



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Quaternização da goma de cajueiro para aplicação como biomaterial antiestafilocócico – Caracterização química, atividade antibacteriana e biocompatibilidade celular**

Patrick Veras Quelemes

Teresina-PI  
2016

Patrick Veras Quelemes

**Quaternização da goma de cajueiro para aplicação como biomaterial antiestafilocócico – Caracterização química, atividade antibacteriana e biocompatibilidade celular**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia (Área de concentração: Biotecnologia em Saúde).

Orientador: Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Durcilene Alves da Silva

Teresina-PI  
2016

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco  
Serviço de Processamento Técnico

- Q3q Quelemes, Patrick Veras.  
Quaternização da goma de cajueiro para aplicação como biomaterial antiestafilocócico – Caracterização química, atividade antibacteriana e biocompatibilidade celular / Patrick Veras Quelemes. -- 2016.  
61 f. : il.
- Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.  
“Orientação: Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite.”  
“Coorientação: Prof. Dr. Durcilene Alves da Silva.”
1. Goma de cajueiro - Quaternização. 2. Biocompatibilidade celular. 3. Propriedade antibacteriana. 4. Staphylococcus spp.  
I. Título.

CDD 579.353



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
 PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
 Campus Universitário "Ministro Petrônio Portella" – Bairro Sincop – Centro de Ciências Agrárias - CCA  
 Telefone: (86) 3217-3331 – e-mail: renorbio@ufpi.edu.br  
 CEP 64049-550 – Teresina-PI

## FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: PATRICK VERAS QUELEMES

TÍTULO DO PROJETO: "Quaternização da goma de cajueiro para aplicação como biomaterial antiestafilocócico – Caracterização química, atividade antibacteriana e biocompatibilidade celular".

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite

BANCA EXAMINADORA:

	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite, UFPI (Orientador/Presidente)	Satisfatório	
Profa. Dra. Durcilene Alves da Silva – UFPI (Coorientadora)	Satisfatório	
Profa. Dra. Profa. Dra. Carla Eiras – UFPI (Examinadora)	Satisfatório	
Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima - UESPI (Examinador)	Satisfatório	
Prof. Dr. Humberto Medeiros Barreto - UFPI (Examinador)	SATISFATORIO	
Profa. Dra. Katherine Athayde Teixeira de Carvalho – Instituto de Pesquisa Pelé - Pequeno Príncipe (Examinadora)	SATISFATORIO	

DATA DA AVALIAÇÃO: 25 de novembro de 2016.

HORÁRIO: 15h

LOCAL: Auditório do NUPCelt/UFPI.

## AGRADECIMENTOS

À RENORBIO – Rede Nordeste de Biotecnologia – Ponto Focal UFPI, pela possibilidade de realizar esta pós-graduação. Aos meus professores, muitos dos quais me espelho. Ao Núcleo de Pesquisas em Biodiversidade e Biotecnologia (Biotec), onde encontrei minha primeira morada como cientista e, no qual, esta tese nasceu, cresceu e frutificou. A todos os colaboradores, que direta ou indiretamente participaram do desenvolvimento desta pesquisa. Aos pesquisadores da UFPI (Parnaíba e Teresina), Universidade Federal do Ceará, Universidade de Brasília, Universidade do Porto e Instituto Superior de Biotecnologia do Porto, os quais prestaram valiosa contribuição na execução dos experimentos apresentados neste estudo. Aos meus orientadores, a quem eu tanto prezo e admiro, Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite e Prof<sup>a</sup>. Dra. Durcilene Alves da Silva, pelo total apoio na condução deste trabalho de tese, além das incontáveis lições, incentivo, confiança e amizade. **Ao meu porto seguro, minha família, pelo apoio, presença e companheirismo nessa jornada a qual chamamos de vida. Como meu alicerce, agradeço a Deus, Inteligência Suprema, pela vida e possibilidades diárias de engrandecimento espiritual.**



“Venham até a borda,  
ele disse.  
Eles disseram:  
Nós temos medo.  
Venham até a borda,  
ele insistiu.  
Eles foram.  
Ele os empurrou...  
E eles voaram.”

*Guillaume Apollinaire*

## RESUMO

A goma de cajueiro (GC) é um heteropolissacarídeo aniônico natural com potencial uso na indústria farmacêutica e alimentícia, além de promissora aplicação em (nano)biotecnologia. Alterações químicas na estrutura desse polímero vêm sendo executadas no intuito de se obterem novas propriedades, no entanto, ainda não foram realizadas modificações por introdução de grupos funcionais com objetivo de torná-la catiônica, o que poderia alterar, por exemplo, suas atividades farmacológicas, como a antimicrobiana. Este trabalho objetiva modificar quimicamente a GC por reação de quaternização, avaliar o efeito da goma de cajueiro quaternizada (GCQ) sobre bactérias do gênero *Staphylococcus*, bem como sua biocompatibilidade celular. Para a produção de três derivados quaternizados de goma de cajueiro (derivados GCQ), adicionou-se a uma solução de GC, cloreto de trimetilamônio e hidróxido de sódio, em três diferentes proporções de razões molares. Após uma reação de 14 h sob aquecimento em banho-maria; ajustou-se o pH e procedeu-se a precipitação de cada goma modificada utilizando-se acetona, seguindo-se por diálise e liofilização. Os derivados obtidos (GCQ-1, GCQ-2 e GCQ-3) foram caracterizados por: espectroscopia na região de infravermelho, análise elementar, potencial Zeta e espectroscopia de ressonância magnética nuclear 2D (correlação heteronuclear  $^1\text{H};^{13}\text{C}$ ). Também foi calculado o grau de substituição do grupo químico introduzido na estrutura desses modificados. A atividade antiestafilocócica dos derivados GCQ foi avaliada pela determinação das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas (CIM e CBM) e por microscopia de força atômica. A biocompatibilidade sobre eritrócitos, queratinócitos e fibroblastos também foi verificada, por meio dos testes de hemólise e de citotoxicidade. Os métodos de caracterização selecionados para este estudo confirmaram a modificação da GC. Os três derivados GCQ apresentaram promissora atividade antiestafilocócica, com potência crescente relacionada ao aumento do grau de substituição do grupamento amônio quaternário introduzido na estrutura da goma. Destacou-se, por exemplo, o efeito do derivado GCQ-3 sobre uma linhagem de *S. aureus* resistente à metilina, com obtenção de CIM em valor de 31,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e CBM igual a 62,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Os derivados GCQ também apresentaram biocompatibilidade sobre as células testadas, sugerindo, deste modo, que os mesmos possam ser aplicados como ferramenta para o desenvolvimento de biomateriais com ação antisséptica.

**Palavras-chaves:** Goma de cajueiro; quaternização; antibacteriana; *Staphylococcus* spp.; biocompatibilidade.

## ABSTRACT

Cashew gum (CG) is a natural anionic heteropolysaccharide with potential use in the pharmaceutical and food industry, beyond promising application in (nano)biotechnology. Chemical changes in this polymer structure have been carried out in order to obtain new properties, however until now there were no reports of modifications by introduction of functional groups to add it cationic character, which could change, for instance, its pharmacological activities, such as antimicrobial. This work aims to modify chemically the CG by using quaternization reaction, evaluate the quaternized cashew gum (QCG) effect on bacteria of the *Staphylococcus* genus, beyond to access its cellular biocompatibility. To a solution of CG, trimethylammonium chloride and sodium hydroxide, at three different molar ratios proportions, were added to produce quaternized cashew gum derivatives (QCG). After a 14 h reaction under heating in a water bath, the pH was adjusted and carried out the precipitation of each modified gum using acetone, followed up for dialysis and lyophilization. The obtained derivatives (QCG-1, QCG-2 and QCG-3) were characterized by: infrared spectroscopy, elemental analysis, Zeta potential and 2D nuclear resonance spectroscopy ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronuclear correlation). The degree of substitution of the introduced chemical group on these modified structures was also calculated. The QCG derivatives anti-staphylococcal activity was evaluated by determining minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and MBC) and by using atomic force microscopy. Biocompatibility on erythrocytes, keratinocytes and fibroblasts was also accessed through hemolytic and cell toxicity assays. The characterization methods selected for this study have confirmed the CG chemical modification. The three QCG derivatives presented promising anti-staphylococcal activity, with potency related to the increasing degree of substitution of quaternary ammonium group introduced on the gum structure. It was highlighted, for instance, the QCG-3 derivative effect against a methicillin-resistant *S. aureus* strain, with MIC value of 31.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and MBC at 62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The QCG derivatives also presented biocompatibility on tested cells, thus suggesting that it could be applied as tool for the development of biomaterials with antiseptic action.

**Keywords:** Cashew gum; quaternization; antibacterial; *Staphylococcus* spp.; biocompatibility.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	6
INTRODUÇÃO .....	10
OBJETIVOS .....	12
▪ Objetivo geral .....	12
▪ Objetivos específicos .....	12
CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO .....	13
1.1 – Características gerais da goma de cajueiro e suas propriedades farmacológicas .....	13
1.2 – Modificações químicas da goma de cajueiro por introdução de grupos funcionais .....	17
1.3 – Panorama da importância da busca por agentes antiestafilocócicos .....	20
1.4 – Potencial da goma de cajueiro para o desenvolvimento de biomateriais .....	23
Referências bibliográficas .....	27
CAPÍTULO 2 - ARTIGO PUBLICADO (tradução para língua portuguesa) .....	33
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS .....	62

## INTRODUÇÃO

---

A goma de cajueiro (GC) é um polímero natural que pode ser utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica (DE PAULA, HEATLEY e BUDD, 1998; GOWTHAMARAJAN et al., 2011; KUMAR et al., 2012; PORTO e CRISTIANINI, 2014), além de promissora aplicação no campo da (nano)biotecnologia (SILVA et al., 2009; ARARUNA et al., 2013; QUELEMES et al., 2013; DIAS et al., 2016; ABREU et al., 2016).

Estudos acerca de suas propriedades farmacológicas têm revelado uma variada gama de atividades, dentre elas: antimicrobiana (TORQUATO et al., 2004; CAMPOS et al., 2012), antitumoral (MOTHÉ, SOUZA e CALAZANS, 2008), cicatrizante (SCHIRATO et al., 2006), imunomodulatória (YAMASSAKI et al., 2015), antidiarreica (ARAÚJO et al. 2015) e gastroprotetora (CARVALHO et al., 2015).

No intuito de se obterem características físicas e químicas diferenciadas, além de melhorias em suas potencialidades tecnológicas, modificações químicas na estrutura polimérica da GG por meio da introdução de grupos funcionais têm sido propostas (RIBEIRO et al., 2016). Tais modificações correspondem aos processos de: carboximetilação (SILVA et al., 2004); oxidação (CUNHA et al., 2007); sulfatação (MOURA NETO et al., 2011) e acetilação (PITOMBEIRA et al., 2015). Entretanto, constata-se que não há relatos, até o presente momento, da realização de reações de funcionalização polimérica que visassem torná-la catiônica. Tal aquisição de cargas positivas pela GC, além de poder acarretar em modificações em suas características químicas, poderia também alterar suas propriedades farmacológicas como, por exemplo, a antibacteriana (YU et al., 2007; NICHIFOR et al, 2010; NOVAC et al., 2014), devido à possibilidade de uma melhor interação eletrostática entre goma catiônica e a superfície celular bacteriana carregada negativamente (JENNINGS et al., 2015).

Deste modo, no tocante às possibilidades de modificações químicas de polímeros, quando do intuito de produzirem-se derivados catiônicos, constata-se que diversos polissacarídeos oriundos de produtos naturais vêm sendo modificados por reação com compostos de amônio quaternário (SINGH, PAL e ALI, 2014). Nesse

processo, porções catiônicas são introduzidas na estrutura desses polímeros, principalmente, utilizando reagentes como o cloreto de N-(3-cloro-2-hidroxipropil) trimetilamônio (YU et al., 2007; PAL, MAL e SIGH, 2007; SAJOMSANG, GONIL e TANTAYANON, 2009; BANERJEE et al., 2013).

Os derivados quaternizados adquirem, assim, novas ou aprimoradas propriedades como: alta solubilidade em água (SAJOMSANG, GONIL e TANTAYANON, 2009), ação floculante (PAL, MAL e SIGH, 2007; PAL et al., 2009; SINGH, PAL e ALI, 2014), capacidade de carreamento de genes (SONG et al., 2008) e atividade antibacteriana (YU et al., 2007; NICHIFOR et al., 2010; HU e WANG, 2016).

Nesse contexto, devido ao potencial antimicrobiano inerente aos agentes catiônicos, além da possibilidade de uso tópico (JENNINGS et al., 2015), esses podem exercer valiosa contribuição para a prevenção e tratamento de infecções cutâneas, particularmente aquelas causadas por bactérias do gênero *Staphylococcus* (IOANNOU et al., 2007; CRISMARU et al., 2011). A espécie *S. aureus*, por exemplo, é um patógeno oportunista relacionado a severas infecções de pele e tecidos moles, com capacidade de promover infecções hospitalares, principalmente, devido à sua habilidade em adquirir resistência aos antibióticos (DELEO e CHAMBERS, 2009; YU et al., 2015), sendo um problema atual que vem motivando a busca por agentes capazes de combatê-lo (PASBERG-GAUHL, 2014).

Deste modo, baseando-se na lacuna existente referente à ausência de relatos de modificação da GC por introdução de grupamentos químicos que lhe confira perfil catiônico; na formulação da hipótese de que essa modificação promoveria o aumento de seu efeito antibacteriano; além da justificativa da necessidade de novos materiais com propriedades antissépticas e biocompatíveis, este trabalho visa, portanto, realizar uma modificação química na GC por reação de quaternização, com finalidade de produzir uma goma de cajueiro quaternizada, avaliar seu efeito sobre bactérias do gênero *Staphylococcus*, além de verificar sua biocompatibilidade celular.

## OBJETIVOS

---

### Objetivo Geral

Modificar quimicamente a goma de cajueiro por reação de quaternização e avaliar o efeito da goma de cajueiro quaternizada sobre bactérias patogênicas do gênero *Staphylococcus*, bem como sua biocompatibilidade celular.

### Objetivos Específicos

- Modificar quimicamente a GC por meio de reação de quaternização;
- Caracterizar a goma de cajueiro quaternizada (GCQ) por meio dos seguintes métodos: análise elementar; espectroscopia na região de infravermelho; potencial Zeta e espectroscopia de ressonância magnética nuclear;
- Avaliar a atividade antibacteriana da GCQ pela determinação das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas sobre linhagens padrões e isolados clínicos, sensíveis e resistentes de *S. aureus* e *S. epidermidis*;
- Avaliar por meio de microscopia de força atômica, o perfil de dano celular causado pela GCQ sobre uma linhagem de *S. aureus*;
- Avaliar a biocompatibilidade da GCQ sobre hemácias, queratinócitos e fibroblastos.

## CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 - Características gerais da goma de cajueiro e suas propriedades farmacológicas

O cajueiro, *Anacardium occidentale* L., árvore pertencente à família Anacardiaceae, é considerado uma das culturas de maior importância econômica do nordeste brasileiro, sendo seu principal produto comercializado a castanha. No entanto, constata-se que existe potencial para a exploração e industrialização da goma exsudada do seu caule (DE PAULA, HEATLEY e BUDD 1998; LIMA et al., 2002; CUNHA et al., 2009; LIMA, MAIA e LIMA, 2013).

O exsudato do caule do cajueiro, também conhecido como goma de cajueiro (Figura 1A), é um heteropolissacarídeo ramificado ácido de caráter aniônico (DE PAULA e RODRIGUES, 1995), com potencialidade de aplicação na indústria farmacêutica (KUMAR et al., 2009; OKOYE, ONYEKWELI e FATOKI, 2012) e alimentícia (MOTHÉ e CORREIA, 2002; PINTO et al., 2015).

**A****B**

Figura 1. A. Exsudato do caule do cajueiro (Fonte: Ana Karina Lustosa); B. Goma de cajueiro isolada e purificada (Fonte: próprio autor)

O mesmo pode ser obtido naturalmente em resposta a agressões microbianas ou intempéries físicas, ou também, por incisões feitas no tronco e ramos da árvore, apresentando-se como resina de coloração amarelada, solúvel em água (KUMAR et al., 2012). Agentes químicos, tais como combinações de ácido sulfúrico, dimetil sulfóxido, *ethephon* e ácido 2 – cloroetilfosfônico, também vêm sendo utilizados com intuito de provocar exsudação dessa goma (BANDEIRA, 1991; LIMA et al., 2001).

A purificação da GC tem sido realizada por diversos métodos, porém, com algumas características de execução em comum, resumidas por Ribeiro et al. (2016) do seguinte modo: após a dissolução do exsudato bruto em água e neutralização do conteúdo ácido por adição de uma base, uma primeira purificação objetiva remover os cátions presentes no mesmo, com a adição de excesso de NaCl; após essa etapa, procede-se com a filtração e a precipitação da goma pela lavagem com etanol ou acetona, o que remove o excesso de sal, garantido o isolamento do polissacarídeo. Esse processo pode ser repetido várias vezes, com intuito de se garantir uma efetiva purificação da goma (Figura 1B).

