

Estudo do alginato e sua estrutura após a sua purificação

Ângelo Romeu da Silva Júnior¹, Juliana Kelmy Macário Barboza Daguano¹, Jorge Vicente Lopes da Silva¹

arsilva@cti.gov.br, juliana.daguano@cti.gov.br, jorge.silva@cti.gov.br

**¹Divisão de Tecnologias para Produção e Saúde
CTI/MCTI Renato Archer – Campinas/SP**

Abstract.

Extensive research into seaweed in biomedical applications is gaining increasing notoriety, as in the case of the polymer extracted from these algae, alginate. Alginate oligosaccharides are linear polysaccharides with low molecular weight present in the cell walls of brown algae, being characterized by their anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant, antitumor benefits. Furthermore, their low toxicity, non-immunogenicity and biodegradability make them an excellent component for biomedical materials, based on their chemical or biochemical modification capabilities. Its applications can involve both the food industry as an additive to modify the texture of foods due to its high viscosity and gelling properties, as well as in other processes. Finally, the 3D bioprinting technique has been quite attractive and revolutionary in the area of additive manufacturing, representing new approaches to implementing biological materials such as living cells and extracellular matrices in the form of a 3D structure to manufacture multicellular tissues, often composed of natural and synthetic polymers in biotin applications. Thus, the present work aimed mainly at carrying out crucial steps involving preparation of the alginate-based hydrogel for 3D printing, as well as carrying out purification involving characterization tests by FTIR and SEM-EDS, highlighting a purification carried out with success

Resumo

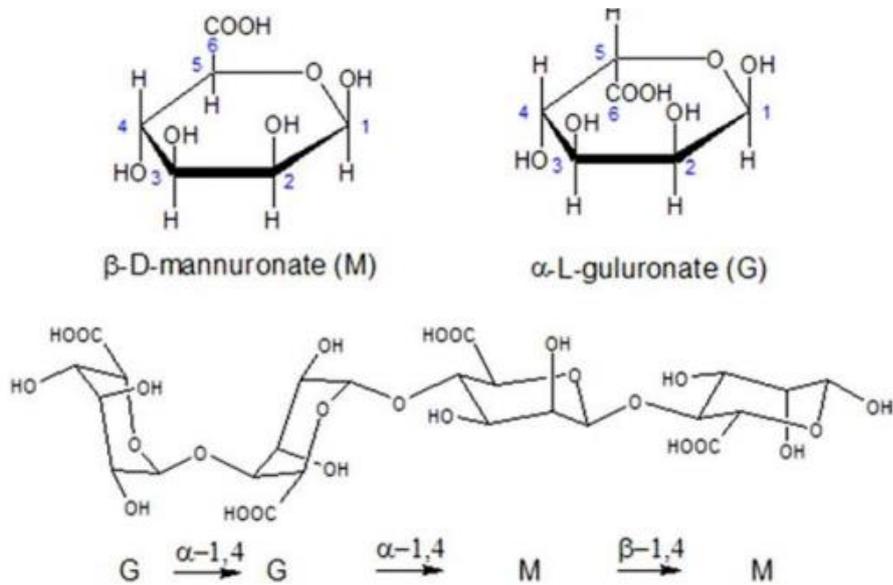
pesquisas extensas acerca das algas marinhas em aplicações biomédicas vêm obtendo cada vez mais notoriedade, como no caso do polímero extraído dessas algas, o alginato. Oligossacarídeos de alginato são dados como polissacarídeos lineares com baixo peso moleculares presentes nas paredes celulares de algas marrons, sendo caracterizados pelos seus benefícios anti-inflamatórios, anti-microbianos, antioxidantes, antitumorais. Ademais, sua baixa toxicidade, não imunogenicidade e biodegradabilidade os tornam um excelente componente para materiais biomédicos, sendo alicerçado por suas capacidades de modificações químicas ou bioquímicas. Suas aplicações podem envolver tanto na indústria alimentícia como um aditivo para modificação da textura de alimentos em decorrência da sua alta viscosidade e propriedade gelificante, como em outros processos. Por fim, a técnica de bioimpressão 3D, vem sendo bastante atraente e revolucionária na área de manufatura aditiva, representando novas abordagens de implementação de materiais biológicos como células vivas e matrizes extracelulares na forma de estrutura 3D para fabricar tecidos multicelulares, sendo compostos muitas vezes por polímeros

naturais e sintéticos nas aplicações de biotinas. Dessa forma, o presente trabalho, visou principalmente a realização de etapas cruciais que envolvem preparação do hidrogel a base de alginato para impressão 3D, bem como a realização da purificação envolvendo testes de caracterização por FTIR e MEV-EDS, exaltando em uma purificação realizada com êxito

