



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um mundo em transformação

MICROGEL DE AMIDO MODIFICADO POR ENXERTIA COM OXIDO NÍTRICO: UMA OPÇÃO COMO POTENCIAL FÁRMACO

STARCH MICROGEL MODIFIED BY GRAFTING WITH NITRIC OXIDE: AN OPTION AS A POTENTIAL DRUG

Mylena Ardenghi de Lima*, Regiane da Silva Gonzalez†, Amanda Ardenghi dos Santos‡, Jessica Fernanda da Silva§, Ana Paula Peron¶, Aldo Eloíso Jobl||

RESUMO

O amido é um composto complexo encontrado nas plantas na forma de grânulos, possui a função de ser a reserva energética dos vegetais. Nesta pesquisa, foram desenvolvidos sistemas bioativos microparticulados a partir do amido por enxertia com doadores de óxido nítrico (NO). Assim, estas micropartículas apresentam a mesma bioatividade do NO, como as ações antioxidante, anti-inflamatória e bactericida, portanto, de elevado potencial de comercialização como fármaco. A capacidade de liberação do NO foi quantificada espectrofotometricamente e avaliada a morfologia das micropartículas. Também foi realizado a pesquisa dos potenciais antioxidante, bactericida e de geno e citotoxicidade. Foi verificado que os materiais apresentam tamanhos na ordem de 237 ± 48 são capazes de liberar $8,57 \text{ milimol.L}^{-1}$ de NO por grama de amido. As micropartículas apresentaram atividade bactericida frente a Salmonela, S aureus e E coli bem como ação antioxidante frente ao DPPH, apresentando para as concentrações de 2, 0,2, 0,02 e 0,002% (m/V) o amido a redução de 90, 85, 65 e 30 % os radicais presentes, respectivamente. Além disso, nas concentrações testadas o material não apresentou geno ou citotoxicidade. Assim, podemos concluir que o material desenvolvido apresenta potencial de comercialização como fármaco, aumentando grandemente o valor agregado do amido.

Palavras-chave: Micropartículas; Amido nitrosado; Antioxidante; Bactericida.

ABSTRACT

Starch is a complex compound found in plants in the form of granules, and has the function of being the energy reserve of vegetables. In this research, microparticulate bioactive systems were developed from starch by grafting with nitric oxide (NO) donors. Thus, these microparticles have the same bioactivity as NO, with antioxidant, anti-inflammatory and bactericidal actions, therefore, with high potential for commercialization as a drug. The NO release capacity was quantified spectrophotometrically and the morphology of the microparticles was evaluated. Research on antioxidant, bactericidal and geno and cytotoxicity potentials was also carried out. It was verified that the materials have sizes in the order of 237 ± 48 are capable of releasing $8.57 \text{ millimol.L}^{-1}$ of NO per gram of starch. The microparticles showed bactericidal activity against Salmonella, S aureus and E coli as well as antioxidant action against DPPH, with starch reduction of 90 at concentrations of 2, 0.2, 0.02 and 0.002% (m/V), 85, 65 and 30% of the radicals present, respectively. Furthermore, at the concentrations tested, the material did not show geno or cytotoxicity. Thus, we can conclude that the material developed has commercial potential as a drug, greatly increasing the added value of starch.

* Engenharia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil; Mylena Ardenghi de Lima

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão; Paraná, Brasil Regiane da Silva Gonzalez

‡ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão; Paraná, Brasil Amanda Ardenghi dos Santos

§ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão; Paraná, Brasil; Jessica Fernanda da Silva

¶ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão; Paraná, Brasil; Ana Paula Peron

|| Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente São Paulo, Brasil; Aldo Eloíso Jobl



Keywords: Microparticles; Nitrosed starch; Antioxidant; Bactericide

1 INTRODUÇÃO

Segundo Cavalcanti (2002), os polissacarídeos são polímeros naturais encontrados com facilidade na natureza, dentre os quais podemos citar a celulose e o amido. São facilmente degradados pelo organismo, possuem baixo custo e são considerados inócuos. Devido à grande variabilidade e características é bastante usado em pesquisas industriais.

O amido é um polímero versátil, pois, suas propriedades físico-químicas podem ser alteradas facilmente por modificações enzimáticas ou tratamentos físicos, e químicos. Uma das alterações é a reticulação que pode tornar o amido resistente a condições de pH elevados, a variações de temperatura, e outras condições de processamento (JOBILING, 2004, SÁNCHEZ- RIVERA et al., 2005, CEREDA; VILPOUX; DEMIATE, 2003).