Anderson e Bell (1975) caracterizaram a GC originária da Índia e constataram a presença das seguintes quantidades relativas de unidades monossacarídicas: 61% de galactose; 14% de arabinose; 7% de raminose; 8% de glicose e 5% de ácido glicurônico, além de traços de manose, xilose e ácido 4-O-metilglicurônico (menor que 2%). A análise da goma também indicou que a mesma possui uma estrutura de galactose altamente ramificada, constituindo-se por uma cadeia principal com ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) e, de cadeias laterais, com ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6) (Figura 2). A arabinose está presente como grupo terminal ou em ramificações curtas. Glicose, raminose, manose e xilose estão presentes como grupos terminais.

De Paula, Heatley e Budd (1998) também realizaram um estudo obtendo informações sobre a composição, estrutura e distribuição de massa molar da GC originária do nordeste brasileiro. A distribuição de massa molar para o polissacarídeo exibiu dois picos principais de 28000 e 67000 g/mol. Na avaliação da composição, foram encontradas as presenças de: 72% de galactose; 14% de glicose; 4,6% de arabinose; 3,2% de raminose e 4,5% de ácido glicurônico. De Paula e Rodrigues (1995) relataram, também, a presença de em torno de 6% de um complexo polissacarídeo-proteína compondo a estrutura da GC.

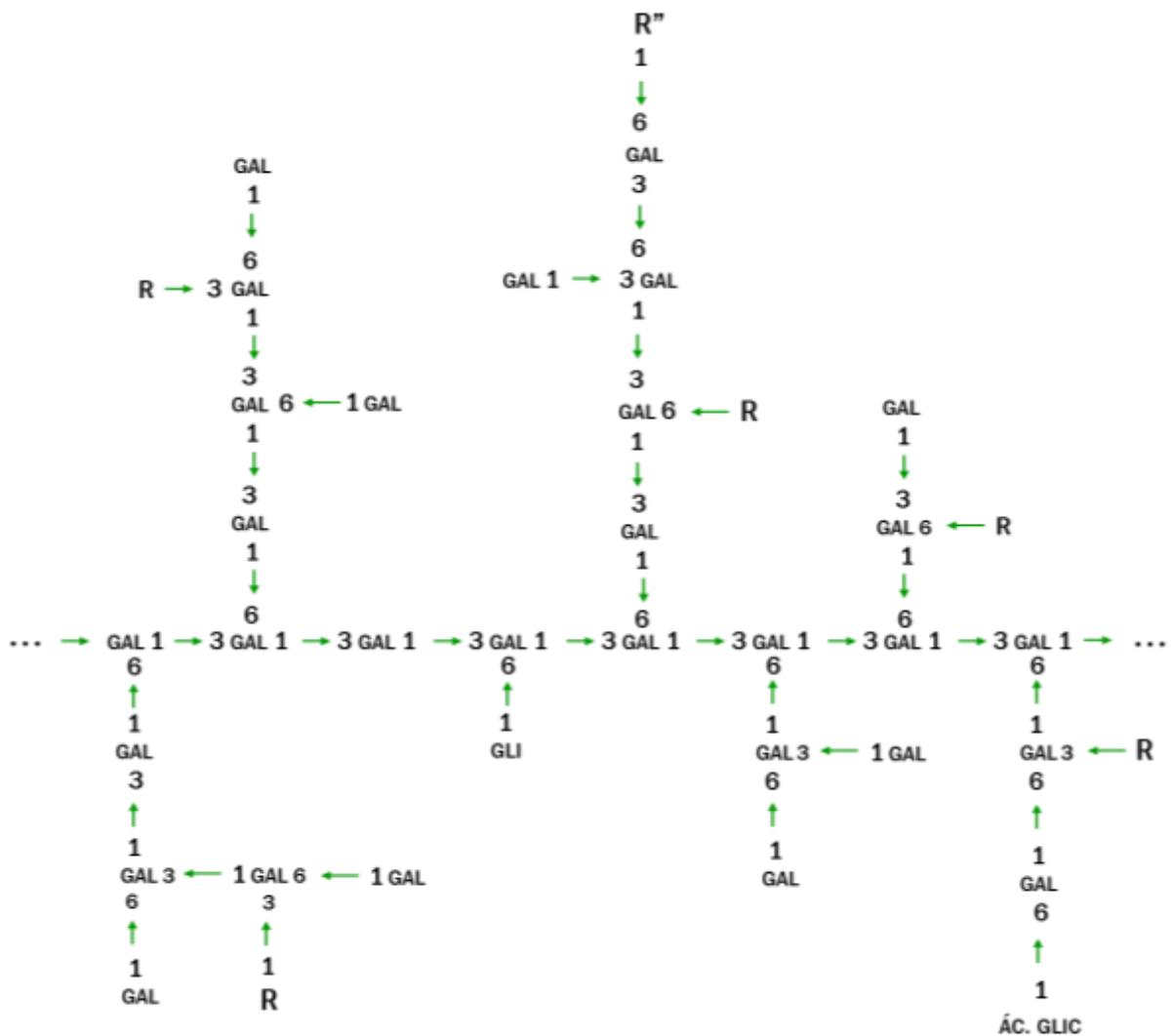


Figura 2. Estrutura da goma de cajueiro. GAL (galactose); GLI (glicose); ÁC. GLIC (ácido glicurônico). R representa: D-manose, D-xilose, L-raminose ou L-arabinose. R'' representa: D-glicose ou ácido D-glicurônico (adaptada de Anderson e Bell, 1975).

No estudo da estrutura, por meio da análise de espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  da GC intacta e degradada, foi possível observar a presença de três tipos de ligações dentro das ramificações da cadeia principal de galactose: ligações em C-1 e C-3, em C-1 e C-6, e em C-1, C-3 e C-6 (DE PAULA, HEATLEY e BUDD, 1998).

Para além de análises de caracterização química, devido ao interesse de investigação do efeito biológico de produtos naturais, a GC também vem sendo estudada quanto às suas propriedades farmacológicas. A tabela 1 apresenta os principais estudos relacionados a esses efeitos, os quais são de interesse para a área da saúde.

Tabela 1. Atividades farmacológicas da GC e características gerais de seus efeitos.

<b>Autores (ano)</b>	<b>Atividade farmacológica</b>	<b>Característica geral do estudo e conclusão</b>
Torquato et al. (2004)	Antimicrobiana	Estudo <i>in vitro</i> (método de diminuição de biomassa microbiana) no qual a CG apresentou fraca atividade sobre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Ausência de efeito sobre <i>S. aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> .
Schirato et al. (2006)	Cicatrizante	Uma emulsão de CG associada ao ácido ascórbico foi avaliada na fase inflamatória do processo cicatricial em camundongos, na qual, seu uso propiciou sinais de inflamação menos acentuados, compatíveis com um processo de reparação mais avançado, do ponto de vista histopatológico.
Mothé, Souza e Calazans (2008)	Antitumoral	Estudo no qual a CG, aplicada intraperitonealmente, exibiu atividade inibitória sobre tumor sólido de sarcoma 180 implantado subcutaneamente em virilha em ratos.
Campos et al. (2012)	Antimicrobiana	Estudo <i>in vitro</i> (determinação da concentração inibitória mínima - CIM) no qual a CG apresentou fraca atividade sobre <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> (CIM em torno de 20 mg/mL).
Yamassaki et al. (2015)	Imunomodulatória	Estudo <i>in vitro</i> em cultura de macrófagos peritoneais murinos no qual se avaliou o efeito da GC sobre marcadores inflamatórios. Observou-se diminuição dos níveis de óxido nítrico, interferon gama e interleucina 6.
Araújo et al. (2015)	Antidiarreica	Trabalho no qual foi atestado o efeito antidiarreico da GC sobre modelos de diarreia aguda, inflamatória e secretória em ratos. Os resultados corroboraram o uso tradicional para tratamento de diarreia.
Carvalho et al. (2015)	Gastroprotetora	Nesse estudo foi constatado o efeito gastroprotetor (anti-ulcerogênico e anti-inflamatório) da GC sobre estômago de ratos com gastrite induzida por naproxifeno.

Os mecanismos de ação farmacológicos produzidos pela GC em relação aos efeitos apresentados na tabela 1 não estão completamente elucidados. Discute-se, por exemplo, a possibilidade de que o efeito antimicrobiano possa estar relacionado à presença de ácido anacárdico em sua composição (TORQUATO et al., 2004; CAMPOS et al., 2012).

Já a diminuição de marcadores inflamatórios, apresentada por Yamassaki et al. (2015), corrobora com os resultados observados quanto ao efeito gastroprotetor (anti-ulcerogênico) e antidiarreico (diarreia induzida por inflamação), sobre os quais também se observou a inibição da prostaglandina E<sub>2</sub>, intimamente relacionada a processos inflamatórios (ARAÚJO et al., 2015; CARVALHO et al. 2015). Estudos mais aprofundados fazem-se necessários para se considerar que o efeito cicatrizante (SCHIRATO et al., 2006) e antitumoral (MOTHÉ, SOUZA e CALAZANS, 2008) possam também estar relacionados aos processos de imunomodulação.

Neste ponto, cabe destacar-se, também, o resultado obtido pelo trabalho de Okoye, Onyekweli e Fatoki (2012), no qual se buscou estimar a DL50 (dose letal para 50% dos animais avaliados) da GC sobre coelhos. Os autores não observaram sinais de toxicidade ou morte até uma dose de 5000 mg/kg, quando a solução de goma foi administrada por via oral. Considerando-se, portanto, uma DL50 > 5000 mg/kg, o estudo sugere segurança na administração oral da solução de GC sobre esse modelo animal.

## **1.2 – Modificações químicas da goma de cajueiro por introdução de grupos funcionais**

As gomas naturais representam uma das mais importantes matérias-primas industriais e têm sido sujeitas a intensas pesquisas devido à sua sustentabilidade, biodegradabilidade e biossegurança (RANA et al., 2011). Assim, para a obtenção de novas características da GC, por exemplo, estudos que propuseram modificações em sua estrutura, por meio de reações de funcionalização polimérica, utilizando diversos reagentes, têm sido relatados (Silva et al., 2004; Cunha et al., 2007; Moura Neto et al., 2011 e Pitombeira et al., 2015). Tais modificações possuem o potencial de melhorar suas potencialidades tecnológicas e funcionais (RIBEIRO et al., 2016).

A tabela 2 resume os estudos que realizaram modificações por introdução de grupos funcionais na GC e suas principais novas características adquiridas ou aprimoradas, após as modificações.

Tabela 2. Modificações químicas da GC por introdução de grupos funcionais.

<b>Modificação</b>	<b>Autores e características gerais</b>
<b>Carboximetilação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <u>Silva et al. (2004)</u>;</li> <li>▪ Principal reagente: ácido monocloroacético;</li> <li>▪ Aumento da hidrofiliidade;</li> <li>▪ Menor viscosidade.</li> </ul>
<b>Oxidação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <u>Cunha et al. (2007)</u>;</li> <li>▪ Principal reagente: (2,2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) “Reagente TEMPO”;</li> <li>▪ Melhoramento do comportamento polieletrólítico;</li> <li>▪ Aumento da viscosidade em 10%.</li> </ul>
<b>Sulfatação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <u>Moura Neto et al. (2011)</u>;</li> <li>▪ Principal reagente: ácido clorossulfônico;</li> <li>▪ Obtenção de um polieletrólito mais reativo;</li> <li>▪ Discreto aumento na viscosidade.</li> </ul>
<b>Acetilação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <u>Pitombeira et al. (2015)</u>;</li> <li>▪ Principal reagente: anidrido acético;</li> <li>▪ Propriedades anfífilicas (diminuição da hidrofiliidade);</li> <li>▪ Utilizada para síntese de nanopartículas poliméricas.</li> </ul>

Pelo levantamento bibliográfico realizado constata-se que, até o momento, não foi proposto qualquer tipo de modificação a partir da introdução de um grupamento funcional que fornecesse à GC uma característica catiônica. Nesse contexto, para essa finalidade, constata-se que diversos polímeros naturais vêm sendo modificados por reação com compostos de amônio quaternário (SINGH, PAL e ALI, 2014).

Para os processos de quaternização envolvendo polissacarídeos, geralmente, promove-se a reação de um reagente amônio quaternário, como o cloreto de N-(3-cloro-2-hidroxipropil) trimetilamônio, com o hidróxido de sódio como agente catalisador da reação. Desse modo, uma forma epóxida do reagente catiônico é formada, sendo essa capaz de reagir prontamente com grupos hidroxilas ou amino

primários das unidades monoméricas do polissacarídeo, por via de substituição nucleofílica, introduzindo-se, desse modo, o substituinte amônio quaternário na estrutura do polímero (YU et al., 2007; SAJOMSANG, GONIL e TANTAYANON, 2009; PAL et al. 2009; BANERJEE et al., 2013).

Na tabela 3 estão apresentados estudos relacionados à modificação de polímeros naturais por meio de reação de quaternização, além de suas atividades aprimoradas ou adquiridas.

Tabela 3. Estudos referentes à quaternização de produtos naturais.

<b>Autores (ano)</b>	<b>Polissacarídeo natural</b>	<b>Principal atividade aprimorada ou adquirida</b>
Yu et al. (2007)	Glicomanana konjak	Atividade antimicrobiana
Pal, Mal, Sigh (2007)	Goma guar	Ação floculante
Song et al. (2008)	Celulose	Capacidade de carreamento de genes
Pal et al. (2009)	Casca de tamarino	Ação floculante
Sajomsang, Gonil e Tantayanon (2009)	Quitosana	Aumento da solubilidade em água
Nichifor et al. (2010)	Dextrana Pululana	Atividade antimicrobiana
Wang e Xie (2010)	Amido	Menor temperatura de degradação térmica
Banerjee et al. (2013)	Goma guar	Ação floculante
Novac et al. (2014)	Goma gelana	Atividade antimicrobiana
Singh, Pal e Ali (2014)	Amido Amilase Amilopectina Glicogênio Quitosana	Ação floculante
Hu e Wang (2016)	Celulose	Melhor interação com álcool polivinil para preparação de filmes com ação antibacteriana

Como observado na tabela 3, considerando-se plausível a possibilidade de quaternização da GC já que, outros polissacarídeos, inclusive gomas, têm sido submetidos a esse tipo de reação. Portanto, é esperado que com a produção da goma de cajueiro quaternizada, esse polímero venha a sofrer modificações em suas propriedades físicas e químicas. Além disso, e por consequência, pode-se conjecturar, também, que esse novo material seja passível de alterações em suas propriedades farmacológicas, podendo essas, serem distintas daquelas apresentadas na tabela 1, em especial, em relação ao efeito antibacteriano, em corroboração aos trabalhos de Yu et al. (2007), Nichifor et al. (2010) e Novac et al. (2014).

### 1.3 – Panorama da importância da busca por agentes antiestafilocócicos

Os estafilococos foram descritos pela primeira vez em pus de abscessos cirúrgicos e, atualmente, destacam-se entre os micro-organismos mais comuns nas infecções piogênicas no mundo. São bactérias Gram-positivas, sendo que, as duas principais espécies envolvidas em processos patogênicos humanos são: *S. aureus* e *S. epidermidis* (SANTOS et al., 2007). O nome *Staphylococcus* provém da palavra grega *staphylé*, que significa “cachos de uva”, pelo fato de possuírem forma esférica e capacidade de se dividir em todos os planos, formando arranjos que lembram tais cachos (Figura 3). Esses micro-organismos possuem diâmetro entre 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$ , são aeróbios facultativos, imóveis e catalase positivos (BANNERMAN e PEACOCK, 2007).

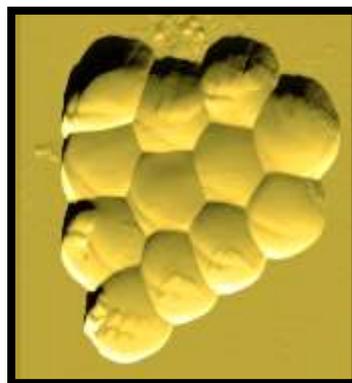


Figura 3. Microscopia de força atômica evidenciando a bactéria *S. aureus* formando um aglomerado típico do gênero *Staphylococcus* em formato de “cacho de uva” (Fonte: próprio autor)

As infecções causadas por *S. aureus* podem possuir um caráter agudo, apresentando-se como pústulas, furúnculos, impetigos ou processos mais extensos e graves, como osteomielite, pneumonia, endocardite e meningite. Doenças também podem ser causadas por toxinas de estafilococos, apresentando um largo espectro de manifestações clínicas, dentre as quais se destacam: celulite, síndrome do choque tóxico e intoxicação alimentar (TONG et al., 2015).