1. Introdução

Algas marrons multicelulares, essenciais para o ecossistema marinho, são conhecidas por serem biologicamente diversas com milhões de espécies, formando uma vegetação dominante no interdital e subtidal zona de costão rochoso (Bartsch et al., 2008). As algas têm grande capacidade como fonte de novos componentes funcionais que podem não estar presentes nas plantas terrestres. Mais recentemente, os ingredientes valiosos extraídos de algas marrons, como o alginato, *fucoïdan* e *laminaran*, tem sido amplamente explorado para o desenvolvimento de nutrientes e medicamentos. (Ford et al., 2020; Garcia-Vaquero et al., 2018; Generali´cMekinic et al., 2019; Gunathilaka et al., 2020; Saraswati et al., 2019; Thanh et al., 2013; Zou et al., 2019). O alginato, material de interesse deste estudo, consiste em resíduos de ácido hexurônico ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G) com exclusivamente 1 \rightarrow 4 ligações glicosídicas, como visto na Figura 1. Sua quelação, gelificação e propriedades hidrofílicas levaram à sua ampla aplicação nas indústrias alimentícia, cosméticas e biomédicas (Donati & Paoletti, 2009; Lee & Mooney, 2012). Em aplicações biológicas, o alginato pode ser utilizado como material precursor para o desenvolvimento de estruturas de suporte para o crescimento celular, cujo sua mecânica rígida e flexível é controlada principalmente pela concentração de teores de ácido gulurônico. Dessa forma, altas proporções de ácido gulurônico promovem um aumento em sua gelificação; já teores menores garantem uma textura mais flexível (Hee,Sook,&Kim, 2011).

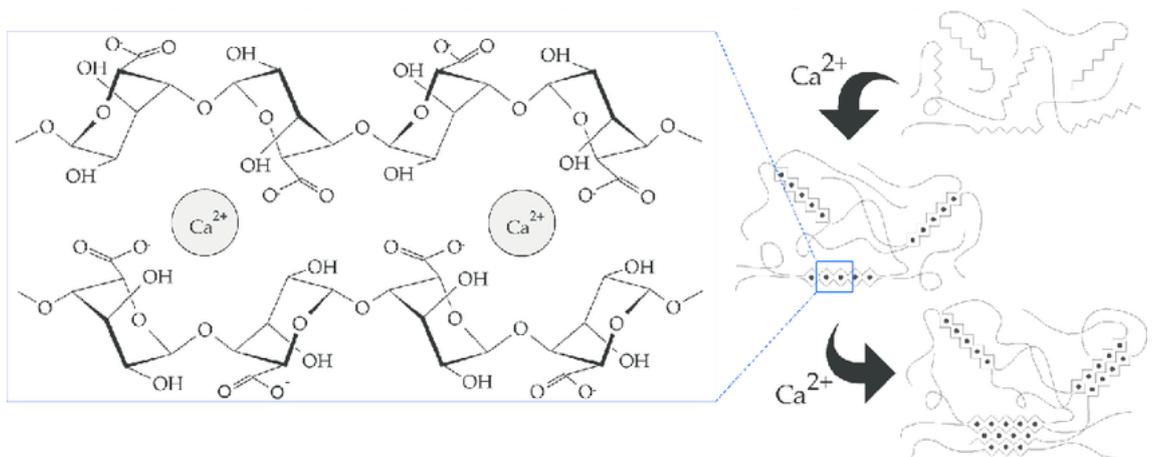
Figura 1: estruturas químicas dos monômero de alginato (superior) e polímero (inferior) mostrando diferentes blocos dependentes da sequência de monômeros



Fonte: (Ayarze, 2017).

Comercialmente vendido, o alginato é comumente utilizado na indústria alimentícia e em aplicações biotecnológicas. Um dos fatores que explicam sua atratividade e múltiplas aplicações está relacionada a sua gelificação induzida, sendo uma das propriedades funcionais mais importantes. O mecanismo de gelificação é conhecido como um modelo de “eggbox”, como visto na Figura 2. Geralmente, a gelificação ocorre por indução iônica mediado pelo Ca^{2+} . O alginato também pode formar géis através da gelificação induzida por outros íons como Ba^{2+} , Cu^{2+} , Sr^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , etc.