Em seu estado nativo se compõe por grânulos semicristalinos insolúveis em água que, ao microscópio, apresentam-se brilhantes com dimensões que variam de acordo com a sua origem botânica (GUILBOT & MERCIER, 1985). O amido é um polissacarídeo natural encontrado na forma de grânulos em cereais, raízes, tubérculos e leguminosas (HUANG, 2006). Os grânulos de amido absorvem água e incham quando aquecidos na presença de água. Alguns componentes do amido especialmente a amilose lixivia e se solubiliza. Com o aumento da temperatura e absorção de água, os grânulos se rompem e as cadeias são desordenadas (ZHU, 2015). Após o resfriamento, a amilose em solução sofre um processo chamado retrogradação, caso a concentração seja suficientemente elevada, esse processo resulta na formação de uma rede que transforma a solução em um gel (ICHIHARA et al., 2016).

Os amidos nativos têm alguns inconvenientes, porque as condições do processo (temperatura, pH, pressão) limitam a sua utilização em aplicações industriais, por apresentarem baixa resistência ao cisalhamento, possui retrogradação e sinérese elevadas. Estas deficiências podem ser superadas submetendo o amido a modificações. Com o objetivo de melhorar as propriedades funcionais de materiais obtidos a partir de amido, vários trabalhos têm sido propostos com o intuito de alterar o caráter hidrofílico, as propriedades mecânicas e proporcionar bioatividade, como ação antimicrobiana e antioxidante (ARAÚJO et al., 2015). Neste sentido a modificação química do amido por acetilação e pelo uso de ácido tioglicólico se mostram como uma alternativa interessante.

Nesta pesquisa, foi desenvolvido amido modificado por enxertia utilizando o ácido tioglicólico. Este tiol quando enxertado na cadeia do amido pode ser reversivelmente nitrosado, formando os RSNOs (RS-Nitrosotióis), onde R representa parte da cadeia do ácido tioglicólico. Assim, neste caso, o material desenvolvido passa a apresentar as mesmas atividades atribuídas ao NO (óxido nítrico) (LANCASTER, 1996)

O NO é uma molécula com múltiplos efeitos biológicos, entre os quais destacamos os efeitos anti-inflamatórios, de relaxamento muscular e vasodilatação, além de apresentar, quando em alta concentração ação microbicida, portanto, tem potencial para ser comercializado como fármaco. Existem trabalhos na literatura que estudam os efeitos antioxidantes e antitóxicos das células vegetais. Segundo Campos et al. (2019), o tratamento com nitrosotiol (SNP) ajuda a reduzir o estresse osmótico nas plantas, pois ocorre o acúmulo de prolina. Quando a planta está sob estresse, a prolina participa do processo osmótico.

Assim, neste trabalho microgeis contendo amido modificado foram desenvolvidos para obtenção de um sistema microparticulado, com atividade antioxidante. A cinética de liberação de NO foi avaliada espectrofotometricamente utilizando o método de Griess. Além disso, utilizando-se de células do meristema



de raízes de *A. cepa*, foi possível avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade de soluções de ácido tiolático, amido esterificado e amido nitrosado.

2 MÉTODOS

A pesquisa voltada ao desenvolvimento de materiais bioativos obtidos a partir de amido modificado foi desenvolvida nos laboratórios de pesquisa da UTFPR-CM, durante os anos de 2020 e 2021, utilizando como base de pesquisa trabalhos anteriores do grupo (SILVA, 2015). Após o desenvolvimento dos materiais os mesmos foram submetidos a avaliação das propriedades bioativas através de estudos de casos utilizando protocolos aprovados. Os procedimentos experimentais utilizados foram:

Modificação química do amido: A modificação do amido ocorreu pelo processo de enxertia utilizando ácido tiolático (Sigma) em meio ácido à 60°C (SILVA, 2015). A reação foi comprovada através de análise de espectroscopia de IV através do espectrofotômetro Shimadzu, IR Affinity⁻¹.

Produção de microgéis: A síntese dos microgéis ocorreu a partir de um sistema bifásico de água em diclorometano, os microgéis semi-interpenetrados foram obtidos por meio da reticulação da acrilamida na presença de amido modificado (QUADROS, 2017).