Já o *S. epidermidis* é considerada uma bactéria comensal inócuo da pele humana, porém, a mesma vem se destacando como um importante patógeno relacionado a infecções de dispositivos médicos como próteses e catéteres, por sua capacidade de formar biofilmes, além do fato de estarem, cada vez mais, apresentando resistência aos antibióticos (HUEBNER e GOLGMANN, 1999; VOUNG et al., 2003).

Para combater esses estafilococos, foram desenvolvidas penicilinas antiestafilocócicas, como a meticilina e a oxacilina, além de seus derivados. Entretanto, logo surgiram linhagens resistentes a elas. Nesses patógenos, especialmente os *S. aureus* resistentes à meticilina (SARM), a resistência é resultado de alterações de genes cromossômicos que codificam modificações no receptor dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, as proteínas ligadoras de penicilina (SOUZA, REIS e PIMENTA, 2005; DELEO e CHAMBERS, 2009).

Outro antibiótico sobre o qual as bactérias também vêm apresentando resistência é a mupirocina (UPTON, LANG e HEFFERNAN, 2003). Esse agente de uso tópico, com relevante atividade contra os estafilococos é utilizado no tratamento de infecções de pele e também para controlar, profilaticamente, a propagação de SARM, por meio de aplicação intranasal, importante sítio de colonização desse micro-organismo (LAUPLAND e CONLI, 2003).

No contexto da antissepsia, diversos agentes são utilizados para a diminuição da carga microbiana, especialmente na pele e em ferimentos, dentre os quais se destacam: compostos alcoólicos (álcool 70%), biguanidas (clorexidina), compostos halogenados (iodo), oxidantes (peróxido de hidrogênio), íons metálicos (prata, cobre), compostos de amônio quaternário, dentre outros (GONZÁLEZ et al., 2014).

Dentre os citados, os compostos de amônio quaternário (CAQ) possuem efetiva ação antiestafilocócica (IOANNOU et al., 2007; JENNINGS et al., 2015) e têm representado uma das mais visíveis e efetivas classes de desinfetantes utilizadas no começo deste século, devido à sua fácil preparação, ampla variedade estrutural,

além de versátil capacidade de incorporação em diversos produtos (JENNINGS et al., 2015). No entanto, alerta-se para o fato de que, apesar do eficaz potencial antimicrobiano, existem evidências do surgimento de resistência bacteriana aos QAC, associada à produção de bombas de efluxo codificadas por genes denominados *qac* (BROWN e SKURRAY, 2001).

A ação antibacteriana dos CAQ envolve interações eletrostáticas iônicas desses compostos catiônicos com os fosfolípídeos carregados negativamente da membrana citoplasmática das bactérias, o que pode causar a perda da integridade da mesma, podendo acarretar em: vasamento de conteúdo intracelular, inibição respiratória ou coagulação intracelular (DENYER e STEWART, 1998).

Em relação às bactérias Gram-positivas (como os estafilococos), essas possuem externamente à membrana citoplasmática, uma espessa camada composta por peptidoglicano, que também possui cargas negativas devido à presença dos ácidos teicóico e lipoteicóico incorporados em sua estrutura, o que também provoca a atração de agentes catiônicos (TIMOFEEVA e KLESHCHEVA, 2011).

Desse modo, sabendo-se que a carga negativa do ácido fosfórico, presente nos fosfolípídeos da membrana citoplasmática bacteriana, é neutralizada por cátions  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , ocasionando a estabilização da mesma; um mecanismo ação antibacteriano proposto para os CAQ sobre essa membrana decorreria da substituição (troca) destes cátions bivalentes pelas moléculas catiônicas dos CAQ, ocasionando a desestabilização da membrana, resultando nos danos celulares anteriormente citados (CRISMARU et al., 2011).

Ressalta-se que o efeito dos CAQ sobre as bactérias Gram-negativas é reduzido devido a essas possuírem uma membrana adicional externa, constituída por uma camada dupla de fosfolípidos, que atua como barreira para a penetração de tais agentes (JENNINGS et al., 2015).

Outro efeito relatado dos CAQ sobre bactérias corresponde à indução de processo autolítico, que é um evento intracelular na qual as células bacterianas entram em estado de autodestruição. Considera-se que a indução desse fenômeno seja uma importante característica biocida adicional de determinados compostos, principalmente quando aplicados em concentrações sub-inibitórias (IOANNOU et al., 2007).

Baseando-se, portanto, no descrito potencial antimicrobiano dos QAC e na já apontada possibilidade de que com a introdução do grupamento amônio quaternário na estrutura da GC, a mesma venha também a adquirir tal potencialidade, destaca-se nesse ponto que, para uma possível aplicação antimicrobiana da goma de cajueiro quaternizada *per si* ou como agente integrante em formulações de materiais antissépticos, a mesma precisa manter, em níveis satisfatórios, as características biocompatíveis da CG natural.

#### **1.4 – Potencial da goma de cajueiro para o desenvolvimento de biomateriais**

O termo biomaterial é aplicado a determinado sistema que possa entrar em contato com sistemas biológicos e ser tolerado, podendo possuir aplicações diagnósticas, vacinais, cirúrgicas ou terapêuticas, sendo constituídos de compostos de origem sintética ou natural, bem como de materiais naturais quimicamente modificados (PIRES, BIERHALZ e MORAES, 2015). Assim, o essencial requisito para se classificar um material como biomaterial é sua biocompatibilidade, que é a habilidade de gerar uma resposta apropriada do hospedeiro frente a uma determinada aplicação, com consequente limitação dos níveis toxicidade (WILLIAMS, 2014).

Nesse contexto, os polissacarídeos naturais vêm ganhando apreciável interesse para uso no âmbito médico devido a várias de suas propriedades, tais como renovabilidade, biodegradabilidade, além de mimetizar os componentes da matriz extracelular, o que os tornam elementos-chave em processos biológicos. Esses biopolímeros também são muito importantes devido a sua solubilidade e propriedades tecnológicas como: capacidade de gelificação, emulsificação e efeito hidratante, dentre outras (PIRES, BIERHALZ e MORAES, 2015).

Tais polissacarídeos podem ser obtidos a partir de diversas fontes como, por exemplo: microbiana (glicana, xantana, gelana); animal (ácido hialurônico, quitina, quitosana); vegetal (gomas, amido, celulose e pectina) ou de algas (alginato e carragenanas), podendo ser aplicados na engenharia de tecidos, liberação de fármacos, imobilização de células, dentre outras (CUNHA, PAULA e FEITOSA, 2009).

A GC, como já destacado, vem sendo estudada e considerada uma fonte promissora de potencialidades biotecnológicas, com possíveis aplicações na área médica, seja na condição natural ou modificada (RANA et al., 2011; RIBEIRO et al., 2016). Nesse contexto, diversos estudos vêm evidenciando seu perfil de biocompatibilidade sobre várias linhagens celulares, como as apresentadas na tabela 4.

Tabela 4. Linhagens celulares sobre as quais se constatou biocompatibilidade da GC natural; modificada ou associada à nanopartículas ou biomateriais.

<b>Autores (ano)</b>	<b>Aplicação da CG</b>	<b>Linhagens celulares avaliadas</b>
Quelemes et al. (2013)	Utilizada como agente estabilizante de nanopartículas de prata (NanoAg) em estudo no qual a CG também foi avaliada como grupo controle no teste de citotoxicidade das NanoAg.	VERO (fibroblastos de rim de macaco)
Moreira et al. (2015)	Produziram um filme contendo CG e álcool polivinil para imobilização de tripsina, para fins de desenvolvimento de curativos.	PDL (fibroblastos de ligamento periodontal)
Yamassaki et al. (2015)	Aplicação direta da CG sobre macrófagos para avaliação de atividade imunomodulatória.	Macrófagos peritoneais murinos
Dias et al. (2016)	Desenvolveram nanopartículas poliméricas de GC acetilada para incorporação, carreamento e liberação de diclofenaco dietilamina.	OSCC (carcinoma de células escamosas da cavidade oral)
Abreu et al. (2016)	Produziram um copolímero com GC e N-isopropilacrilamida para encapsulamento e carreamento de epirubicina.	Caco-2 (adenocarcinoma col-retal humano) HT29-MTX (células de cólon humano)

A figura 4 apresenta mais um exemplo no qual se observou biocompatibilidade, por meio de uma adaptação do teste de exclusão com corante azul de Tripán, da GC sobre uma linhagem de células fibroblásticas (QUELEMES, 2012). Em síntese, nesse teste *in vitro*, as células com vitalidade não se deixam ser penetradas pelo corante azul de Tripán, enquanto que, nas que sofreram danos na membrana citoplasmática, o corante consegue penetrar o citoplasma, tornando-as pigmentadas (QUELEMES et al., 2013). Observa-se pela figura 4B, que as células tratadas com GC por 48 h apresentam perfil morfológico similar às não tratadas (figura 4A), evidenciando, até mesmo, uma tendência de maior confluência e menor grau de dano celular.

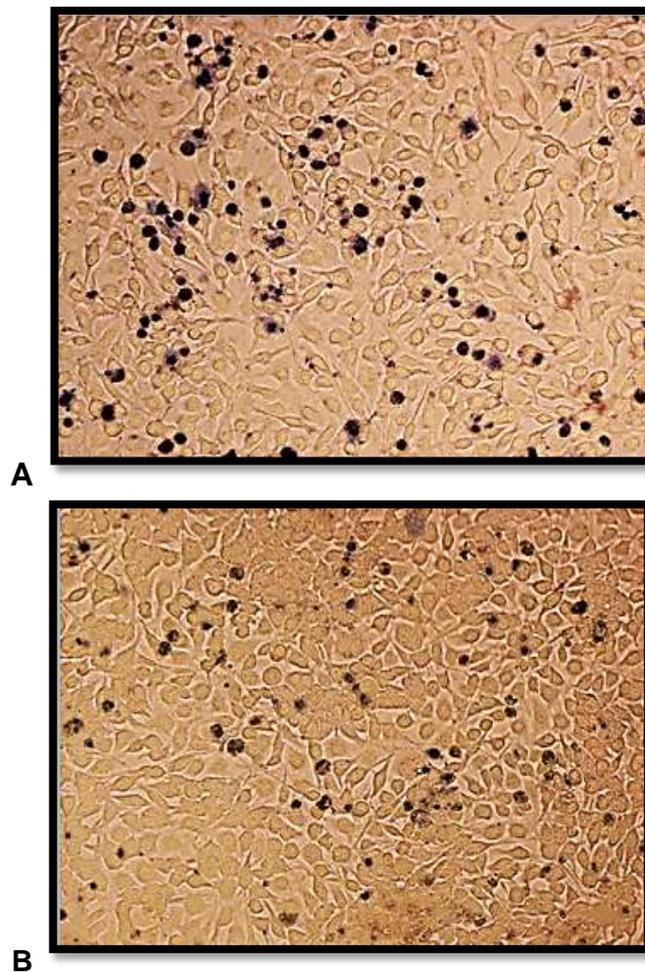


Figura 4. Fibroblastos murinos (linhagem L929) submetidos à coloração com azul de Tripán (0,2%). A. controle de crescimento celular não tratado, após incubação por 48 h; B. células tratadas com 750 µg/mL de GC por 48 h. Fotomicrografias observadas sob um aumento de 400 x sob microscópio óptico invertido (Fonte: próprio autor).

Quanto à questão da biocompatibilidade (além dos efeitos surfactantes, preservantes e antimicrobianos) de compostos quaternários para uso cosmético ou em produtos de higiene pessoal, Jennings et al. (2015) relatam que tais agentes vêm sendo incorporados em sabonetes, produtos para cabelos, cosméticos e até em soluções de lentes de contato, sendo tais aplicações, aprovadas por agências de registro americanas como o *FDA (Food and Drug Administration)*.

Deste modo, como observado pela tabela 4 e figura 4, estando a biocompatibilidade da GC natural evidenciada, espera-se que, com a produção da goma de cajueiro funcionalizada com um grupamento amônio quaternário, essa também venha a manter tal característica, o que seria de grande valor para o desenvolvimento de biomateriais. Dentre esses, vêm ganhando destaque, os curativos bioativos, que podem ser elaborados a partir de produtos naturais para auxílio no tratamento de ferimentos (DHIVYA, PADMA e SANTHINI, 2015).

Além disso, sabendo-se que infecções são frequentemente consideradas como a complicação mais severa e devastadora associada ao uso de biomateriais, considera-se importante os esforços para o desenvolvimento de biomateriais que associem seu perfil de biocompatibilidade a uma característica anti-infecciosa (CAMPOCCIA, MONTANARO e ARCIOLA, 2013).

## Referências bibliográficas

ABREU, C. M. W. S.; PAULA, H. C. B.; SEABRA, V.; FEITOSA, J. P. A.; SARMENTO, B.; PAULA, R. C. M. Synthesis and characterization of non-toxic and thermo-sensitive poly (*N*-isopropylacrylamide)-grafted cashew gum nanoparticles as a potential epirubicin delivery matrix. **Carbohydrate Polymers**, v.154, n.10, p.77-85, 2016.

ANDERSON, D. M.; BELL, P. C. Structural analysis of the gum polysaccharide from *Anacardium occidentale*. **Analytica Chimica Acta**, v.79, p.185-197, 1975.

ARARUNA, F. B.; QUELEMES, P. V.; FARIA, B. E. F.; KUCKELHAUS, S. A. S.; MARANGONI, V. S.; ZUCOLOTTO, V.; SILVA, D. A.; SANTOS JÚNIOR, J. R.; LEITE, J. R. S. A.; EIRAS, C. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles reduced and stabilized by cashew tree gum. **Advanced Science, Engineering and Medicine**, v.5, n.8, p.890-893, 2013.

ARAÚJO, T. S. L.; COSTA, D. S.; SOUSA, N. A.; SOUZA, L. K. M.; ARAÚJO, S.; OLIVEIRA, A. P.; SOUSA, F. B. M.; SILVA, D. A.; BARBOSA, A. L. R.; LEITE, J. R. S. A.; MEDEIROS, J. V. R. Antidiarrheal activity of cashew gum, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.174, p.299-307, 2015.

BANDEIRA, C. T. Métodos de extração da goma de cajueiro. Fortaleza, CE: EMBRAPA - CNPCa, n.6, p.1-2, 1991.

BANERJEE, C.; GHOSH, S.; SEN, G.; MISHRA, S.; SHUKLA, P.; BANDOPADHYAY, R. Study of algal biomass harvesting using cationic gum from the natural plant source as flocculant. **Carbohydrate Polymers**, v.92, p.675-681, 2013.

BANNERMAN, T. L.; PEAKOCK, S. J. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive Cocci. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H., LANDRY, M. L.; PFALER, M. A. **Manual of Clinical Microbiology**. 9ed. Washington: ASM Press, v.1, p.290-411, 2007.

BROWN, M. H.; SKURRAY, R. A. Staphylococcal multidrug efflux protein QacA. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.3, n.2, p.163-70. 2001.

CAMPOCCIA, D.; MONTANARO, L.; ARCIOLA, C. R. A review of the clinical implications of anti-infective biomaterials and infection-resistant surfaces. **Biomaterials**, v.34, p.8018-8029, 2013.

CAMPOS, D. A.; RIBEIRO, A. C.; COSTA, E. M.; FERNANDES, J. C.; TAVARIA, F. K.; ARARUNA, F. B.; EIRAS, C.; EATON, P.; LEITE, J. R. S. A.; PINTADO, M. M. Study of antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum. **Carbohydrate polymers**, v.90, p.270-274, 2012.

CARVALHO, N. S.; SILVA, M. M.; SILVA, R. O.; NICOLAU, L. A. D.; SOUSA, F. B. M.; DAMASCENO, S. R. B.; SILVA, D. A.; BARBOSA, A. L. R.; LEITE, J. R. S. A.; MEDEIROS, J. V. R. Gastroprotective properties of cashew gum, a complex heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale*, in naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Drug Development Research**, v.76, n.3, p.143-151, 2015.

CRISMARU M.; ASRI L. A. T. W.; LOONTJENS, T. J. A.; KROM, B. P.; VRIES, J.; VAN DER MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. Survival of adhering staphylococci during exposure to a quaternary ammonium compound evaluated by using atomic force microscopy imaging. **Antimicrobial Agentes Chemotherapy**, v. 55, n.11, p.5010-5017, 2011.

CUNHA, P. L. R.; DE PAULA R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: Uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, v.32, n.3, p.649-660, 2009.

CUNHA, P. L. R.; MACIEL, J. S.; SIERAKOWSKI, M. R.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Oxidation of cashew tree gum exudate polysaccharide with TEMPO reagent. **Journal of the brazilian chemical society**, v.18, n.1, p.85-92, 2007.