Figura 2: Alginato reticulado com íons de cálcio, gerando o modelo egg-Box.



Fonte: (DA SILVA 2017)

Os hidrogéis de alginato são capazes de serem degradados pela substituição de cátions bivalentes (cálcio, zinco, etc) por cátions monovalentes (por exemplo, sódio). Uma vantagem que o alginato apresenta na bioimpressão é sua facilidade de reticular e gelificar. No entanto, uma consideração importante que pode ser tomada como uma desvantagem é que o conteúdo de cálcio necessário é muito elevado, o que na aplicação biomédica pode levar a hipercalcemia durante sua exposição em um ambiente fisiológico.

Diante dessas informações, o presente trabalho visou caracterizar as etapas primárias da preparação do hidrogel à base de alginato para impressão 3D, bem como a realização da purificação envolvendo testes de caracterização por FTIR e MEV-EDS, exaltando em uma purificação realizada com êxito

2. Materias e métodos

O alginato de Sódio, (AS), foi adquirido pela Dinâmica Química Contemporânea (São Paulo, Brasil) com um peso molecular de 112,498 g/mol. Enquanto os íons bivalentes usados na reticulação do alginato, como o cloreto de cálcio (CaCl_2) (Sigma – Aldrich, Missouri, EUA), Cloreto de zinco (ZnCl_2) e o cloreto de cobalto (CoCl_2) foram ambos obtidos a partir da indústria dinâmica (São Paulo, Brasil). Para a realização da purificação do alginato, foram utilizados água deionizada, ácido clorídrico concentrado (HCl), solução de ácido clorídrico (0,1M) e uma membrana de diálise. Destarte, inicia se o preparo do alginato a 4% m/v, enquanto os agentes reticulantes foram pesados e adicionados a 4,5% m/m. As soluções de alginato de sódio foram preparadas com água deionizada, usando um misturador por proximamente 20 minutos em temperatura ambiente (25 °C). Em seguida, soluções de reticulantes foram adicionados (4,5 m/m) à solução de alginato e homogeneizados por mais 10 min.

2.1. Purificação do alginato

1. Para a purificação do AS, foi colocada em um béquer de 1000 mL, um volume de 500 mL de água deionizada aquecida (50 °C). Em seguida, foi solubilizado 4g de AS na água deionizada aquecida e deixada em descanso. Por fim, foi realizada a filtração da solução, para posterior precipitação do ácido algínico.

2. Precipitação ácida do ácido algínico: o filtrado obtido anteriormente foi colocado sob agitação em seguida, ácido clorídrico concentrado foi adicionado lentamente até um valor de pH próximo de 3,0. Feito isso, uma solução de ácido clorídrico de 0,1 M foi inserida gota a gota até o pH 1,5. Por fim, o sistema foi deixado em descanso para a precipitação do ácido algínico.
3. Diálise e liofilização: o ácido algínico precipitado foi submetido a um processo de diálise (onde foram utilizadas membranas de látex, com tamanho de poro de 100 Å). Depois, a amostra foi congelada e liofilizada.

2.2. Determinação da massa molar pelo viscosímetro Ubbelohde.

A definição da massa molar foi determinada por um viscosímetro capilar. Dessa forma, a solução de alginato foi preparada a partir de sua diluição em água deionizada e medida usando um viscosímetro de Ubbelohde a uma temperatura de 25°C. Foram medidos os tempos de escoamento das soluções nos padrões de diluição: 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1 g/ml. Os valores médios aritméticos quintuplicadas dos tempos de fluxo para cada solução foram anotados para calcular os valores de viscosidade, e a massa molar foi obtida a partir da equação de Mark-Houwink (Equação 1):

$$[\eta] = K \cdot M^\alpha \quad (1)$$

Onde, $[\eta]$ representa a viscosidade intrínseca, K e α constantes, e M corresponde a média da massa molar. A viscosidade intrínseca foi calculada por extrapolação dupla para a concentração zero usando Huggins e a equação de Kraemer utilizando a ferramenta OriginPro, enquanto a correlação de Mark-Howink-Sakurada (Vagner, 1985), onde foram utilizados a viscosidade intrínseca, $K = 7,3 \times 10^{-3} \text{ g.ml}^{-1}$ e $\alpha = 0,92$ para o alginato e

2.3 Análise de Detector de Energia Dispersiva- EDS

Para a comprovação da purificação do alginato de sódio, foram congeladas soluções de alginato (4% m/v) e soluções de alginato purificado em nitrogênio líquido e

levadas ao processo de liofilização por cerca de 24 horas. Posteriormente, as amostras foram cortadas em frações menores e colocadas individualmente em *stubs* de alumínio (12,7mm) com uma fita adesiva condutora de carbono. As amostras para serem analisadas foram revestidas com uma camada de ouro de 20 nm usando o *sputtering* por 30 segundos.