Nitrosação: O amido modificado e os microgéis foram nitrosados através de reação em meio ácido (HCl 1 mol.L⁻¹) com nitrito de sódio (60 mmol.L⁻¹) durante 5min. Em seguida o amido ou o microgel foram filtrados à vácuo, sendo o produto conservado refrigerado (-10°C) para posterior caracterização e uso (SEABRA, 2010).

Determinação do teor de NO: A quantificação do teor de óxido nítrico presente foi realizada através do uso de reagente de Griess. Para isto foram preparadas solução estoque de sulfanilamida 0,2% em HCl 6 mol.L⁻¹, NEED 0,1% em HCl 6 mol.L⁻¹ e HgC₁₂ 0,5mmol.L⁻¹ em DMSO. O teor de NO foi determinado através de uma curva de calibração obtida a partir da diluição de uma solução padrão (5 mmol.L⁻¹) de nitrito de sódio em meio ácido (1,67mol.L⁻¹ de HCl) resultando em soluções com concentrações variando entre 0,1 mml.L⁻¹ e 1,0 mol.L⁻¹ (SEABRA, 2010).

Caracterização morfológica dos microgéis: A morfologia e o tamanho médio das partículas foram determinados por meio de microscopia óptica e posterior análise das imagens utilizando o software Image Tool.

Determinação do grau de intumescimento dos microgéis: Capacidade de absorção de água foi determinada através da razão entre a massa dos microgéis intumescidos em água e a massa das microgéis secos em estufa (SILVA, 2007).

Ensaio citotóxico: Foi realizado utilizando células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* através da avaliação da ação de soluções de concentração conhecida do produto de interesse. A análise do efeito citotóxico de cada solução foi realizada utilizando um grupo experimental com três bulbos de cebolas, cujas raízes foram postas em contato com soluções de amido em diferentes concentrações por um tempo de exposição de 24 horas e 48h podendo assim avaliar a ação das soluções em mais de um ciclo celular (GUERRA, 2002).

Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH: Utilizando o método de Pitz (2018) a ação antioxidante do amido nitrosado foi avaliada para soluções de amido nas concentrações de 2, 0,2, 0,02 e 0,002% (m/V). A capacidade de eliminar o radical DPPH foi utilizada para determinar a % de atividade antioxidante (AA %) o qual foi calculado através da Equação (1):

$$AA\% = \frac{(A_{controle} - A_{amostra})}{(A_{controle})} \times 100 \quad (1)$$



Avaliação do potencial antibacteriano: A avaliação do potencial antibacteriano foi realizada pelo método de difusão em disco. A difusão do antimicrobiano leva à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano, cujo diâmetro é inversamente proporcional à concentração inibitória mínima. Foram utilizadas as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*.

3 RESULTADOS

A modificação química do amido de mandioca com ácido tiolático por reações de condensação pode ser comprovada através dos espectros de Infravermelho. Pode-se ver para o amido modificado um pico em 1728 cm^{-1} correspondente a carbonila de ésteres, derivado do ácido tioglicólico. O sinal para carbonila do ácido tiolático puro foi observado em 1720 cm^{-1} . Em 1650 cm^{-1} pode-se observar o sinal de carbonila para o amido. Comprovando assim a modificação do amido através do processo de esterificação em meio ácido.

Após a modificação por esterificação foi possível obter microgéis de amido modificado com ácido tiolático os quais apresentaram morfologia esférica e tamanhos aproximados de $237\pm 48\text{ nm}$. O processo de síntese utilizado levou a formação de microgéis semi-interpenetrados obtidos através da reticulação da acrilamida na presença de solução contendo amido acetilado. Estes microgéis foram capazes de absorver em apenas 15 minutos aproximadamente duas vezes a massa seca ($2,00\pm 0,11$), sendo o intumescimento em 45min igual a $3,01\pm 0,31$. Uma vantagem no uso de microgéis é a presença de água dentro desses sistemas poliméricos a qual pode ser utilizada como forma de incorporar princípios ativos hidrossolúveis levando a obtenção de sistemas de liberação controlada. Além disso, em virtude da presença de grupos tíois, os microgéis de amido acetilado com ácido tiolático podem ser utilizados como matrizes para liberação de óxido nítrico após processo de nitrosação.