DE PAULA, R. C. M.; HEATLEY, F.; BUDD, P. M. Characterization of *Anacardium occidentale*: Exudate polysaccharide. **Polymer Interntional**, v.45, n.1, p.27-35, 1998.

DE PAULA, R. C. M.; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, n.3, p.177-181, 1995.

DELEO, F. R.; CHAMBERS, H. F. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. **The Journal Clinical Investigation**, v.119, n.9, p.2464-2474, 2009.

DENYER, S. P.; STEWART, G. S. A. B. Mechanisms of action of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v.41, 3-4ed., p.261-268, 1998.

DHIVYA, S.; PADMA, V. V.; SANTHINI, E. Wound dessings – a review. **BioMedicine**, v.5, n.4, p.24-28, 2015.

DIAS, S. F. L.; NOGUEIRA, S. S.; DOURADO, F. F.; GUIMARÃES, M. A.; PITOMBEIRA, N. A. O.; GOBBO, G. G.; PRIMO, F. L.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. O. A.; TEDESCO, A. C.; NUNES, L. C. C.; LEITE, J. R. S. A.; SILVA, D. A. Acetylated cashew gum-based nanoparticles for transdermal delivery of diclofenac diethyl amine. **Carbohydrate Polymers**, v.143, p.254-261, 2016.

GONZÁLEZ, L. L.; PÉREZ, M. I. G.; MENÉNDEZ, M. E. L. V.; LLUCH, N. A.; AGUSTÍ, M. L. M.; CACHAFEIRO, S. P. Introducción a los antissépticos. **Atención Primaria**, n.46, Supl. 2, p.1-9, 2014.

GOWTHAMARAJAN, K.; KUMAR, G. K. P.; GAIKWAD, N. B.; SURESH, B. Preliminary study of *Anacardium occidentale* gum as binder in the formulation of paracetamol tablets. **Carbohydrate Polymers**, v.83, p.506-511, 2011.

HU, D.; WANG, L. Preparation and characterization of antibacterial films based on polyvinyl alcohol/ quaternized cellulose. **Reactive and Functional Polymers**, v.101, p.90-98, 2016.

HUEBNER, J.; GOLGMANN, D. A. coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. **Annual Review of Medicine**, v.50, p.223-236, 1999.

IOANNOU, C. J.; HANLON, G. W.; DENYER, S. P. Action of disinfectant quaternary ammonium compounds against *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agentes and Chemotherapy**, v.51, n.1, p.296-306, 2007.

JENNINGS, M. C.; MINBIOLE, K. P. C.; WUEST, W. M. Quaternary ammonium compounds: an antimicrobial mainstay and platform for innovation to address bacterial resistance. **ACS Infectious Diseases**, v.1, p.288-303, 2015.

KUMAR, R.; PATIL, M. B.; PATIL, S. R.; PASCHAPUR, M. S. Evaluation of *Anacardium occidentale* gum as gelling agent in aceclofenac gel. **International Journal of PharmTech Research**, v.1, n.3, p. 695-704, 2009.

KUMAR, A.; MOIN, A.; SHRUTHI, R.; AHMED, A; SHIVAKUMAR, H. G. Cashew gum: a versatile hydrophylic polymer: a review. **Current Drug Therapy**, v.7, p.2-12, 2012.

LAUPLAND, K. B.; CONLY, J. M. Treatment of *Staphylococcus aureus* colonization and prophylaxis for infection with topical intranasal mupirocin: an evidence-based review. **Clinical Infectious Diseases**, v.37, p.933-938, 2003.

LIMA A. C.; SANTOS, R. A.; ALMEIDA F. A. G.; BANDEIRA, C. T. Estimulantes químicos na extração da goma de cajueiro (*Anacardium occidentale*, L.). **Ciência Rural**, v.31, n.3, p.409-415, 2001.

LIMA, R. D. N.; LIMA, J. R.; DE SALIS, C. R.; MOREIRA, R. D. Cashew-tree (*Anacardium occidentale* L.) exudate gum: a novel bioligand tool. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.35, p.45-53, 2002.

LIMA, R. E. M.; MAIA, L. K. R.; LIMA, J. S. Produção de goma a partir do cajueiro. **Enciclopédia Biosfera**, v.9, n.17, p.2089-2106, 2013.

MOREIRA, B. R.; BATISTA, K. A.; CASTRO, E. G.; LIMA, E. M.; FERNANDES, K. F. A bioactive film based on cashew gum polysaccharide for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v.122, p.69-76, 2015.

MOTHÉ, C. G.; CORREIA, D. Z. Caracterização reológica de blendas de gomas de cajueiro e xantana em suco. **Analytica**, v.2, p. 59-64, 2002.

MOTHÉ, C. G.; SOUZA, I. A.; CALAZANS, G. M. T. Antitumor activity of cashew gum from *Anacardium Occidentale* L. **Agro Food Industry Hi Tech**, v.19, n.6, p.50-52, 2008.

MOURA NETO, E. D.; MACIEL, J. S.; CUNHA, P. L. R.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Preparation and characterization of a chemically sulfated cashew gum polysaccharide. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n.10, p.1953-1960, 2011.

NICHIFOR, M.; STANCIU, M. C.; SIMIONESCU, B. C. New cationic hydrophilic and amphiphilic polysaccharides synthesized by one pot procedure. **Carbohydrate polymers**, v. 82, p.965–975, 2010.

NOVAC, O.; LISA, G.; PROFIRE, L.; TUCHILUS, C.; POPA, M. I. Antibacterial quaternized gellan gum based particles for controlled release of ciprofloxacin with potential dermal applications. **Materials Science and Engineering C**, v.35, p.291-299, 2014.

OKOYE, E. I.; ONYEKWELI, A. O.; FATOKI, O. O. Evaluation of LD50 of cashew gum and the comparative study of its functionality in cotrimoxazole granule and tablet formulations. **British Journal of Pharmacology and Toxicology**, v.3, n.4, p.156-164, 2012.

PAL, S.; MAL, D.; SINGH, R. P. Synthesis and characterization of cationic guar gum: a high performance flocculating agent. **Journal of Applied Polymer Science**, v.105, p.3240–3245, 2007.

PAL, S.; GHOSH, S.; SEN, G.; JHA, U.; SINGH, R. P. Cationic tamarind kernel polysaccharide (Cat TKP): A novel polymeric flocculant for the treatment of textile industry wastewater. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.45, p.518-523, 2009.

PASBERG-GAUHL, C. A need for new generation antibiotics against MRSA resistant bacteria. **Drug Discovery Today: Technologies**, v.11, p.109-116, 2014.

PINTO, A. M. B.; SANTOS, T. M.; CACERES, C. A.; LIMA, J. R.; ITO, E. N.; AZEREDO, H. M. C. Starch-cashew tree gum nanocomposite films and their application for coating cashew nuts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, 1ed, Parte 2, p.549-554, 2015.

PITOMBEIRA, N. A. O.; VERAS NETO, J. G.; SILVA, D. A.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, H. C. B.; DE PAULA, R. C. M. Self-assembled nanoparticles of acetylated cashew gum: Characterization and evaluation as potential drug carrier. **Carbohydrate Polymers**, v.6, n.117, 610-615, 2015.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v.38, n.7, p. 957-971, 2015

PORTO, B. C.; CRISTIANINI, M. Evaluation of cashew tree gum (*Anacardium occidentale* L.) emulsifying properties. **LWT – Food Science and Technology**, v.59, p.1325-1331, 2014.

QUELEMES, P. V. Avaliação da atividade antibacteriana de nanopartículas de prata estabilizadas com a goma de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), 2012, 59p. **Dissertação de Mestrado**. Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais – Universidade Federal do Piauí.

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. Development and antibacterial activity of cashew gum-based silver nanoparticles. **International Journal of Molecular Science**, v.14, n.3, p.4969–4981, 2013.

RANA, V.; RAI, P.; TIWARY, A. K.; SINGH, R. S.; KENNEDY, J. F.; KNILL, C. J. Modified gums: approaches and applications in drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v.83, p.1031-1047, 2011.

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. Gums' based delivery systems: review on cashew gum and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v.147, p.188-200, 2016.

SAJOMSANG, W.; GONIL, P.; TANTAYANON, S. Antibacterial activity of quaternary ammonium chitosan containing mono or disaccharide moieties: Preparation and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.44, p.419-427, 2009.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p.413-423, 2007.

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

SILVA, D. A.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; BRITO, A. C. F.; MACIEL, J. S.; PAULA, H. C. B. Carboxymethylation of cashew tree exudates polysaccharide. **Carbohydrate polymers**, v.58, p.163-171, 2004.

SILVA, D. A.; FEITOSA, J. P. A.; DE PAULA, H. C. B.; PAULA, R. C. M. Synthesis and characterization of cashew gum/acrylic acid nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v.29, p.437-441, 2009.

SINGH, R. P.; PAL, S.; ALI, S. A. Novel biodegradable polymeric flocculants based on cationic polysaccharides. **Advanced Materials Letters**, v.5, n.1, p.24-30, 2014.

SONG, Y.; SUN, Y.; ZHANG, X.; ZHOU, J.; ZHANG, L. Homogeneous quaternization of cellulose in NaOH/Urea aqueous solutions as gene carriers. **Biomacromolecules**, v.9, p.2259-2264, 2008.

SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**. v. 34, n.1, p.27-36, 2005.

TIMOFEEVA, L.; KLESHCHEVA, N. Antimicrobial polymers: mechanism of action, factors of activity, and applications. **Applied Microbiological Biotechnology**, v.89, p.475-492, 2011.

TONG, S. Y. C.; DAVIS, J. S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T. L.; FOWLER JR, V. G. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Review**, v.28, n.3, p. 603-661.

TORQUATO, D. S.; FERREIRA, M. L.; SÁ, G. C.; BRITO, E. S.; PINTO, G. A. S.; AZEVEDO, E. H. F. Evaluation of antimicrobial activity of cashew tree gum. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.20, p.505-507, 2004.

UPTON, A.; LANG, S.; HEFFERNAN, H. Mupirocin and *Staphylococcus aureus*: a recent paradigm of emerging antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, n.3, p.613-617, 2003.

WANG, Y.; XIE, W. Synthesis of cationic starch with a high degree of substitution in an ionic liquid. **Carbohydrate Polymers**, v.80, p.1172-1177, 2010.

YAMASSAKI, F. T.; LENZI, R. M.; CAMPESTRINI, L. H.; BOVO, F.; SEYFRIED, M.; SOLDERA-SILVA, A.; STEVAN-HANCKE, F. R.; ZAWADZKI-BAGGIO, S. F.; PETTOLINO, F. A.; BACIC, A.; MAURER, J. B. B. Effect of the native polysaccharide of cashew-nut tree gum exudate on murine peritoneal macrophage modulatory activities. **Carbohydrate Polymers**, v.125, p.241-248, 2015.

YU, F.; LIU, Y.; LV, J.; QI, X.; LU, C.; DING, Y.; LI, D.; LIU, H.; WANG, L. Antimicrobial susceptibility, virulence determinant carriage and molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates associated with skin and soft tissue infections. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.19, n.6, p.614-622, 2015.

YU, H.; HUANG, Y.; YING, H.; XIAO, C. Preparation and characterization of quaternary ammonium derivative of Konjac glucomannan. **Carbohydrate Polymers**, v.69, p.29-40, 2007.

VUONG, C.; GERKE C.; SOMERVILLE, G A.; FISCHER, E. R.; OTTO, M. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Infectious Diseases**, v.188, n.5, p.706-18, 2003.

WILLIAMS, D. F. There is no such thing as biocompatible material. **Biomaterials**. v.35, p.10009-10014, 2014.

## CAPÍTULO 2 – ARTIGO PUBLICADO

- Periódico: ***Carbohydrate Polymers***
- Fator de impacto: 4,219
- QUALIS A1 em Biotecnologia

Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.026>



ELSEVIER

### Carbohydrate Polymers

Available online 12 October 2016

In Press, Accepted Manuscript — Note to users



---

**Quaternized cashew gum: an anti-staphylococcal and biocompatible cationic polymer for biotechnological applications**

Patrick V. Quelemes<sup>a</sup>, Alyne R. de Araújo<sup>a</sup>, Alexandra Plácido<sup>b</sup>, Cristina Delerue-Matos<sup>b</sup>, Jeanny S. Maciel<sup>c</sup>, Lucinda Bessa<sup>d</sup>, Alicia S. Ombredane<sup>e</sup>, Graziella A. Joanitti<sup>e</sup>, Maria José dos S. Soares<sup>f</sup>, Peter Eaton<sup>a, d</sup>, Durcilene A. da Silva<sup>a</sup>, José Roberto S.A. Leite<sup>a, d, g</sup>   

[+ Show more](#)

Nota: O artigo apresentado a seguir encontra-se traduzido para a língua portuguesa, com perfil formatação seguindo as normas de submissão exigidas pela revista no qual se encontra publicado. Tais normas estão disponíveis *on line* em:

<https://www.elsevier.com/journals/carbohydrate-polymers/0144-8617/guide-for-authors>

**Goma de cajueiro quaternizada: um polímero catiônico  
antiestafilocócico e biocompatível para aplicações biotecnológicas**

Patrick V. Queleães<sup>1</sup>, Alyne R. de Araújo<sup>1</sup>, Alexandra Plácido<sup>2</sup>, Cristina Delerue-Matos<sup>2</sup>, Jeanny S. Maciel<sup>3</sup>, Lucinda Bessa<sup>4</sup>, Alicia S. Ombredane<sup>5</sup>, Graziella A. Joanitti<sup>5</sup>, Maria José dos S. Soares<sup>6</sup>, Peter Eaton<sup>1,4</sup>, Durcilene A. da Silva<sup>1</sup>, José Roberto S. A Leite<sup>1,4,7,\*</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, Biotec, Universidade Federal do Piauí, UFPI, 64202020, Parnaíba, PI, Brasil.

<sup>2</sup>REQUIMTE/LAQV, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Instituto Politécnico do Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 431, 4200-072 Porto, Portugal.

<sup>3</sup>Departamento de Química Orgânica e inorgânica, Universidade Federal do Ceará, UFC, *Campus do Pici*, 60455-760, Fortaleza, CE, Brasil.

<sup>4</sup>UCIBIO, REQUIMTE, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, 4169-007, Porto, Portugal.

<sup>5</sup>Laboratório de Nanobiotecnologia, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, UnB, 70910-900, Brasília, Distrito Federal, DF, Brasil.

<sup>6</sup>Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Universidade Federal do Piauí, 64049550, Teresina, PI, Brasil.

<sup>7</sup>Área de Morfologia, Faculdade de Medicina, FM, Universidade de Brasília, UnB, *Campus Universitário Darcy Ribeiro*, Asa Norte, Brasília, Distrito Federal, DF, Brasil 70910-900.

\*Autor correspondente:

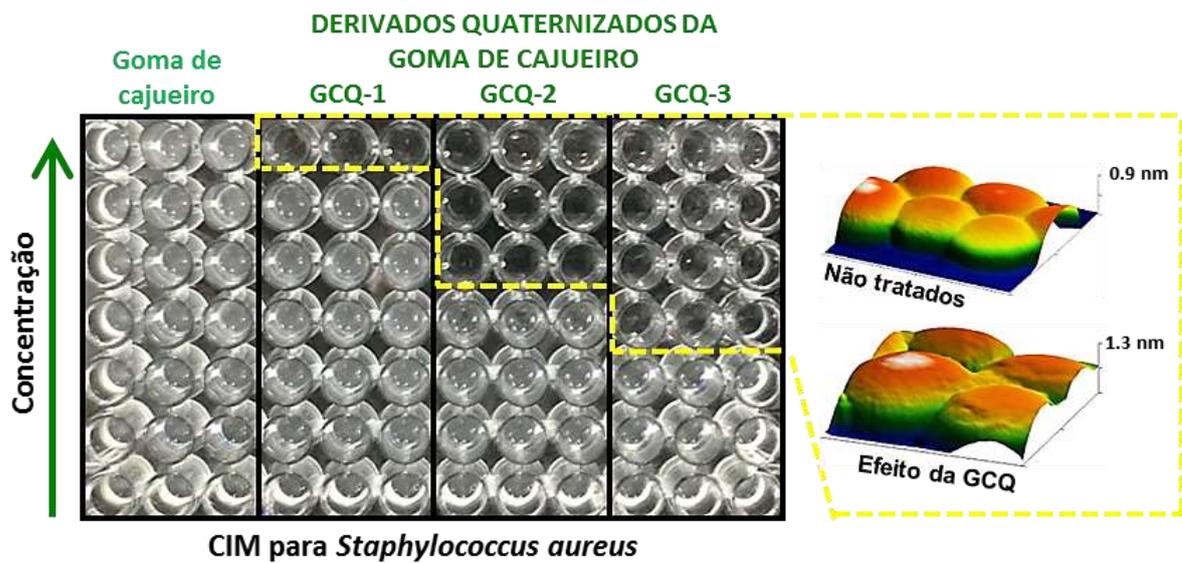
E-Mail: jrsaleite@gmail.com; jrleite@pq.cnpq.br.