2.4 Caracterização por FTIR

A identificação dos grupos funcionais localizadas nas amostras foram obtidas pela análise de Espectroscopia no infravermelho de transformada Fourier (FTIR), sendo análise feita no modo de reflexão total atenuada (ATR-FTIR) no equipamento PerkinElmer FTIR- ATR spectrum 100, equipado com um cristal de diamante. As varreduras do FTIR cobriram dados de 4000 - 550 cm^{-1} e 16 varreduras possíveis tendo uma resolução de 4 cm^{-1} .

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação da massa molar pela viscosimetria capilar

A tabela 1 mostra que os valores aritméticos quintuplicados avaliados pelo viscosímetro de ubbelohde que serviram de base para o cálculo visto na equação 1 massa molar do alginato, calculada de acordo com a Equação 1, foi encontrada no valor 112,489 g/mol, um valor aceitável visto que na literatura o mesmo varia de 80 a 100 mil g/mol (REF).

Tabela 1: resultados quintuplicados obtidos a partir da viscosimetria de ubblehode

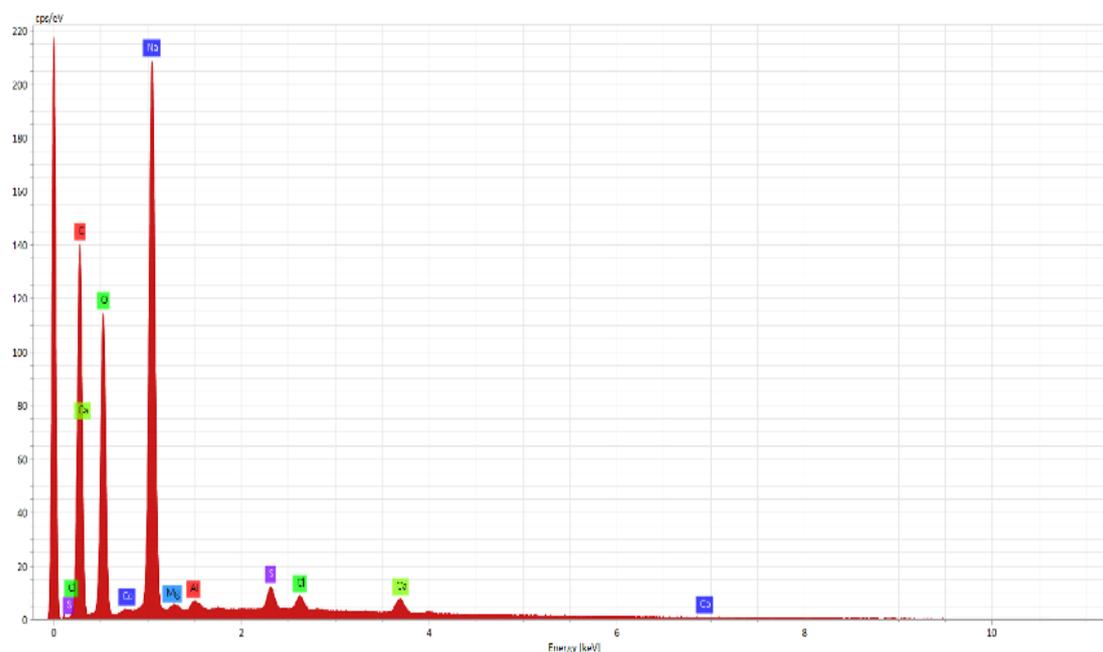
Medidas de tempo (s)	Água	Solução 0,2 g/mL	Solução 0,4 g/mL	Solução 0,6 g/mL	Solução 0,8 g/mL	Solução 1,0 g/mL
1	30,01	121,800	241,2	363,06	600,36	901,200
2	31,042	121,74	241,44	362,88	600,18	901,14
3	30,039	121,86	241,56	362,82	600,06	901,98
4	30,027	121,92	241,86	363,06	600,72	901,98
5	30,031	121,86	241,86	363,12	600,06	902,28
Média do tempo	30,031	121,860	241,560	363,060	600,180	901,980