Neste trabalho, procedeu-se o processo de nitrosação tanto somente do amido modificado quanto do amido semi-interpenetrado nos microgéis. A nitrosação do amido modificado através do processo de esterificação com ácido tiolático ocorreu devido ao ataque nucleofílico do cátion nitrosonion (NO^+) ao átomo de enxofre do grupo tiol (SH), de modo a formar o grupo SNO, o qual sequentemente será capaz de liberar NO. Durante o processo, ocorreu a mudança de coloração do amido de branco para rosa claro, indicando a formação de grande quantidade de grupos SNO. A presença de grupos NO pode ser comprovada através da avaliação espectrofotométrica utilizando reagente de Griess, sendo a quantificação do teor de óxido nítrico realizada analiticamente com o uso de nitrito de sódio como padrão, cuja curva de calibração, obtida a partir das curvas de absorção máxima em 542nm, apresentou coeficiente de regressão linear de 0,98 ($R^2=96\%$). A partir da equação de reta obtida foi possível aferir que cada grama de amido foi capaz de liberar $8,57\times 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de óxido nítrico, ou seja, 116,6g do amido modificado e nitrosado liberam 1 mol de NO.

Com base nos resultados de geno e citotoxicidade, verificou-se que o amido nitrosado não reduziu de forma significativa o índice de divisão celular dos meristemas analisados. Nas condições de análises estabelecidas, o amido nitrosado desenvolvido não foi citotóxico e nem genotóxico às células meristemáticas de raízes de *A. cepa*, tendo grande viabilidade de uso para emprego como medicamento.

Além disso, através do ensaio de DPPH foi verificado com nível de 95% de significância a ação antioxidante do amido nitrosado para soluções de amido nas concentrações de 2, 0,2, 0,02 e 0,002% (m/V). Após 30min em contato (em repouso) com o reativo DPPH através da avaliação espectrofotométrica verificou-se que o amido possui a capacidade de eliminar o radical DPPH entre 90 e 30% para as concentrações utilizadas, demonstrando um efeito dependente.

Quanto a atividade bactericida ensaios frente à *Salmonella* e *S aureus* mostraram concentração bactericida mínima (MIB) para solução de amido na concentração de $9,7\text{ (mg}\cdot\text{mL}^{-1})$. Além disso ensaios utilizando filmes de amido apresentaram ação inibitória frente a *Staphylococcus aureus*, com medidas do halo variando de 3,0



a 3,6 mm. Já frente a *Escherichia coli*, os filmes permitiram a formação de halos de inibição maiores, entre 9,6 e 15 mm. Entretanto não foi observado o aumento da atividade bactericida para o filme contendo o maior teor de ácido tioglicólico.

Neste sentido, os resultados de atividade bactericida e ação antioxidante, são sugestivos para o desenvolvimento de fármaco a partir do amido, aumentando grandemente o valor agregado.

4 CONCLUSÃO

O microgéis de amido enxertado com S-nitroso-tiol desenvolvido apresenta potencial de comercialização como fármaco, aumentando grandemente o valor agregado do amido.

Microgéis apresentam como vantagem o fato de que poderem ser utilizados em sistemas microparticulados, ou ainda em sistemas tradicionais de curativos na forma de membranas, podendo ainda ser desidratados para comercialização. Além disso, uma vez que a estabilidade do óxido nítrico é maior para sistemas desidratados, devido ao sistema de cadeia, os microgéis podem ser uma alternativa para aumentar o tempo de prateleira de materiais doadores de óxido nítrico. Neste sentido os hidrogéis de amido acetilado com doadores de NO apresentam viabilidade de utilizações como matrizes para liberação de óxido nítrico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à UTFPR, CNPq e Fundação Araucária pelo amparo e apoio financeiro a pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, G. K. P.; SOUZA, S. J.; SILVA, M. V.; YAMASHITA, F.; GONCALVES, O. H.; LEIMANN, F. V.; SHIRAI, M. A. Physical, antimicrobial and antioxidant properties of starch-based film containing ethanolic propolis extract. *International Journal of Food Science and Technology*, 2015.
- BAJPAI, S. K., CHAND, N., & AHUJA, S. (2015). Investigation of curcumin release from chitosan/cellulose micro crystals (CMC) antimicrobial films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 440–448.
- BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N. A. AND GURNY, R. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57: 19-34(2004).
- CAMPOS, FV.; OLIVEIRA, JÁ.; PEREIRA, M G.; FARNESE, FS. **Nitric oxide and phytohormone interactions in the response of *Lactuca sativa* to salinity stress** ORIGINAL ARTICLE Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019.
- CAVALCANTI, O. A. **Excipientes farmacêuticos: perspectivas dos polissacarídeos na pesquisa e desenvolvimento de novos sistemas de liberação.** Arquivo de ciências da saúde UNIPAR, vol. 6, p. 53-56, jan.-abr. 2002.
- CHIAVEGATTO, R.B.; CHAVES, ALA.; SILVA, ICA.; LIMA, LARS; TECHIO, VH. **Cytotoxic and genotoxic effects of *Solanum lycocarpum* St.-Hil (Solanaceae) on the cell cycle of *Lactuca sativa* and *Allium cepa*.** *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, Maringá, v. 39, n. 2, p. 201-210, Apr.-June, 2017.
- GIUNCHEDI, P.; CONTE, U.; CHETONI, P.; SAETTONE, M.F. **Pectin microspheres as ophthalmic carrier for piroxicam evaluation in vitro and in vivo in albino rabbits.** *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 9, p. 1-7, 1999.