Telefone: ++ 55 61 31071891.

## Destaques

- Não existem relatos de derivados catiônicos de goma de cajueiro.
- A goma de cajueiro quaternizada (GCQ) foi apresentada neste trabalho.
- A caracterização química confirmou a modificação da goma de cajueiro.
- GCQ catiônica apresentou efeito antiestafilocócico e biocompatibilidade.
- A GCQ pode ser uma ferramenta promissora no desenvolvimento de biomateriais antissépticos.

## Resumo gráfico



## Resumo

Modificações químicas na estrutura da goma de cajueiro (GC) têm sido realizadas com intuito de se obterem novas características físico-químicas, entretanto, não existem relatos de reações por introdução de novos grupos funcionais no intuito de torná-la catiônica. Este estudo apresenta uma rota de quaternização da goma de cajueiro utilizando um reagente amônio quaternário. As características químicas dos derivados quaternizados da goma de cajueiro (GCQ) foram analisadas por: espectroscopia na região de infravermelho, análise elementar, grau de substituição, potencial Zeta, RMN  $^1\text{H}$  e correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (*HSQC*). A atividade antiestafilocócica da GCQ foi avaliada pela determinação das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas e pela utilização de microscopia de força atômica. Além disso, a biocompatibilidade em células de mamíferos também foi avaliada por meio dos testes de hemólise e de citotoxicidade. A GCQ apresentou promissora atividade antibacteriana contra *S. aureus* resistente à metilina e biocompatibilidade sobre as células testadas. Esses resultados apontam que a GCQ pode se tornar uma promissora ferramenta para o desenvolvimento de biomateriais com ação antisséptica.

**Palavras-chaves:** goma de cajueiro; quaternização; antibacteriana; *Staphylococcus* spp.; biocompatibilidade.

### Compostos químicos estudados neste artigo:

Solução de cloreto de (3-Cloro-2-hidroxipropil)trimetilamônio (PubChem CID: 18732);

Hidróxido de sódio (PubChem CID: 14798);

Ácido clorídrico (PubChem CID: 313);

Acetona (PubChem CID: 180).

## 1. INTRODUÇÃO

O exsudato do caule de *Anacardium occidentale* L., goma de cajueiro (GC), é um produto natural extraído a baixo custo, de uma forma sustentável, sendo que, o estudo de suas propriedades tem contribuído para agregação de valor à cadeia produtiva desta planta (Lima, Lima, de Salis, & Moreira, 2002; Cunha, Paula & Feitosa, 2009; Ribeiro et al., 2016). Essa goma é um heteropolissacarídeo aniônico com capacidade de formar suspensões viscosas e emulsificantes que podem ser utilizadas na indústria alimentícia e farmacêutica (De Paula, Heatley & Budd, 1998; Kumar, Patil, Patil, & Paschapur, 2009; Gowthamarajan, Kumar, Gaikwad, & Suresh, 2011; Kumar, Moin, Shruthi, Ahmed, & Shivakumar, 2012; Porto & Cristianini, 2014). Além disso, a GC tem apresentado promissora aplicação em nanobiotecnologia (Silva et al., 2009; Araruna et al., 2013; Quelemes et al., 2013; Oliveira, Paula & de Paula, 2014; Dias et al., 2016).

A GC é composta principalmente por  $\beta$ -D-galactose (72%), seguido de  $\alpha$ -D-glicose (14%), arabinose (4,6%), raminose (3,2%) e ácido glicurônico (4,6%). Sua cadeia principal contém unidades de galactose unidas por ligações do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) e, na cadeia lateral,  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6) (De Paula, Heatley & Budd, 1998).

Estudos relacionados às atividades biológicas da GC têm sido reportados revelando: fraca atividade antimicrobiana (Torquato et al., 2004; Campos et al., 2012), atividade imunomodulatória (Yamassaki et al., 2015), efeito cicatrizante (Schirato et al., 2006), além das propriedades antidiarreicas (Araújo et al. 2015b) e gastroprotetoras (Carvalho et al., 2015).

Modificações químicas na estrutura desse polímero pela introdução de novos grupos funcionais como: carboximetilação (Silva et al., 2004); oxidação (Cunha, Maciel, Sierakowski, de Paula, & Feitosa, 2007), sulfatação (Neto, Maciel, Cunha, de Paula, & Feitosa, 2011) e acetilação (Pitombeira et al., 2015) têm sido realizadas no intuito de se obterem novas características físico-químicas. Entretanto, não há relatos de execução de reações de funcionalização poliméricas desse tipo, com intuito de torná-la catiônica.

Glicomanana konjac (Yu, Huang, Ying, & Xiao, 2007), goma guar (Pal, Mal & Singh, 2007; Banerjee et al., 2013), celulose (Song, Sun, Zhang, Zhou, & Zhang, 2008), casca de tamarino (Pal, Ghosh, Sen, Jha, & Singh, 2009), quitosana (Sajomsang, Gonil, & Tantayanon, 2009; Singh, Pal, & Ali, 2014), dextrana, pululana (Nichifor, Stanciu, & Simionescu, 2010), amido (Wang & Xie, 2010; Singh, Pal, & Ali, 2014), goma gelana (Novac, Lisa, Profire, Tuchilus, & Popa, 2014), amilose, amilopectina e glicogênio (Singh, Pal & Ali, 2014) são

exemplos de polissacarídeos obtidos de fontes naturais que têm sido modificados por reação com compostos de amônio quaternário.

Nesse processo, as porções catiônicas são introduzidas na estrutura desses polímeros principalmente utilizando reagentes como o cloreto de N-(3-cloro-2-hidroxiopropil) trimetilamônio (Singh, Pal & Ali, 2014). Compostos de amônio quaternário contêm uma “cabeça” carregada positivamente suportando quatro ligações, tendendo a ser solúvel em água e bastante estável, originando uma variada gama de aplicações (Jennings, Minbiole, & Wuest, 2015).

Os derivados quaternizados adquirem novas ou aprimoradas propriedades como: alta solubilidade em água (Sajomsang, Gonil, & Tantayanon, 2009), ação flocculante (Pal, Mal, & Singh, 2007; Pal, Ghosh, Sen, Jha, & Singh, 2009; Singh, Pal, & Ali, 2014), capacidade de carregamento de genes (Song, Sun, Zhang, Zhou, & Zhang, 2008) e atividade antibacteriana (Yu et al., 2007; Nichifor, Stanciu, & Simionescu, 2010).

Nesse contexto, a goma de cajueiro catiônica obtida por reação de quaternização poderia apresentar alterações em suas características físico-químicas e propriedades biológicas, especialmente em relação à atividade antibacteriana, devido à possibilidade de uma melhor interação eletrostática com a superfície bacteriana carregada negativamente (Jennings, Minbiole, & Wuest, 2015). Tal efeito, associado à manutenção de sua biocompatibilidade são pré-requisitos para o desenvolvimento de agentes candidatos para uso, por exemplo, como excipientes para formulações tópicas ou integrados a dispositivos biotecnológicos como nanocompósitos ou biomateriais, os quais podem auxiliar nos processos de antissepsia e cicatrização (Hirsch et al., 2010; Piraino & Selimovic, 2015).

Agentes catiônicos também podem exercer valiosa contribuição para a prevenção e tratamento de infecções de pele, particularmente àquelas causadas por bactérias do gênero *Staphylococcus*. A espécie *S. aureus*, por exemplo, é um patógeno oportunista relacionado a severas infecções cutâneas e de tecidos moles, além de infecções hospitalares, devido principalmente à sua habilidade em adquirir resistência aos antibióticos (De leo, 2009; Yu et al., 2015), sendo que, novos agentes para combatê-la são urgentemente requisitados (Pasberg-Gauhl, 2014).

Este estudo apresenta uma rota de modificação química da goma de cajueiro utilizando um reagente amônio quaternário, avalia o efeito dos derivados quaternizados sobre bactérias do gênero *Staphylococcus*, além de averiguar sua biocompatibilidade celular.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Reação de quaternização

#### 2.1.1 Material e reagentes

Cloreto de (3-Cloro-2-hidroxipropil)trimetilamônio - *CHPTAC* (Aldrich); hidróxido de sódio (Neon); ácido clorídrico (Vetec) e acetona (Vetec) foram os reagentes grau analítico utilizados no processo de quaternização da GC. A membrana de diálise foi obtida da Sigma-Aldrich. A GC foi isolada e purificada seguindo o método descrito por Dias et al. (2016).

#### 2.1.2 Reação química

Um método previamente descrito (Pal, Mal, & Singh, 2007) foi realizado por meio de uma reação de substituição nucleofílica. Uma solução aquosa de GC previamente isolada e purificada foi preparada dissolvendo-se 1 g desse polissacarídeo em 1,5 mL água em temperatura ambiente, sob constante agitação durante 30 minutos, quando uma pasta homogênea foi formada. Logo após, *CHPTAC* e uma solução aquosa de NaOH 5M foram adicionadas à solução de GC, com subsequente agitação por mais 30 min. Para a reação de quaternização, as razões molares de GC/*CHPTAC*/NaOH foram as seguintes: 1/2/2 para GCQ-1; 1/4/4 para GCQ-2 e 1/6/6 para GCQ-3. A reação foi então continuada por mais 14 h em banho-maria a 50°C. Posteriormente, HCl 1M foi adicionado para diminuir o pH para o valor de 5,5, afim de interromper o processo de quaternização. A solução do polímero modificado foi precipitada por adição de excesso de acetona P.A., seguindo-se de diálise e liofilização.

#### 2.1.3 Caracterização química

Medidas de espectro na região de infravermelho foram realizadas utilizando um espectrômetro de infravermelho por transformada de Forrier (System Spectrum BX - Perkin Elmer) utilizando-se a técnica de reflexão total atenuada, com espectro variando de 4000 to 500  $\text{cm}^{-1}$ .

A análise elementar para a composição de carbono, hidrogênio e nitrogênio foi realizada utilizando-se um analisador CHNS Perkin Elmer 2400 series, com detector de condutividade térmica. O grau de substituição (GS) dos derivados GCQ foi obtido pela porcentagem de nitrogênio utilizando a Eq. 1 (Huang, Yu, & Xiao, 2007; Banerjee et al., 2013). O GS foi definido como o número de grupos hidroxilas substituídos por unidade de

açúcar da GC, onde N é a quantidade de nitrogênio (%) determinada por análise elementar (descontando-se a negligenciável quantidade presente na GC).

$$GS = \frac{162,2 \times N(\%)}{1400 - 151,5 \times N(\%)} \quad (\text{Eq.1})$$

Testes de solubilidade foram realizados por meio da agitação das gomas em água deionizada, num aparelho vortex, por 5 min a uma concentração de 10 mg/mL, seguindo-se de observação visual. A solubilidade foi definida como: completamente dissolvida (+++), entumescida ( $\pm$ ) e insolúvel (-).

Medidas de potencial Zeta ( $\zeta$ ) foram obtidas num aparelho Malvern Zetasizer Nano, Modelo ZS 3600. Cada amostra, a uma concentração de 10 mg/mL, foi medida 3 vezes, para duas replicatas a uma temperatura constante de 25°C.

Espectros de RMN 1D ( $^1\text{H}$ ) e 2D ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  *heteronuclear single-quantum correlation*, *HSQC*) da GC e do derivado GCQ-3 foram medidos em um aparelho Bruker AVANCE 500 MHz at 300 K, utilizando  $\text{D}_2\text{O}$  como solvente e contendo DSS (ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfônico) como padrão interno (0,01% p/v). A correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (*HSQC*) foi realizada com uma sequência de pulso atualmente utilizada.

## 2.2 Testes de atividade antiestafilocócica

### 2.2.1 Crescimento bacteriano e condições de cultura

Onze linhagens pertencentes ao gênero *Staphylococcus* foram selecionadas para este estudo: oito *S. aureus*, sendo três sensíveis à meticilina (SASM) e cinco resistentes à meticilina (SARM); além de três *S. epidermidis*, uma sensível à meticilina (SESM) e duas resistentes à meticilina (SERM). As bactérias foram estocadas em solução de glicerol-salina a -80°C e, para os experimentos, foram reativadas em caldo Mueller-Hinton (HIMEDIA) e incubadas a 37°C por 24h. A partir do caldo, foram cultivadas em ágar Mueller-Hinton (HIMEDIA), nas mesmas condições. Depois, colônias isoladas foram selecionadas para se preparar uma suspensão bacteriana em solução salina estéril (NaCl - 0,9% p/v) a uma turbidez equivalente à 0.5 na escala de McFarland ( $1-2 \times 10^8$  UFC/mL). Essa suspensão foi diluída a fim de se obter a concentração desejada de inóculo para o experimento descrito a seguir.

### 2.2.2 Concentrações inibitórias e bactericidas mínimas (CIM e CBM)

A CIM foi determinada utilizando-se placas de microdiluição de 96 poços nas quais as bactérias (concentração de  $5 \times 10^5$  UFC/mL) (CLSI, 2012) foram expostas à uma diluição seriada de razão dois da GC e dos derivados GCQ, com concentrações variando de 7,81 a 1000  $\mu\text{g/mL}$  em caldo Mueller-Hinton (HIMEDIA). Oxacilina e vancomicina foram usadas como controles-padrão de antibióticos. A CIM foi definida como a menor concentração dos agentes que inibiu visualmente o crescimento bacteriano. Para a determinação da CBM, alíquotas (10  $\mu\text{L}$ ) de todos os poços com concentrações iguais ou superiores que a CIM foram subcultivadas em ágar Mueller-Hinton (HIMEDIA). CBM foi definida como a menor concentração do agente-teste que inviabilizou o crescimento de colônias sobre o ágar (morte de 99,9%). Em ambos os testes, os micro-organismos foram incubados por 24 h a uma temperatura de 37°C, em condições aeróbicas. Os ensaios descritos foram realizados em triplicata.

### 2.2.3 Análise por microscopia de força atômica (MFA)

Os valores de CIM e CBM da GCQ-3 sobre *S. aureus* ATCC 29213 foram determinados como descrito na seção 2.2.2, com algumas modificações. Em síntese, as concentrações da GCQ-3 variaram de 250 a 1000  $\mu\text{g/mL}$  e foi utilizado um inóculo maior ( $1 \times 10^8$  UFC/mL), afim de facilitar a observação por MFA (Araújo et al., 2015a). Depois da incubação por 24 h, 20  $\mu\text{L}$  do meio de cultura contendo bactérias tratadas ou não tratadas com a CIM e CBM foram depositados sobre uma superfície de vidro, seguindo-se por secagem em temperatura ambiente por 15 min. As amostras foram então lavadas duas vezes com 1 mL de água deionizada para remover cristais de sal e secas novamente, sob as mesmas condições descritas, previamente à análise por MFA. Todas as amostras foram preparadas ao mesmo tempo, expostas às mesmas condições e examinadas dentro de 8 h de deposição. A MFA foi realizada com um microscópio TT-AFM (AFM Workshop - EUA).

A análise do efeito da GCQ-3 sobre as células de *S. aureus* foi realizada em modo *vibrating*, usando pontas NSG10 (NTMDT) com uma frequência de ressonância de aproximadamente 280 kHz. As imagens geradas foram analisadas utilizando o programa Gwyddion 2.45. Múltiplas áreas de cada amostra foram examinadas, sendo apresentadas imagens representativas.

Também utilizando o programa Gwyddion 2.45, foi analisada a média de tamanho (altura) de bactérias tratadas e não tratadas. A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada com o uso do programa GraphPad Prism 7.01. Para comparar o tamanho das

bactérias, o “teste t” foi aplicado e os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP), com valor de “n” variando entre 10 e 17 amostras. Um valor de  $P < 0,001$  foi considerado estatisticamente significativo.

### 2.3 Avaliação de biocompatibilidade

#### 2.3.1 Ensaio de hemólise

A atividade hemolítica da GC e dos derivados GCQ foi testada utilizando eritrócitos humanos (hemácias), coletados em EDTA (1,8 mg/mL), lavados três vezes e ressuspendidos em solução salina estéril (0,9%), como descrito por Sahariah et al. (2015). A GC e os derivados GCQ foram testados em diferentes concentrações, variando de 62,5 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ . 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  $37^\circ\text{C}$  e centrifugadas a 10.000g por 1 min. O valor de absorbância 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:

$$PH = \frac{(A_{\text{Goma}} - A_{\text{Salina}})}{(A_{\text{Triton}} - A_{\text{Salina}})} \times 100 \quad (\text{Eq.2})$$

#### 2.3.2 Ensaio de citotoxicidade

A linhagem de queratinócitos humanos - HaCAT e células de fibroblastos murinos de linhagem NIH-3T3 foram mantidas em frascos de cultura celular, a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  em meio Eagle modificado de Dulbenco com 100 UI/mL de penicilina e 100  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomicina, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado (LIFE TECHNOLOGIES).