Desvio padrão	0,4542	0,068410526	0,283337255	0,1300769	0,276911538	0,513692515
n rel	4,057806933	8,043688189	12,08950751	19,98534847	30,03496387	
n esp	3,057806933	7,043688189	11,08950751	18,98534847	29,03496387	
n red	1528,903466	1760,922047	1848,251251	2373,168559	2903,496387	
n inerente	700,3213317	521,221927	415,3896547	374,3749286	340,2362165	

3.2 Análise de Detector de energia dispersiva - EDS.

Na análise do MEV-EDS, mostrado na Figura 3, observa-se o espectro de EDS da amostra de alginato de sódio em pó antes do processo de purificação. A porcentagem atômica do sódio se encontra em aproximadamente 11,82 %, como pode ser verificado na Tabela 1.

Figura 3: Espectro de EDS da amostra de alginato anterior ao processo de purificação.

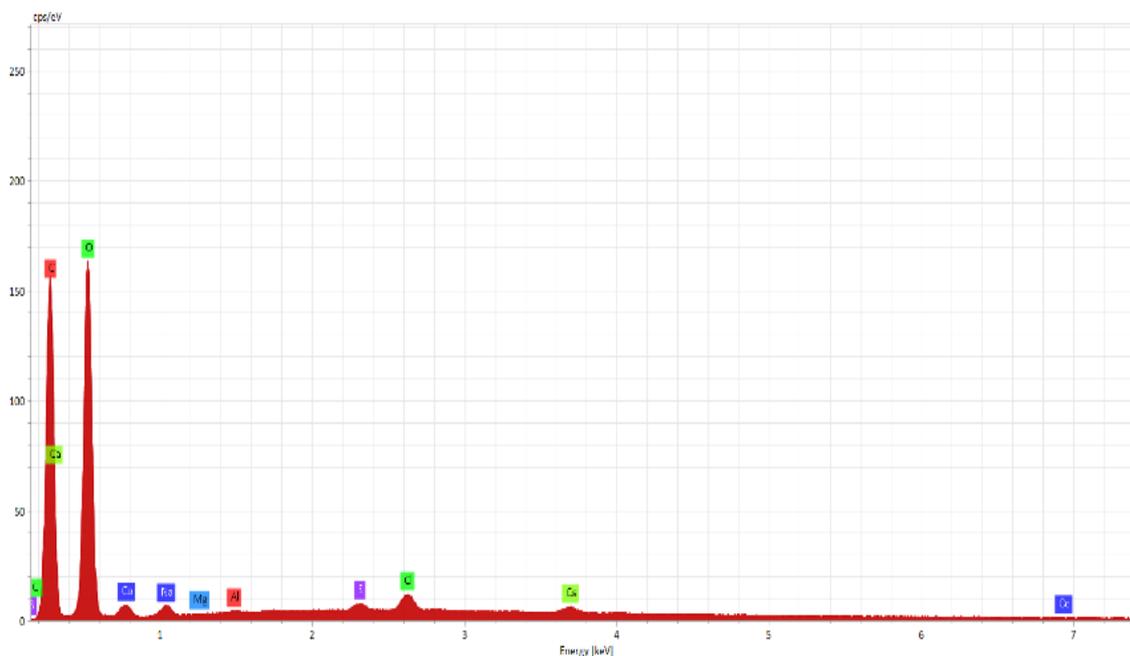


Fonte: Autor.

Já na Figura 2, observa-se o espectro de EDS do alginato de sódio após o processo de purificação, onde notou-se que a porcentagem de sódio reduziu aproximadamente 11,56

% (porcentagem atômica = 0,56% de acordo com a Tabela 2), indicando que a purificação foi realizada com êxito.

Figura 4: Espectro de EDS do alginato de sódio após o processo de purificação.



Fonte: Autor.

Tabela 2: Espectro de EDS do alginato de sódio antes da purificação

Espectro de Energia Dispersiva	
Elementos	Concentração Atômica (%)
Carbono	53,53
Oxigênio	33,76
Sódio	11,82
Enxofre	0,36
Cálcio	0,30
Cloreto	0,23
Alumínio	0,0

Fonte: Autor.