- GONÇALVES, FLL. **Avaliação da proteção e tratamento das alças intestinais fetais utilizando hidrogel (biomaterial) e S-nitrosoglutationa (GSNO) no modelo experimentos de gastrosquise.** Tese (Doutorado em Ciências) Programa de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp-Campinas, SP, 2011.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana.** ISBN: 85-87528-38-6. Editora FUNPEC. Ribeirão Preto – SP, 2002.
- GUILBOT, A.; MERCIER, C. Starch. In: ASPINALL, G. O. (Ed.). **The Polysaccharides.** Orlando: Academic, 1985. v.3, p. 209-282.
- HUANG, J. **Function-Structure Relationships of Acetylated Pea Starches.** The Netherlands, 2006. 152p. Ph.D. thesis. Wageningen University. 2006.
- ICHIHARA, T.; FUKUDA, J.; TAKAHA, T.; SUZUKI, S.; YUGUCHI, Y.; KITAMURA, S. Small-angle X-ray scattering measurements of gel produced from α amylase-treated cassava starch granules. **Food Hydrocolloid**, v.55, p.228-234, 2016.
- JOBLING, S. **Improving starch for food and industrial applications. Current Opinion in Plant Biology.** v. 7. p. 210-218. 2004.
- LANCASTER JR., J., Ed. **In Nitric Oxide - Principles and Action;** Academic Press: New York, 1996.
- PITZ, H, S. **Avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo de extratos de cascas de jaboticaba (plinia peruviana) e sua atuação durante o processo de cicatrização.** Tese (Doutorado em Biologia Celular) Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/193684>. Acesso em 28 de agosto de 2021.
- QUADROS, G. C et al. Caracterização do intumescimento e morfologia de microgéis de poliacrilamida. **V Encontro Regional de Química.** Campo Mourão, 2017. Disponível em: <https://portaldeinformacao.utfpr.edu.br/Record/oai:ocs.200.19.73.15:paper-3647>. Acesso em 28 de agosto de 2021.
- SÁNCHEZ-RIVERA, M.M.; GARCÍA-SUÁREZ, F.J.L.; VELÁZQUEZ DEL VALLE, M.; GUTIERREZ-MERAZ, F.; BELLO-PÉREZ, L.A. **Partial characterization of banana starches oxidized by different levels of sodium hypochlorite. Carbohydrate Polymers,** v.62, p. 50 - 56, 2005.
- SILVA, J. F. **Modificação de amido de milho para formação de filmes plásticos.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2015. Disponível em: https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/6629/2/CM_COEAL_2015_1_05.pdf. Acesso em 28 de agosto de 2021.
- SILVA C. T. E JASIULIONIS, M. G. **Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer.** Cancer/Artigos. P. 38-42.
- SEABRA, AMEDEA B., MARTINS, DORIVAL, SIMÕES, MÁIRA M.S.G. ET AL. **Antibacterial Nitric Oxide-Releasing Polyester for the Coating of Blood-Contacting Artificial Materials.** Artificial Organs, 34: E204 - E214 2010.
- VEIGA, P.; VILPOUX, O.; CEREDA, M. P. **Possíveis usos de amido de mandioca: critérios de qualidade.** Boletim Técnico do CERAT, 1995.
- ZHU, F.; **Composition, structure, physicochemical properties, and modifications of cassava starch.** Carbohydrate Polymers, v.122, p.456-480, 2015.