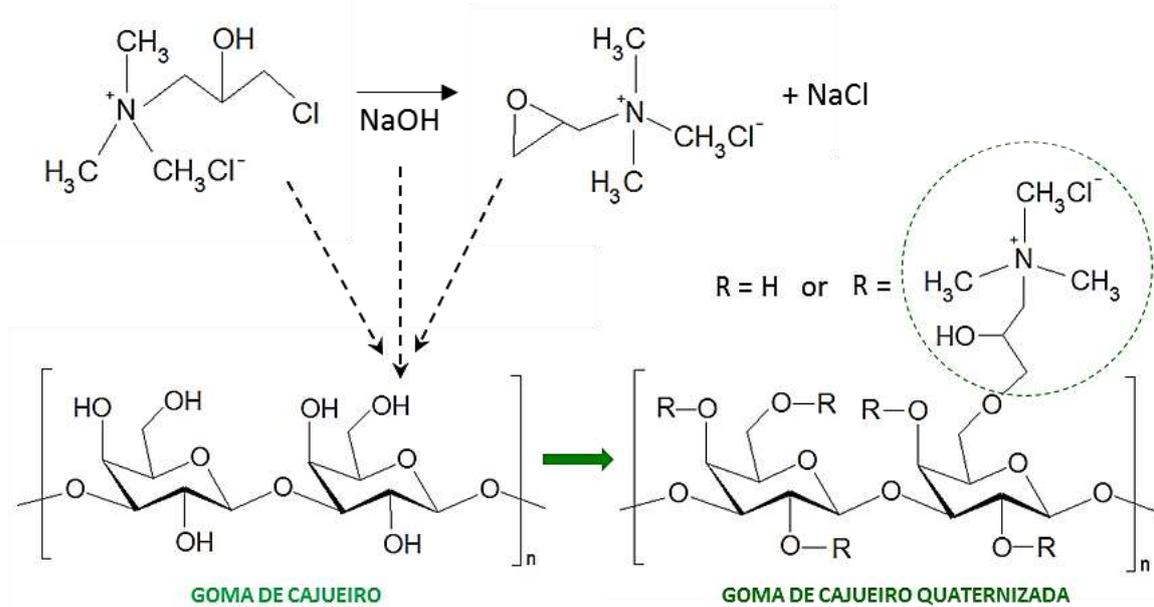
Para determinar a citotoxicidade, as células foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade celular de  $3 \times 10^3$  células por poço em meio de cultura por 24 h, a  $37^\circ\text{C}$  em 5%  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, o meio de cultura foi trocado e as células foram incubadas com diferentes concentrações de CG e derivados GCQ (de 62.5 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ ). Água ultrapura estéril foi utilizada como controle. O experimento foi realizado em triplicata e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio) (Araújo et al., 2015a). Após 24 h de exposição com as gomas, 15  $\mu\text{L}$  de solução de MTT (5 mg/mL em tampão salina-fosfato) foram adicionados em cada poço e

incubados por mais 2 h a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, então, o meio de cultura foi removido e 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados. A absorbância foi monitorada utilizando-se um leitor de microplacas a um comprimento de onda de 595 nm. Os resultados foram apresentados como % de viabilidade celular em relação às células não afetadas, do controle com água.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

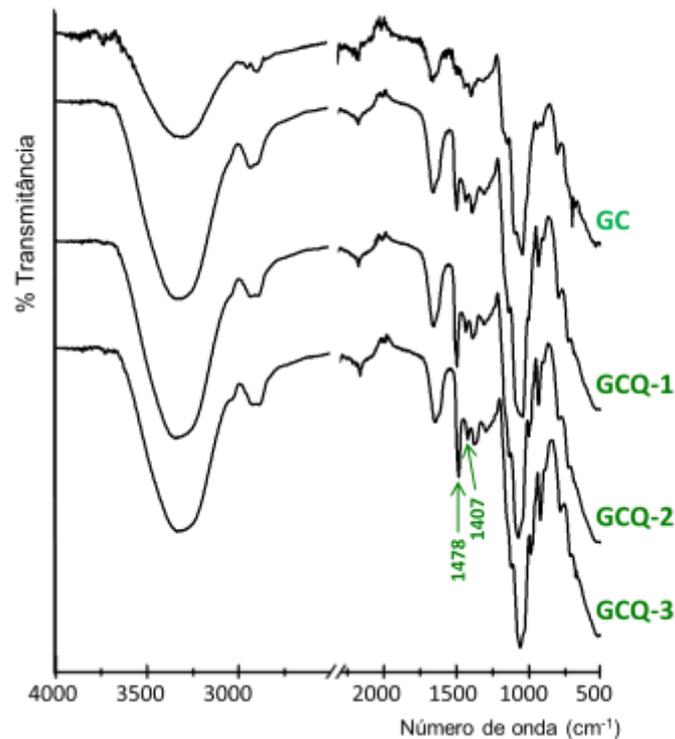
#### 3.1 Reação de quaternização e caracterização química

Com o objetivo de se produzirem derivados catiônicos da GC, uma reação de quaternização foi realizada, utilizando-se o reagente *CHPTAC* como agente eterificante, sob a ação catalítica do NaOH 5M. Essa reação é caracterizada por substituição nucleofílica sobre o grupo hidroxila da unidade monossacarídica pelo reagente amônio quaternário (Fig. 1). 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 *CHPTAC* pela aplicação estequiométrica da base; a GCQ é então formada por meio da reação entre a GC alcóxida com o epóxido ou o *CHPTAC*. As substituições na goma de cajueiro ocorrem mais comumente no C-6 da estrutura da goma (Ribeiro et al., 2016). Decorrente dessa reação, após diálise e liofilização, foi obtido um rendimento em torno de 75%.



**Fig. 1.** Esquema simplificado da reação de quaternização da goma de cajueiro.

A caracterização química foi realizada para confirmar a modificação química do polímero. A Fig. 2 apresenta o espectro na região de infravermelho da GC e de seus derivados quaternizados. No espectro, é possível observar bandas características de O–H ( $3300\text{ cm}^{-1}$ ), um modo de estiramento de C–H em  $2920\text{ cm}^{-1}$  e um grupo de bandas em  $1040$ ,  $1082$  and  $1122\text{ cm}^{-1}$ , relacionadas às ligações glicosídicas C–O–C, além de ligações O–H dos álcoois (Pitombeira et al., 2015). Em relação ao resultado da reação de quaternização, a diferença mais marcante entre a GC e seus derivados foi uma banda obtida em  $1478\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde às ligações simétricas C–H dos grupos metil dos substituintes amônio quaternários (Yu, Huang, Ying, & Xiao, 2007; Novac, Lisa, Profire, Tuchilus, & Popa, 2014), além disso, também pode ser observada a presença de uma discreta banda em  $1407$ , devido à presença do modo de estiramento vibracional C–N (Pal, Mal, & Singh, 2007; Song, Sun, Zhang, Zhou, & Zhang, 2008).



**Fig. 2.** Espectro na região de infravermelho da goma de cajueiro e seus derivados. As setas indicam as bandas obtidas devido à modificação química.

A análise elementar da GC e de seus derivados quaternizados é apresentada na Tabela 1. A presença de uma alta porcentagem de nitrogênio nas gomas modificadas confirmam que o *CHPTAC* foi incorporado na estrutura do polímero (Banerjee et al., 2013), destacando-se o aumento no percentual de nitrogênio devido ao aumento na quantidade de *CHPTAC* e NaOH adicionados à reação (Pal, Mal & Singh, 2007). Esse efeito é concomitante com o aumento do grau de substituição (Yu, Huang, Ying, & Xiao, 2007). Uma discreta quantidade de nitrogênio (0,14%) na GC pode estar relacionada a traços de proteínas (De Paula & Rodrigues, 1995).

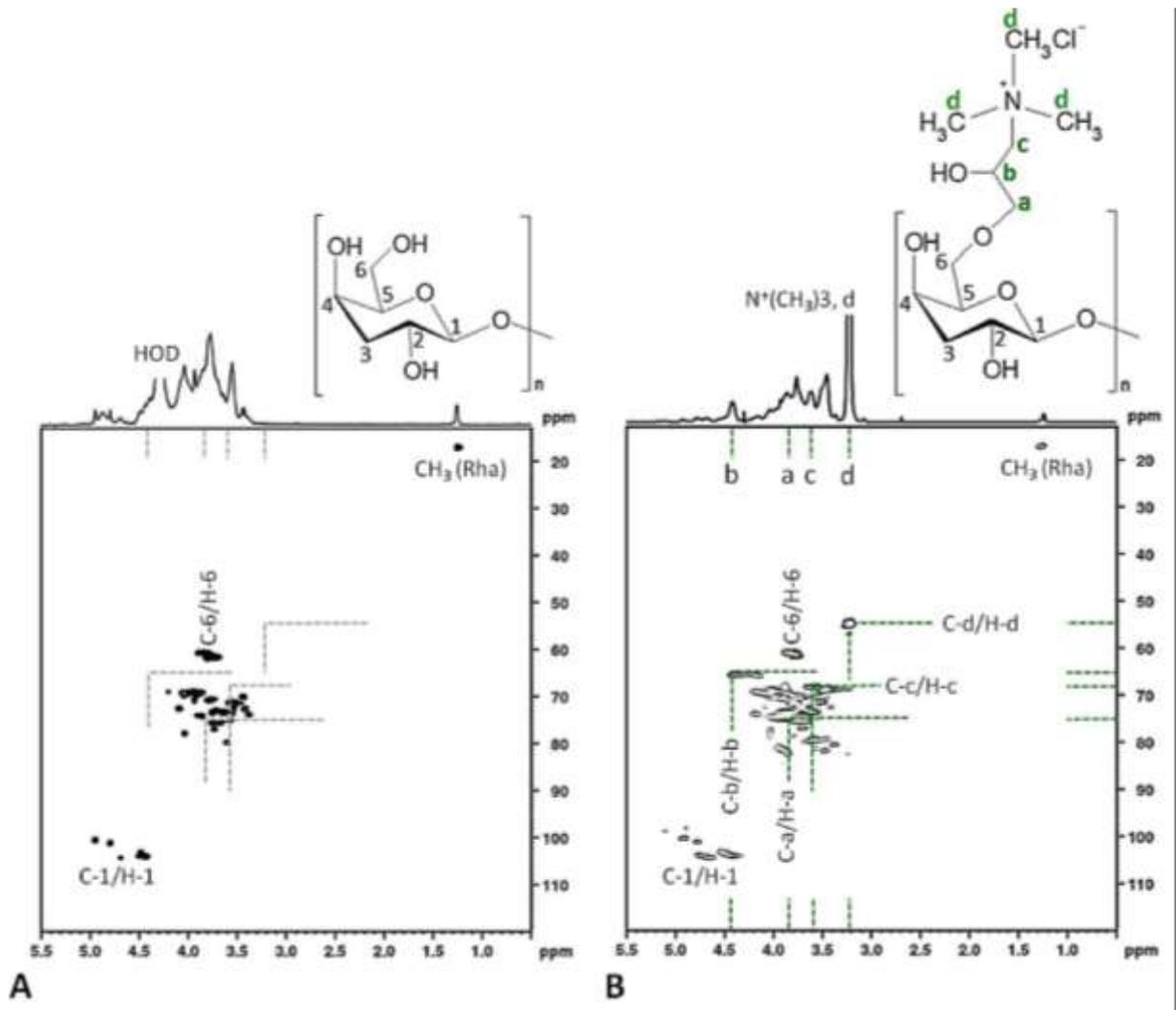
A modificação também pode ser confirmada devido à mudança causada na solubilidade da goma em água (Tabela 1). Esse efeito também foi reportado em relação à quitosana quaternizada (Sajomsang, Gonil & Tantayanon, 2009). Os dados obtidos por potencial Zeta (Tabela 1) mostram uma mudança na carga do polímero em solução, uma vez que a GC possui um potencial ligeiramente negativo e todos os derivados quaternizados apresentaram fortes valores positivos, o que é típico de compostos polieletrólitos catiônicos.

**Tabela 1.** Resultados obtidos do processo de quaternização e características químicas da CG e de seus derivados quaternizados.

Amostra	Rendimento (%)	Análise elementar (%)			GS	Potencial Zeta (ζ) mV	Solubilidade
		C	H	N			
CG	-	37,9	6,15	0,14	-	-3,4	±
GCQ-1	71	41,1	7,32	2,76	0,42	+38,7	+++
GCQ-2	79	41,4	8,78	3,74	0,68	+39,7	+++
GCQ-3	75	41,1	8,32	3,90	0,73	+40,4	+++

As Fig. 3A e 3B mostram o espectro de RMN com correlação heteronuclear 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  da GC e do derivado GCQ-3, respectivamente. Tanto na GC quanto no derivado GCQ-3 foram observados sinais em  $\delta$  1,25/17,1, que correspondem aos prótons metil da unidade de raminose. Isso pode indicar a presença de estruturas ramificadas preservadas. Foram notadas perceptíveis correlações referentes à  $\text{C}_6/\text{H}_6$  em  $\delta$  3,77/61,63 (Fig. 3A) e  $\delta$  3,89/60,83 (Fig. 3B). No derivado GCQ-3 (Fig. 3B), foram observadas as seguintes novas correlações (as letras estão associadas à estrutura química inserida na figura):  $\delta$  3,87/74,2 atribuída ao próton e carbono “a”; 4,42/65,3 atribuída a “b”;  $\delta$  3,6/68,1 atribuída a “c” e  $\delta$  3,22/54,9 atribuída aos N,N,N – trimetil em “d”. Também foi destacado um forte sinal em  $\delta$  3,22, observado pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$ .

Yu, Huang, Ying, & Xiao (2007) reportaram o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da glicomanana konjac quaternizada (GMKQ) e do *CHPTAC*. Os sinais para os carbonos “a” foram atribuídos em  $\delta$  73,4 na GMKQ. Os sinais observados para os carbonos “b”, “c” e “d” no *CHTPAC* foram similares aos observados na GMKQ, em  $\delta$  65,4; 68,3 e 54,6, respectivamente. Esses sinais também são claramente observados no derivado GCQ-3 (Fig. 3B).



**Fig. 3.** Espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC obtido para **A:** GC e **B:** derivado GCQ-3 (com inserção de RMN  $^1\text{H}$ , estruturas químicas e linhas tracejadas para destacar novas correlações, ausentes em A e presentes em B).

### 3.2 Atividade antiestafilocócica

Foram selecionadas para este estudo, linhagens padrão e isolados clínicos patogênicos catalogados, com reconhecida virulência. Para avaliar a atividade antimicrobiana da GC e seus derivados sobre linhagens de *Staphylococcus* spp., as CIM e CBM foram determinadas (Tabela 2). A GC natural não inibiu o crescimento bacteriano nas concentrações testadas neste estudo. Um trabalho previamente reportado, aponta a CIM da GC para o *S. aureus* com valor de 30 mg/mL (Campos et al., 2012).

Por outro lado, todos os derivados GCQ apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias selecionadas (Tabela 2). *S. aureus* – Col, o primeiro isolado clínico documentado de *S. aureus* resistente à metilina (Jevons, 1961), por exemplo, foi inibido pela GCQ-1 a uma concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ . Os dois outros derivados mostraram atividade ainda mais

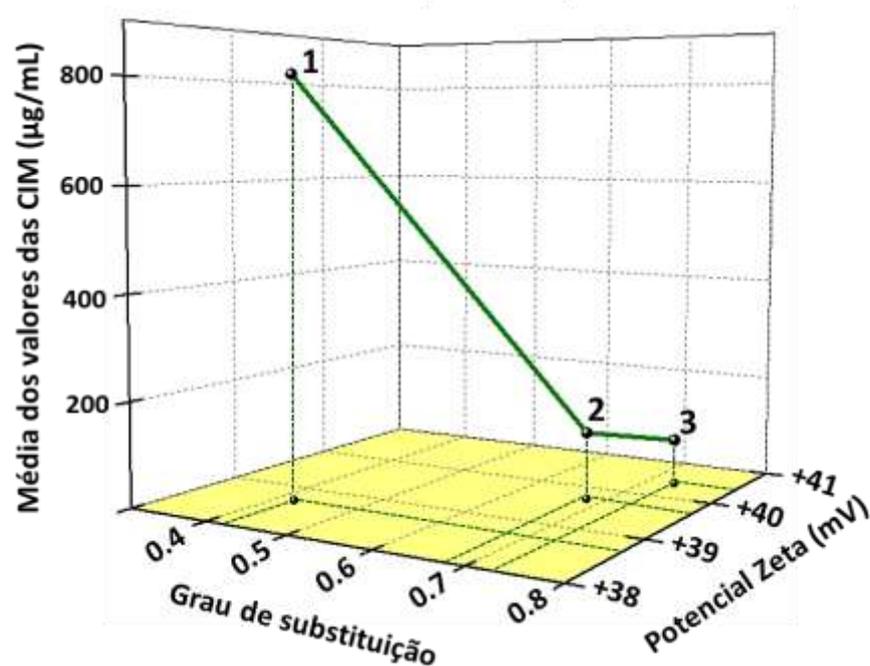
potente, com CIM de 125 µg/mL para GCQ-2 e de 62,5 µg/mL para a GCQ-3. Em particular, a GCQ-3 foi capaz de inibir o crescimento do *S. aureus* MR17 (SARM), um isolado clínico resistente à meticilina oriundo de ferida cirúrgica, a uma concentração de 31,25 µg/mL. Também foi observada uma relação próxima entre os valores de CIM e CBM, o que pode ser indicativo de efeito bactericida (Gonzalez et al., 2013). Por exemplo, no caso do *S. aureus* (SARM) ATCC 43300, as GCQ-2 e GCQ-3 apresentaram o mesmo valor de CIM e CBM. A única tendência de efeito bacteriostático ocorreu sobre *S. epidermidis* ATCC 12228, uma vez que a CIM das GCQ-2 e GCQ-3 foi igual a 31,25 µg/mL e os valores de CBM para ambos os derivados foi de 250 µg/mL.