Tabela 3: Espectro de EDS do alginato de sódio depois da purificação

Espectro de Energia Dispersiva	
Elementos	Concentração Atômica (%)
Carbono	49,30
Oxigênio	49,72
Sódio	0,56
Enxofre	0,23
Cálcio	0,09
sulfeto	0,09
Cobalto	0,0

Fonte: Autor.

3.3 – Caracterização por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os resultados do espectro de FTIR mostram tipicamente a larga banda de absorção na faixa de 3600-3000 cm^{-1} devido a vibração de alongamento do grupo OH e também as bandas de vibração CH em 2930- 2845 cm^{-1} . É possível identificar também o alongamento entre C-H nos espectros de 2963 e 2932 cm^{-1} denotando o anel pirenóide, como também o alongamento simétrico e assimétrico do grupo COO nos espectros de 1611 cm^{-1} , tendo esse fenômeno explicado pela vibração do grupo carboxilado que muda conforme a presença do cátion e da combinação de ambos. Também foi observado, que nos espectros de 1338 e 1298 cm^{-1} foram identificados alongamentos do grupo C-O e também nos grupos C-O-C nos espectros de 1094 cm^{-1} . Por fim, tratando se da purificação do alginato, é possível ver que nos espectros de 781 a 750 cm^{-1} há uma baixa vibração entre os grupos de C-O atribuído a uma rotação interna, e a flexão dos grupos C-C-O e C-C-H, todavia, ainda é preciso salientar que ainda são parâmetros muito imprecisos para ser possível determinar se a sua purificação foi feita com exatidão, visto que não foi encontrado na literatura os espectros de interesse, como mostrado na Figura 5.

Figura 5: espectros de FTIR das amostras de alginato em pó (comercial) e alginato purificado

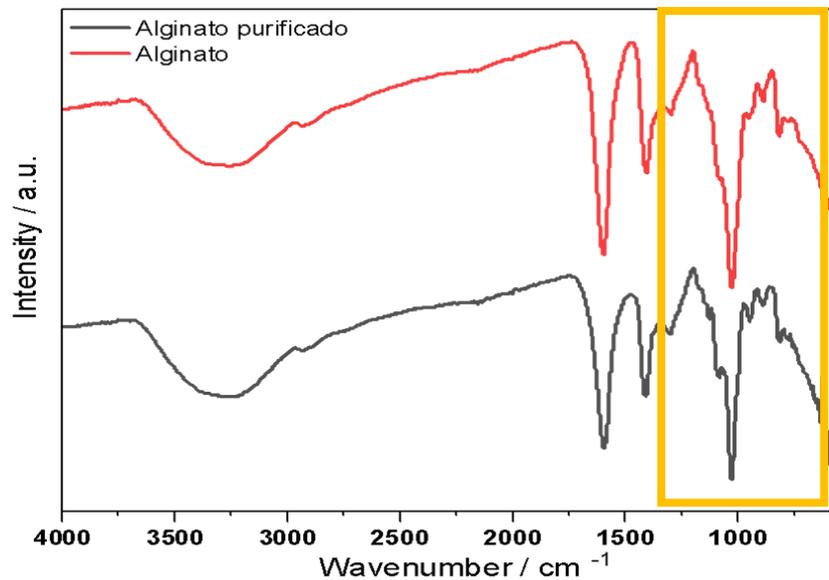
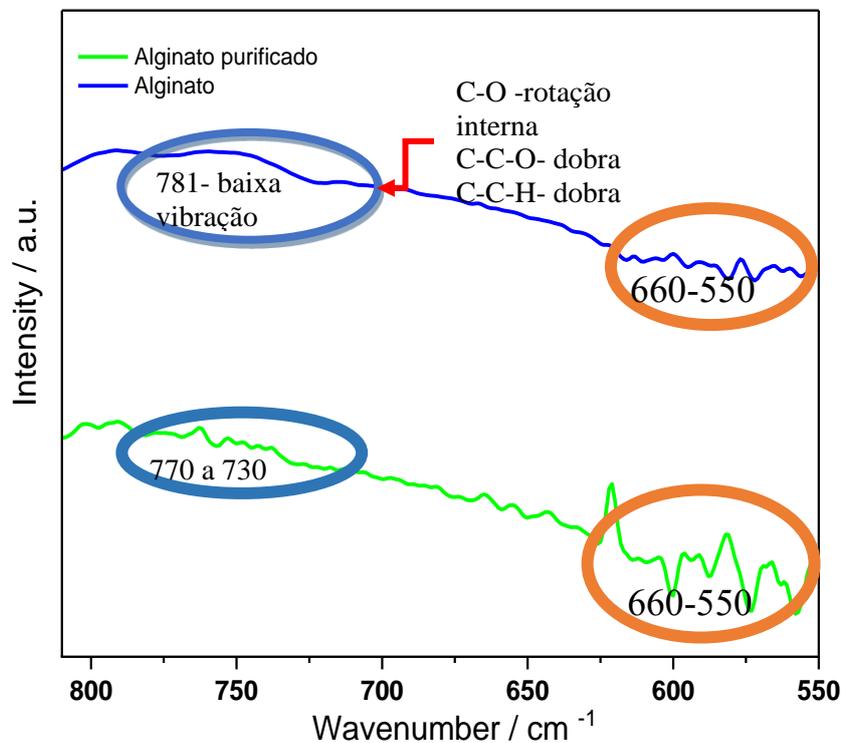


