observar um aumento da condutividade elétrica da solução, e uma redução da sua viscosidade. Esse efeito é causado pelo aumento da densidade de cargas da solução como aumento da concentração de Q-CHX na sua composição, promovendo uma maior concentração de íons livres em solução, como também observado por Santos et al. (2018).

A diminuição da viscosidade pode ser atribuída às interações alteradas entre os componentes da mistura. À medida que a concentração de Q-CHX aumenta, pode interromper as interações intermoleculares entre as moléculas, levando a um arranjo menos estruturado e a uma subsequente diminuição da viscosidade.

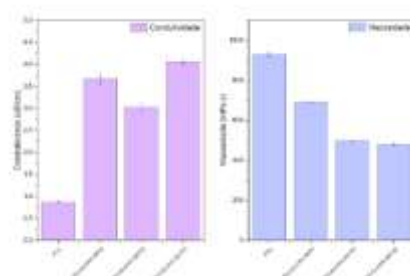


Figura 2 – Relação entre a tensão superficial (a) e viscosidade (b) das soluções eletrofiáveis com a proporção mássica de Q-CHX nas blendas.

CONCLUSÕES:

Neste estudo, desenvolvemos com sucesso fibras eletrofiadas contendo quitosana modificada com digluconato de clorexidina (DCHX) com potencial para atividade virucida eficiente contra vírus como o SARS-CoV-2. A Q-CHX sintetizada foi caracterizada por espectroscopia FTIR, confirmando a incorporação bem-sucedida de DCHX na estrutura da quitosana. Testes virucidas demonstraram a notável eficiência do Q-CHX na inativação do vírus MHV-3, alcançando uma taxa de inativação de 99% após apenas 5 minutos de contato. O material apresentou não citotoxicidade para células saudáveis, garantindo sua segurança para aplicações antivirais. Além disso, as soluções poliméricas com conteúdo variável de Q-CHX mostraram condutividade elétrica e viscosidade controláveis, oferecendo a possibilidade de materiais sob medida para várias aplicações. A combinação de quitosana e digluconato de clorexidina mostra-se promissora como um agente antiviral eficaz, garantindo mais pesquisas para possíveis aplicações clínicas.

BIBLIOGRAFIA

AHMAD, A. L.; FAROOQUI, U. R.; HAMID, N. A. **Synthesis and characterization of porous poly(vinylidene fluoride-co-hexafluoro propylene) (PVDF-co-HFP)/poly(aniline)(PANI)/graphene oxide (GO) ternary hybrid polymer electrolyte membrane.** *Electrochimica Acta*, v. 283, p. 842-849, 3018.

BAVATHARANI, C.; MUTHUSANKAR, E.; WABAIDUR, S. M.; ALOTHMAN, Z. A.; et al. **Electrospinning technique for production of polyaniline nanocomposites/nanofibres**

for multi-functional applications: A review. *Synthetic Metals*, 2020.

BRANCA, C.; D'ANGELO, G.; CRUPI, C.; KHOUZAMI, K.; et al. **Role of the OH and NH vibrational groups in polysaccharide-nanocomposite interactions: A FTIR-ATR study on chitosan and chitosan/clay films.** *Polymer*, v. 99, 614-622, 2016.

CHEN, L. et al. **Electrospun cellulose acetate fibers containing chlorhexidine as a bactericide.** *Polymer*, v. 49, n. 5, p. 1266–1275, 2008.

DELGADILLO-ARMENDARIZ, Nancy L. et al. **Interactions of chitosan/genipin hydrogels during drug delivery: A QSPR approach.** *Química Nova*, [s. l.], v. 37, n. 9, p. 1503–1509, 2014.

Fernandez, M., Guedes, MIF, Langa, GPJ et al. **Eficácia virucida da clorexidina: uma revisão sistemática.** *Odontologia*, v. 110, 376-392, 2022.

SHRUTI, V. C.; PÉREZ-GUEVARA, F.; ELIZALDE-MARTÍNEZ, I.; KUTRALAMMUNIASAMY, G. **Reusable masks for COVID-19: A missing piece of the microplastic problem during the global health crisis.** *Marine Pollution Bulletin*, v. 161, 2020.

SANTOS, D. M.; LEITE, I. S. et al. **Nanostructured electrospun nonwovens of poly(ϵ -caprolactone)/quaternized chitosan for potential biomedical applications.** *Carbohydrate Polymers*, v. 186, p. 110-121, 2018.

ZHANG, Z.; JI, D.; HE, H.; RAMAKRISHNA, S. **Electrospun ultrafine fibers for advanced face masks.** *Materials Science and Engineering R: Reports*, v. 143, n. 100594, 2021.