**Tabela 2.** Concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações bactericidas mínimas (CBM) dos derivados GCQ (µg/mL) contra *Staphylococcus* spp.

Linhagem bacteriana	GCQ-1		GCQ-2		GCQ-3		Controle
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM
<i>S. aureus</i> ATCC 29213 (SASM)	1000	1000	250	250	125	125	<0,25 <sup>a</sup>
<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (SASM)	1000	1000	125	125	125	125	<0,25 <sup>a</sup>
<i>S. aureus</i> MS52 (SASM) Isolado de queimadura de pele.	1000	1000	250	500	125	250	0,25 <sup>a</sup>
<i>S. aureus</i> ATCC 43300 (SARM)	500	1000	62,5	62,5	62,5	62,5	0,5 <sup>b</sup>
<i>S. aureus</i> – Col (SARM)	1000	1000	125	125	62,5	125	0,5 <sup>b</sup>
<i>S. aureus</i> MR17 (SARM) Isolado de ferida cirúrgica.	500	1000	62,5	125	31,25	62,5	0,5 <sup>b</sup>
<i>S. aureus</i> MR359 (SARM) Isolado de ferida cirúrgica.	1000	1000	125	250	125	125	0,5 <sup>b</sup>
<i>S. aureus</i> MR0405 (SARM) Isolado de secreção nasal.	1000	>1000	125	250	62,5	125	0,5 <sup>b</sup>
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 (SESM)	62,5	1000	31,25	250	31,25	250	0,25 <sup>a</sup>
<i>S. epidermidis</i> MR111 (SERM) Isolado de hemocultura.	1000	1000	125	500	125	250	1,0 <sup>b</sup>
<i>S. epidermidis</i> 70D (SERM) Isolado de hemocultura.	1000	1000	125	250	125	125	1,0 <sup>b</sup>

Nota: GC purificada natural não apresentou atividade antiestafilocócica nas concentrações testadas; a. oxacilina (µg/mL) e b. vancomicina (µg/mL); todas as linhagens apresentaram o perfil de susceptibilidade aos antibióticos padrões recomendados pelo CLSI (Instituto de padrões clínicos e laboratoriais).

Por meio da observação da Tabela 2 é também perceptível que existe uma diferença consistente na atividade antimicrobiana entre os três derivados GCQ avaliados neste estudo, com os respectivos valores de CIM e CBM diminuindo na seguinte ordem: GCQ-1 > GCQ-2 > GCQ-3. Afim de melhor visualizar e compreender essa tendência, a Fig. 4 apresenta a relação entre as características químicas dos derivados GCQ (potencial Zeta e grau de substituição calculado por análise elementar) e suas atividades antibacterianas, que foram representadas pela média das CIM obtidas para cada derivado. Pode ser observado que, quanto maiores foram os valores do grau de substituição e do potencial Zeta, mais potente foi a atividade da GCQ. Nichifor et al. (2010) também observou esse comportamento em um dos grupos de derivados de dextrana quaternizada produzidos em seu estudo.



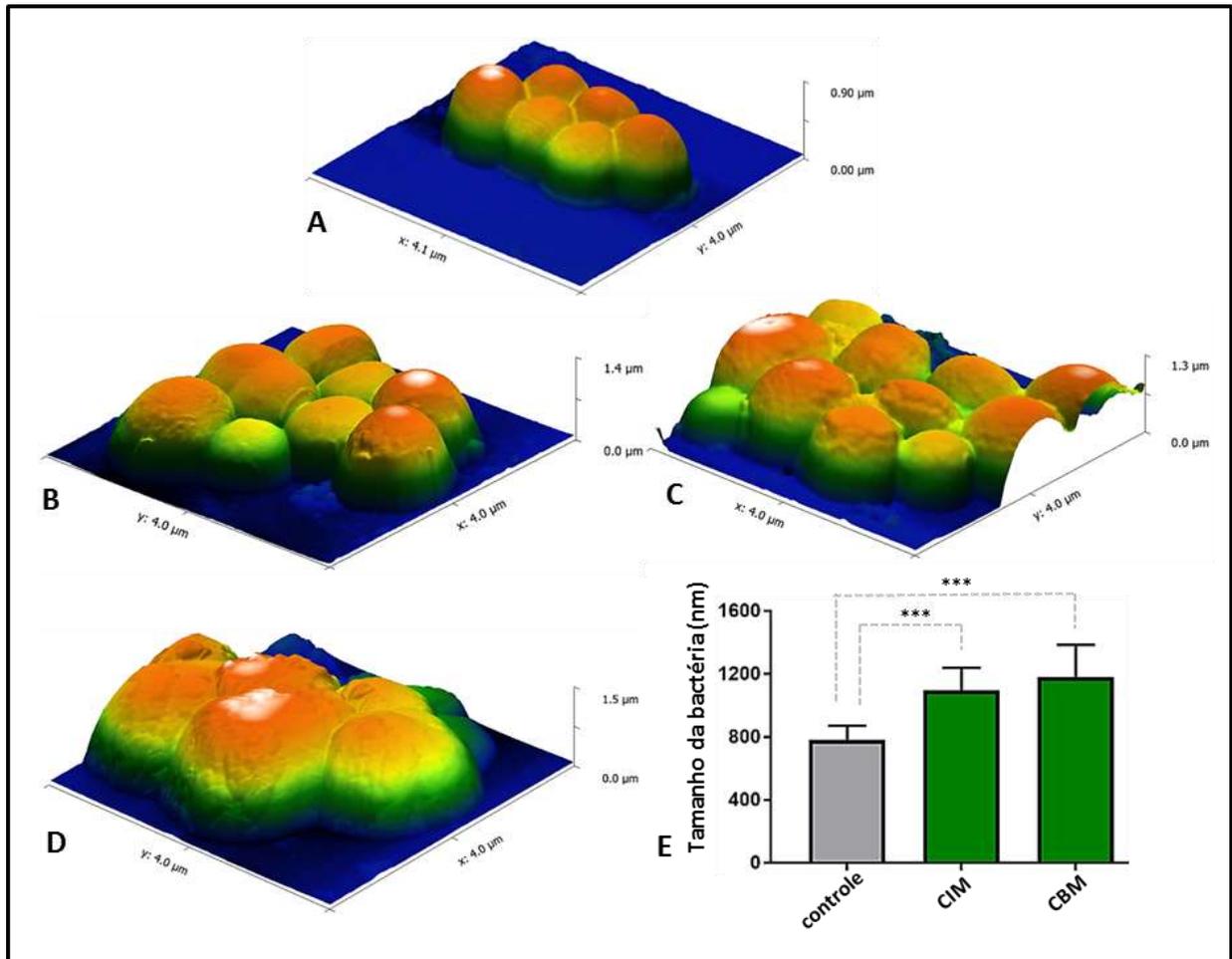
**Fig. 4.** Relação entre as características químicas e atividade antibacteriana de cada derivado quaternizado. 1: GCQ-1; 2: GCQ-2 e 3: GCQ-3.

O aumento no grau de substituição está relacionado com a eficiência do processo de modificação realizado na estrutura química do polímero, devido à inclusão do substituinte amônio quaternário, que possui, por si só, conhecida atividade antibacteriana (Ianoou, Hanlon & Denyer, 2007; Jennings et al., 2015). Concomitante a isso, foi observado um aumento nos valores positivos do potencial Zeta, devido à incorporação de cargas positivas na GCQ. Esses efeitos podem contribuir para uma melhor interação eletrostática entre esses polímeros 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.. Resultado contrário foi obtido por Sajomsang, Gonil, & Tantayanon (2009), que observaram que a atividade antimicrobiana diminuía com o aumento do grau de substituição da quitosana quaternizada. Em contraste com a GC natural, a quitosana possui relevante atividade antimicrobiana e, sua modificação química, embora melhore sua solubilidade em água, pode ter alterado a interação dessa molécula com as superfícies bacterianas.

A técnica de microscopia de força atômica foi realizada para analisar o efeito do mais potente derivado quaternizado (GCQ-3) sobre células de *S. aureus* ATCC 29213. Para esse propósito e afim de facilitar a execução dessa técnica, as CIM e CBM foram determinadas sobre um número maior de células bacterianas (inóculo mais concentrado), obtendo-se assim, valores de 500 e 1000 µg/mL, respectivamente. Isso foi necessário já que poucas células foram encontradas nas amostras preparadas com o inóculo padrão.

A Fig. 5A mostra bactérias não tratadas formando um típico aglomerado de *Staphylococcus* spp., com altura máxima de 0,9 µm. As Fig. 5B e 5C mostram o efeito da CIM sobre *S. aureus*, com evidentes alterações no tamanho máximo dos micro-organismos para em torno de 1,4 µm. Na Fig. 5D, na presença da CBM, são claramente observadas alterações no tamanho e danos na parede celular, com a presença de rugosidades. Essas alterações no tamanho em relação às amostras não tratadas estão estatisticamente confirmadas, como mostrado na Fig. 5E.

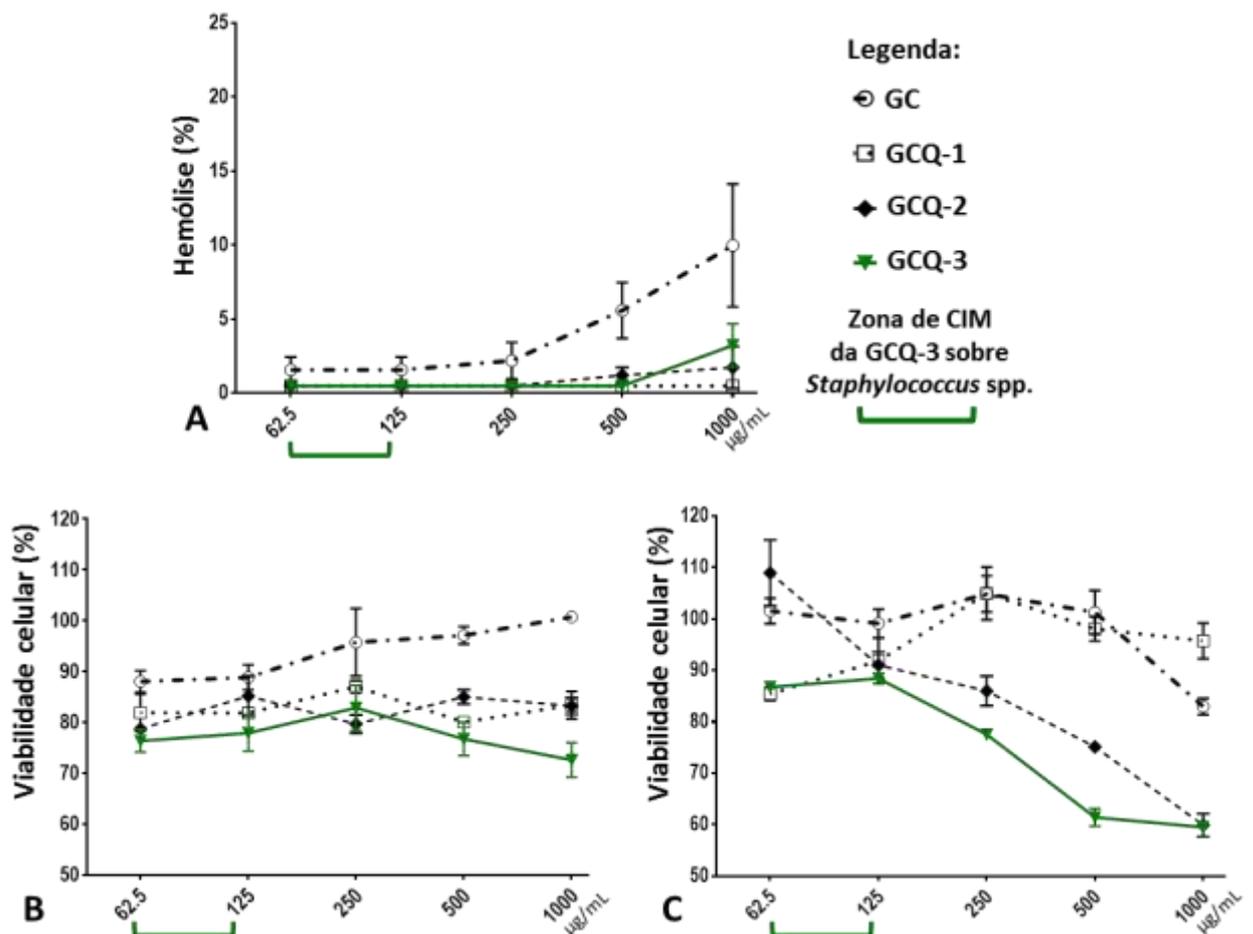


**Fig. 5.** Imagens representativas de MFA mostrando *S. aureus* ATCC 29213 não-tratados (A: grupo controle) e após 24 h de exposição à GCQ-3 (B e C sob a CIM; D sob a CBM). E: média e desvio padrão do tamanho (altura) de *S. aureus* tratados e não tratados obtidos por MFA. O “teste t” foi aplicado e os resultados foram expressos como média ± DP. Um  $P < 0,001$  (\*\*\*) foi considerado estatisticamente significativo.

O aumento no tamanho pode ser também explicado devido à ação da GCQ-3 sobre a membrana celular. Danos nessa barreira podem alterar a osmolaridade celular causando entrada de água do meio extracelular para dentro da bactéria, como observado em *S. aureus* tratados com extratos antimicrobianos oriundo de plantas (Araújo et al., 2015a). Essa desordem pode ser responsável pela inabilidade da reprodução bacteriana na CIM e sua progressão pode ser uma das possíveis causas que levaram à morte celular. Um resultado diferente foi obtido por Campos et al. (2012) que verificou, também por meio de MFA, que a GC pura (10 mg/mL) colapsou as células de *S. aureus*, provavelmente devido à alta concentração utilizada. A ausência de colapso bacteriano nas células mortas devido ao dano causado pela GCQ-3, nas concentrações avaliadas neste estudo, pode ser devido à rigidez da grossa camada de peptidoglicano da parede celular, característica das bactérias Gram-positivas (Eaton et al., 2008).

### 3.3 Ensaio de biocompatibilidade

Testes de biocompatibilidade, em concentrações equivalentes às utilizadas nos ensaios antimicrobianos, também foram realizados para este estudo. O ensaio de hemólise avalia a liberação de hemoglobina devido a danos nas membranas das hemácias. Todos os derivados GCQ não promoveram hemólise acima de 5%, evidenciando excelente biocompatibilidade com eritrócitos, mesmo na mais alta concentração testada (Fig. 6A). Também foi observada uma tendência de maior atividade hemolítica causada pela GC natural. Estudos têm reportado a ocorrência de diminuição de atividade hemolítica associada com a redução da hidrofobicidade em polímeros (Tejero, López, López-Fabal, Gómez-Garcés, & Fernández-García, 2015; Sahariah et al., 2015).



**Fig. 6.** Ensaio de biocompatibilidade em células de mamíferos. **A:** Atividade hemolítica; **B:** Efeito citotóxico sobre linhagem celular de queratinócitos de pele humana de adulto (HaCAT); **C:** Efeito citotóxico em fibroblastos murinos (NIH-3T3).