Figura 6: espectros de FTIR das amostras de alginato em pó (comercial) e purificado detalhados.



4. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio do estudo da composição e estrutura química do alginato e seus derivados obtidos pela análise de FTIR e principalmente pela análise de MEV-EDS, as amostras de alginato liofilizadas demonstraram fornecer informações detalhadas sobre a estrutura, heterogeneidade e arranjo de suas cadeias poliméricas após o processo de purificação. De acordo com os resultados, pode-se concluir que o processo de purificação utilizado, assim como a metodologia escolhida foi adequada para a redução da concentração de sódio na estrutura polimérica, sendo um importante processo para garantir a qualidade e a consistência do material, especialmente quando é utilizado em aplicações críticas como na indústria alimentícia, farmacêutica ou biomédica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYARZA, Jorge; COELLO, Yves; NAKAMATSU, Javier. SEM–EDS study of ionically cross-linked alginate and alginate acid bead formation. **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**, v. 22, n. 1, p. 1-10, 2017.

COSTA, Maria J. et al. Physicochemical properties of alginate-based films: Effect of ionic crosslinking and mannuronic and guluronic acid ratio. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 442-448, 2018.

DA SILVA, Thiago Lopes et al. Alginate and sericin: environmental and pharmaceutical applications. **Biological activities and application of marine polysaccharides**, p. 57-86, 2017.

GUPTA, R. et al. Recent advances in gastroretentive drug delivery systems and its application on treatment of H. Pylori infections. **Journal of Analytical & Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 4, p. 404-410, 2018.

HU, Chuhuan et al. Ions-induced gelation of alginate: Mechanisms and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 177, p. 578-588, 2021.

KIM, HeeSook; LEE, Choul-Gyun; LEE, EunYeol. Alginate lyase: Structure, property, and application. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 16, p. 843-851, 2011.

LEAL, David et al. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 2, p. 308-316, 2008.

LIU, Yakui et al. Alginate/Gelatin-Based Hydrogel with Soy Protein/Peptide Powder for 3D Printing Tissue-Engineering Scaffolds to Promote Angiogenesis. **Macromolecular Bioscience**, v. 22, n. 4, p. 2100413, 2022.

MONTERO, Félix E. et al. Development of a smart bioink for bioprinting applications. **Frontiers in Mechanical Engineering**, v. 5, p. 56, 2019.

MORGAN, Francis LC; MORONI, Lorenzo; BAKER, Matthew B. Dynamic bioink to advance bioprinting. **Advanced Healthcare Materials**, v. 9, n. 15, p. 1901798, 2020.

PAHLEVANZADEH, Farnoosh et al. Recent trends in three-dimensional bioinks based on alginate for biomedical applications. **Materials**, v. 13, n. 18, p. 3980, 2020.

PIRAS, Carmen C.; SMITH, David K. Multicomponent polysaccharide alginate-based bioinks. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 8, n. 36, p. 8171-8188, 2020.

SARTORI, Celine et al. Determination of the cation content of alginate thin films by FTIR spectroscopy. **Polymer**, v. 38, n. 1, p. 43-51, 1997.

WANG, Mingpeng; CHEN, Lei; ZHANG, Zhaojie.
Potential applications of alginate oligosaccharides for
biomedicine—A mini
review. **Carbohydrate Polymers**, v. 271, p. 118408, 2021.