Para avaliar a citotoxicidade, o efeito da GC e dos derivados GCQ foi verificado sobre uma linhagem celular de queratinócitos de pele de humana de adulto (HaCAT) e uma linhagem de fibroblastos murinos (NIH-3T3). A seleção dessas estirpes celulares para este teste foi baseada numa possível aplicação tópica da GCQ, já que os resultados foram promissores contra patógenos de pele. Os resultados mostraram que em ambas as linhagens celulares, após a ação direta das gomas após 24h, a viabilidade celular foi mantida em mais que 50% (Fig. 6B e 6C). A viabilidade dos queratinócitos após o tratamento com a GCQ-3, por exemplo, ficou em torno de 70% mesmo na mais alta concentração testada de 1000 µg/mL (Fig. 6B), que é cerca de dezesseis vezes maior que a que matou o *S. aureus* (SARM) ATCC 43300. Também foi observada uma diminuição na viabilidade dos fibroblastos, após o tratamento por 24h com as GCQ-2 e GCQ-3 nas concentrações de 500 e 1000 µg/ml (Fig. 6C), no entanto, esses valores foram de quatro a dezesseis vezes maiores que as CIM obtidas sobre todos os *Staphylococcus* spp. avaliados.

Outros estudos têm avaliado o efeito citotóxico de antissépticos comercialmente disponíveis sobre queratinócitos ou fibroblastos (Damour et al., 1992, Mueller e Kramer, 2008; Hirsch et al., 2010). Concentrações citotóxicas determinadas *in vitro* algumas vezes são consideradas menores que as concentrações dos respectivos antissépticos geralmente aplicados na prática clínica, por essa razão, considera-se que os tecidos humanos toleram a exposição aos antissépticos melhor que as culturas celulares (Mueller e Kramer, 2008).

Este trabalho apresentou, pela primeira vez, o efeito biológico direto da GC quimicamente modificada pela introdução de um grupo funcional. Mesmo o derivado menos potente, GCQ-1 (CIM em torno de 1000 µg/mL), apresentou um marcante aumento na atividade antiestafilocócica, quando comparado à GC natural, que apresenta um valor de CIM de 30 mg/mL (Campos et al., 2012). Desse modo, existiu um drástico aumento no efeito antimicrobiano decorrente do processo de quaternização. Futuros estudos fazem-se necessários para melhor elucidar o mecanismo de ação antimicrobiano da GCQ e uma possível influência sobre o processo de cicatrização de feridas. Aplicações biotecnológicas de gomas modificadas são bastante comuns (Rana et al., 2011; Ribeiro et al., 2016), portanto, o uso da GCQ pode ser promissor para o desenvolvimento de biomateriais, quando se é esperado algum efeito antisséptico.

#### 4. Conclusão

Foi apresentada uma rota de modificação química da GC usando-se um reagente amônio quaternário. As modificações químicas dos três derivados propostos neste trabalho foram confirmadas por extensiva caracterização. A hipótese de que a GC modificada por processo de quaternização, com consequente aquisição de cargas positivas em sua estrutura poderia promover um aumento em sua atividade antimicrobiana foi confirmada. Os derivados GCQ apresentaram promissor efeito antibacteriano contra linhagens sensíveis e resistentes do gênero *Staphylococcus* e sua potência foi relacionada ao aumento do grau de substituição e do potencial Zeta. GCQ também apresentou biocompatibilidade com eritrócitos, queratinócitos e fibroblastos. Deste modo, os derivados apresentados neste estudo apresentam uma oportunidade para o desenvolvimento biomateriais e dispositivos biotecnológicos produzidos com GCQ.

#### Agradecimentos

Peter Eaton é financiado pelo projeto Ciência sem Fronteiras via PVE-MEC/MCTI/CAPES/CNPQ/FAPS (Processo número 400398/2014-1), e seu trabalho é financiado pelo FCT/MEC por meio de fundos nacionais e co-financiado pelo FEDER, com o número PT2020. Alexandra Plácido é grata ao FCT por sua bolsa SFRH/BD/97995/2013, financiada pelo POPH-QREN-Tipologia 4.1-Formação Avançada, subsidiado pelo Fundo Social Europeu and Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior. Peter Eaton é financiado pelo FCT via bolsa UID/MULTI/04378/2013.

## Referencias

- Araruna, F. B., Quelemes, P. V., Faria, B. E. F., Kuckelhaus, S. A. S., Marangoni, V. S., Zucolotto, V., Silva, D. A., Santos Júnior, J. R., Leite, J. R. S. A., & Eiras, C. (2013). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles reduced and stabilized by cashew tree gum. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, 5(8), 890–893.
- Araújo, A. R., Quelemes, P. V., Perfeito, M. L. G., Lima, L. I., Sá, M. C., Nunes, P. H. M., Joanitti, G. A., Eaton, P., Soares, M. J. S., & Leite, J. R. S. A. (2015a). Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Terminalia fagifolia* Mart. extract and fractions. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 14(25) doi: 10.1186/s12941-015-0084-2.
- Araújo, T. S. L., Costa, D. S., Sousa, N. A., Souza, L. K. M., Araújo, S., Oliveira, A. P., Sousa, F. B. M., Silva, D. A., Barbosa, A. L. R., Leite, J. R. S. A., & Medeiros, J. V. R. (2015b). Antidiarrheal activity of cashew GUM, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 174, 299–307.
- Banerjee, C., Ghosh, S., Sen, G., Mishra, S., Shukla, P., & Bandopadhyay, R. (2013). Study of algal biomass harvesting using cationic gum from the natural plant source as flocculant. *Carbohydrate Polymers*, 92, 675–681.
- Campos, D. A., Ribeiro, A. C., Costa, E. M., Fernandes, J. C., Tavaría, F. K., Araruna, F. B., Eiras, C., Eaton, P., Leite, J. R. S. A., & Pintado, M. M. (2012). Study of antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum. *Carbohydrate polymers*, 90, 270–274.
- Carvalho, N. S., Silva, M. M., Silva, R. O., Nicolau, L. A. D., Sousa, F. B. M., Damasceno, S. R. B., Silva, D. A., Barbosa, A. L. R., Leite, J. R. S. A., & Medeiros, J. V. R. (2015). Gastroprotective properties of cashew gum, a complex heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale*, in naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. *Drug Dev. Res.*, 76(3), 143–151.

CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard M02–A10. Wayne, Pa, 2012.

Cunha, P. L. R., Maciel, J. S., Sierakowski, M. R., de Paula, R. C. M., & Feitosa, J. P. A. (2007). Oxidation of cashew tree gum exudate polysaccharide with TEMPO reagent. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18, 85–92.

Cunha, P. L. R., Paula, R. C. M., & Feitosa, J. P. A. (2009). Polysaccharides from Brazilian biodiversity: an opportunity to change knowledge into economic value. *Química Nova*, 32, 649–660.

Damour, O., Zhi Hua, S., Lasne, F., Villain, M., Rousselle, P., & Collombel, C. (1992). Cytotoxicity evaluation of antiseptics and antibiotics on cultured human fibroblasts and keratinocytes. *Bums*, 18(6), 479–485.

De Paula, R. C. M., Healthy, F., & Budd, P. M. (1998). Characterization of *Anacardium occidentale*: Exudate polysaccharide. *Polym. Int.*, 45, 27–35.

De Paula, R. C. M. & Rodrigues, J. F. (1995). Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. *Carbohydrate Polymers*, 26 (3), 177–181.

DeLeo, F. R. & Chambers, H. F. (2009). Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *The J. Clin. Invest.*, 119 (9), 2464–2474.

Dias, S. F. L., Nogueira, S. S., Dourado, F. F., Guimarães, M. A., Pitombeira, N. A. O., Gobbo, G. G., Primo, F. L., de Paula, R. C. M., Feitosa, J. O. A., Tedesco, A. C., Nunes, L. C. C., Leite, J. R. S. A., & Silva, D. A. (2016). Acetylated cashew gum-based nanoparticles for transdermal delivery of diclofenac diethyl amine. *Carbohydrate Polymers*, 143, 254–261.

Eaton, P., Fernandes, J. C., Pereira, E., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2008). Atomic force study of antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ultramicroscopy*, 108, 1128–1134

Gonzalez, N., Sevillano, D., Alou, L., Cafini, F., Gimenez, M., Gomez-Lus, M. L., Prieto, J., & Aguilar, L. (2013). Influence of the MBC/MIC ratio on the antibacterial activity of vancomycin versus linezolid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in a pharmacodynamics model simulating serum and soft tissue interstitial fluid concentrations reported in diabetic patients. *J. Antimicrob. Chemother.*, 68(10), 2291–2295.

Gowthamarajan, K., Kumar, G. K. P., Gaikwad, N. B., & Suresh, B. (2011). Preliminary study of *Anacardium occidentale* gum as binder in the formulation of paracetamol tablets. *Carbohydrate Polymers*, 83, 506–511.

Hirsch, T., Koerber, A., Jacobsen, F., Dissemond, J., Steinau, H., Gatermann, S., Al-Benna, S., Kesting, M., Seipp, H., & Steinstraesser, L. (2010). Evaluation of toxic side effects of clinically used skin antiseptics *in vitro*. *Journal of Surgical Research*, 164, 344–350.

Huang, Y., Yu, H., & Xiao, C. (2007). pH-sensitive cationic guar/poly (acrylic acid) polyelectrolyte hydrogels: Swelling and *in vitro* drug release. *Carbohydrate Polymers*, 69, 774–783.

Ioannou, C. J., Hanlon, G. W., & Denyer, S. P. (2007). Action of Disinfectant Quaternary Ammonium Compounds against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(1), 296–306.

Jennings, M. C., Minbiole, K. P. C., & Wuest, W. M. (2015). Quaternary Ammonium Compounds: An Antimicrobial Mainstay and Platform for innovation to Address Bacterial Resistance. *ACS Infect. Dis.*, 1, 288–303.

Jevons, M. P. (1961). "Celbenin"-resistant staphylococci. *Br. Med. J.*, 1, 124–125.

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.

- Kumar, R., Patil, M. B., Patil, S. R., & Paschapur, M. S. (2009). Evaluation of *Anacardium occidentale* gum as gelling agent in aceclofenac gel. *International Journal of PharmTech Research*, 1(3), 695–704.
- Lima, R. D. N., Lima, J. R., de Salis, C. R., & Moreira, R. D. (2002). Cashew-tree (*Anacardium occidentale* L.) exudate gum: a novel bioligand tool. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 35, 45–53.
- Moreira, B. R., Batista, K. A., Castro, E. G., Lima, E. M., & Fernandes, K. F. (2015). A bioactive film based on cashew gum polysaccharide for wound dressing applications. *Carbohydrate Polymers*, 122, 69–76.
- Muller, G. & Kramer, A. (2008). Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61, 1281–1287.
- Moura Neto, E. D., Maciel, J. S., Cunha, P. L. R., de Paula, R. C. M., & Feitosa, J. P. A. (2011). Preparation and Characterization of a Chemically Sulfated Cashew Gum Polysaccharide. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22, 1953–1960.
- Nichifor, M., Stanciu, M. C. & Simionescu, B. C. (2010). New cationic hydrophilic and amphiphilic polysaccharides synthesized by one pot procedure. *Carbohydrate polymers*, 82, 965–975.
- Novac, O., Lisa, G., Profire, L., Tuchilus, C., & Popa, M. I. (2014). Antibacterial quaternized gellan gum based particles for controlled release of ciprofloxacin with potential dermal applications. *Materials Sci. And Engineering C*, 35, 291–299.
- Oliveira E. F., Paula, H. C. B., & de Paula, R. C. M. (2014). Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113, 146–151.

Pal, S., Mal, D. & Singh, R. P. (2007). Synthesis and Characterization of Cationic Guar Gum: A High Performance Flocculating Agent. *Journal of Applied Polymer Science*, 105, 3240–3245.

Pal, S.; Ghosh, S., Sen, G., Jha, U., & Singh, R. P. (2009). Cationic tamarind kernel polysaccharide (Cat TKP): A novel polymeric flocculant for the treatment of textile industry wastewater. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45, 518–523.

Pasberg-Gauhl, C. (2014). A need for new generation antibiotics against MRSA resistant bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11, 109–116.

Piraino, F. & Selimovic, S. (2015). A Current View of Functional Biomaterials for Wound Care, Molecular and Cellular Therapies. *BioMed Research International*, 2015, Article ID 403801, 10 pages.

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.

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.

Rana, V., Rai, P., Tiwary, A. K., Singh, R. S., Kennedy, J. F., & Knill, C. J. (2011). Modified gums: Approaches and applications in drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 83, 1031–1047.

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.

Sahariah, P., Benediktssdóttir, B. E., Hjálmarsdóttir, M. Á., Sigurjonsson, O. E., Sørensen, K. K., Thygesen, M. B., Jensen, K. J., & Másson, M. (2015). Impact of Chain Length on Antibacterial Activity and Hemocompatibility of Quaternary N- Alkyl and N,N- Dialkyl Chitosan Derivatives. *Biomacromolecules*, 16, 1449–1460.

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, & Porto, A. L. F. (2006). O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. *Ciência Rural*, 36 (1), 149–154.

Singh, R. P., Pal, S. & Ali, S. A. (2014). Novel biodegradable polymeric flocculants based on cationic polysaccharides. *Adv. Mat. Lett.*, 5(1), 24–30.

Silva, D. A, de Paula, R. C. M., Feitosa, J. P. A., Brito, A. C. F., Maciel, J. S., & Paula, H. C. B. (2004). Carboxymethylation of cashew tree exudates polysaccharide. *Carbohydrate polymers*, 58, 163–171.

Silva, D. A., Feitosa, J. P. A., de Paula, H. C. B., & Paula, R. C. M. (2009). Synthesis and characterization of cashew gum/acrylic acid nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, 29, 437–441.

Song, Y., Sun, Y., Zhang, X., Zhou, J. & Zhang, L. Homogeneous Quaternization of Cellulose in NaOH/Urea Aqueous Solutions as Gene Carriers. *Biomacromolecules*, 2008, 9, 2259–2264.

Tejero, R., López, D., López-Fabal, F., Gómez-Garcés, J. L., & Fernández-García, M. (2015). High Efficiency Antimicrobial Thiazolium and Triazolium Side-Chain

Polymethacrylates Obtained by Controlled Alkylation of the Corresponding Azole Derivatives. *Biomacromolecules*, 16, 1844–1854.

Torquato, D. S., Ferreira, M. L., Sá, G. C., Brito, E. S., Pinto, G. A. S., & Azevedo, E. H. F. (2004). Evaluation of antimicrobial activity of cashew tree gum. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20, 505–507.

Wang, Y. & Xie, W. (2010). Synthesis of cationic starch with a high degree of substitution in an ionic liquid. *Carbohydrate Polymers*, 80, 1172–1177.

Yamassaki, F. T., Lenzi, R. M., Campestrini, L. H., Bovo, F., Seyfried, M., Soldera-Silva, A., Stevan-Hancke, F. R., Zawadzki-Baggio, S. F., Pettolino, F. A., Bacic, A., Maurer, J. B. B. (2015). Effect of the native polysaccharide of cashew-nut tree gum exudate on murine peritoneal macrophage modulatory activities. *Carbohydrate Polymers*, 125, 241–248.

Yu, F., Liu, Y., Lv, J., Qi, X., Lu, C., Ding, Y., Li, D., Liu, H., & Wang, L. (2015). Antimicrobial susceptibility, virulence determinant carriage and molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates associated with skin and soft tissue infections. *Braz J. Infec. Dis.*, 19(6), 614–622.

Yu, H., Huang, Y., Ying, H., & Xiao, C. (2007). Preparation and characterization of quaternary ammonium derivative of konjac glucomannan. *Carbohydrate Polymers*, 69, 29–40.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

---

- Este trabalho promoveu a modificação química da GC por reação de quaternização e apresentou três derivados GCQ;
  - A modificação química foi comprovada pela alteração da hidrofiliicidade do polímero, além da evidência da presença do grupamento químico introduzido na estrutura do polissacarídeo, confirmada pelos métodos de caracterização realizados;
    - Neste estudo, foi apresentado, pela primeira vez, o efeito farmacológico direto da GC quimicamente modificada pela introdução de um grupo funcional;
    - A hipótese de que a modificação da GC por quaternização, com consequente aquisição de cargas positivas em sua estrutura promoveria o aumento de seu efeito antibacteriano foi confirmada;
    - Os derivados GCQ apresentaram atividade antiestafilocócica com potência crescente relacionada ao aumento do grau de substituição do composto quaternário inserido na estrutura química do polímero;
    - Os derivados GCQ também se mostraram biocompatíveis sobre células de mamíferos, evidenciando que a GCQ se apresenta como um biomaterial com possibilidade de aplicação;
    - Futuros estudos com utilização da GCQ podem ser realizados no intuito de se desenvolverem outros biomateriais com estruturas e funções diferenciadas como, por exemplo: membranas, *scaffolds* e géis;
    - Com esse novo biomaterial, dispositivos e/ou (nano)compósitos biotecnológicos, especialmente os direcionados para uso tópico, também podem ser vislumbrados em próximos estudos;
    - Uma solicitação de pedido de patente das aplicações da GCQ está sendo concluída para ser submetida antes da finalização do período de graça estipulado pelo art. 12 da Lei Brasileira da Propriedade Industrial.