



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



TESE DE DOUTORADO

**HÍBRIDOS DE NEROLIDOL OU DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA
COM BENTONITA COMO AGENTES ANTIBACTERIANOS E
HÍBRIDOS DE MONTMORILLONITAS/RNA**

Luís Humberto de Oliveira



João Pessoa - Brasil

Dezembro/2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



TESE DE DOUTORADO

Híbridos de nerolidol ou digluconato de clorexidina com bentonita como agentes antibacterianos e híbridos de montmorillonitas/RNA

Luís Humberto de Oliveira*

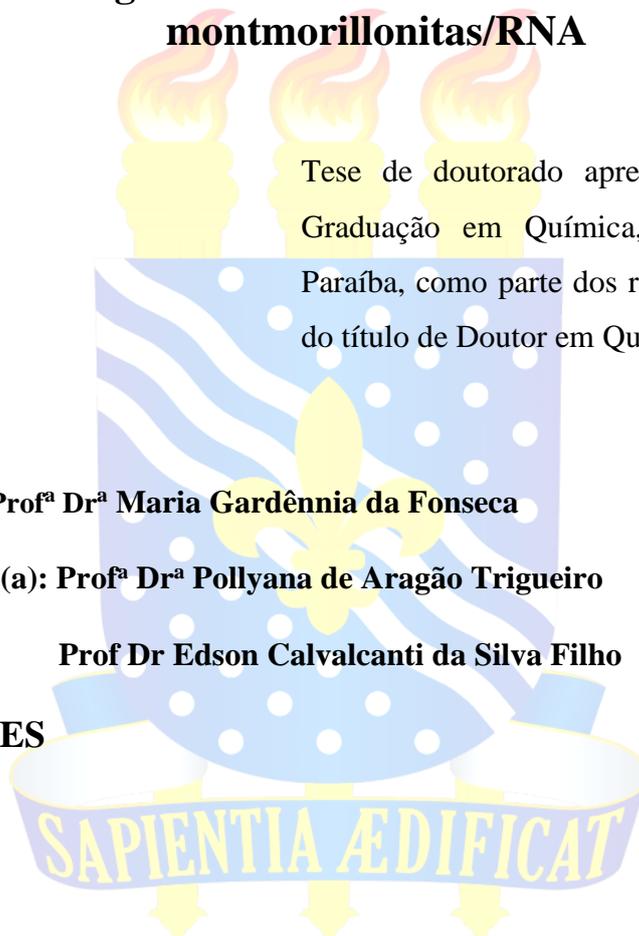
Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador (a): Prof^ª Dr^ª Maria Gardênia da Fonseca

Co-orientadores (a): Prof^ª Dr^ª Pollyana de Aragão Trigueiro

Prof Dr Edson Calvalcanti da Silva Filho

*Bolsista CAPES



João Pessoa - Brasil

Dezembro/2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

O48h Oliveira, Luís Humberto de.

Híbridos de nerolidol ou digluconato de clorexidina com bentonita como agentes antibacterianos e híbridos de montmorillonitas/RNA / Luís Humberto de Oliveira. - João Pessoa, 2021.

128 f. : il.

Orientação: Maria Gardênnia da Fonseca, Edson Cavalcanti da Silva Filho.

Coorientação: Pollyana de Aragão Trigueiro.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN.

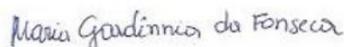
1. Argila - Bentonita. 2. Argilominerais. 3. Híbrido de intercalação. 4. Biomoléculas. 5. Óleos essenciais - Ação antibacteriana. 6. Adsorção. I. Fonseca, Maria Gardênnia da. II. Filho, Edson Cavalcanti da Silva. III. Trigueiro, Pollyana de Aragão. IV. Título.

UFPB/BC

CDU 553.611(043)

Híbridos de nerolidol ou digluconato de clorexidina com bentonita como agentes antibacterianos e híbridos de montmorillonitas/RNA.

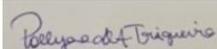
Tese de Doutorado apresentada pelo aluno Luís Humberto de Oliveira e aprovada pela banca examinadora em 13 de dezembro de 2021.



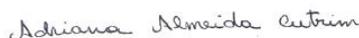
Profa. Dra. Maria Gardênnia da Fonseca
UFPB – JPA-PB
Orientadora/Presidente



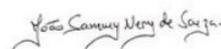
Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho
2º. Orientador



Profa. Dra. Pollyana de Aragão Trigueiro
UFMA – São Luís-MA
Co-Orientadora



Profa. Dra. Adriana Almeida Cutrim
UFCG – Campina Grande-PB
Examinadora



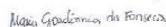
Prof. Dr. João Sammy Nery Souza
UFPI – Teresina - PI
Examinador


Prof. Dr. Júlio Santos Rebouças
UFPB – JPA-PB
Examinador



Prof. Dra. Iêda Maria Garcia dos Santos
UFPB – JPA-PB
Examinadora

Assinaturas da Banca realizadas em modo Webconferência em 13/12/2021, digitalizadas e certificadas pela Profa. Dra. Maria Gardênnia da Fonseca (SIAPE 1353946 em 13/12/2021).



” Na vida, não existe nada a se temer, apenas a ser compreendido.”

(Marie Curie)

Dedico esse trabalho às pessoas essenciais que dão direção à minha vida: meus pais, Erasmo e Severina, minha esposa Raquel e meus filhos Arthur e Bárbara.

AGRADECIMENTOS

- ✓ A Deus, presença maravilhosa e muito forte que me norteia em todos os momentos da minha vida;
- ✓ A meu Pai Erasmo, minha mãe Severina, meus irmãos Marcos Paulo e Rafaela que sempre caminharam comigo, me apoiando de todas as formas;
- ✓ A minha esposa Raquel, por seu amor, carinho, atenção e paciência dedicados a mim, além de ser minha fiel confidente e meu “pilar” de sustentação durante toda a trajetória do doutorado. Muito obrigado meu amor. Essa vitória é nossa!
- ✓ A meus filhos Arthur e Bárbara que me enchem de orgulho e alegria a cada dia. Filhos é por vocês que enfrento todos os obstáculos;
- ✓ A minha orientadora, a quem eu tenho imensa admiração e respeito, professora Dr^a Maria Gardênnia da Fonseca pela valiosa orientação. Sou muito grato pela generosidade em me acolher em seu grupo de pesquisa desde o mestrado (sem ao menos me conhecer), me proporcionando um imenso crescimento profissional;
- ✓ A minha coorientadora, professora Dr^a Pollyana de Aragão Trigueiro, por toda valiosa orientação, atenção, paciência e amizade proporcionada;
- ✓ Ao professor Dr Edson Cavalcanti da Silva Filho, juntamente com a professora Dr^a Josy Osajima que me receberam com tanta atenção em seu laboratório (Laboratório de Ecobiomaterias) na UFPI, sempre demonstrando disponibilidade para ajudar;
- ✓ Aos órgãos de fomento Capes e CNPq pelo incentivo financeiro;
- ✓ A professora Dr^a. Ieda Maria Garcia dos Santos e ao professor Dr Jose Geraldo de Paiva Espínola pelas valiosas contribuições dadas durante o exame de qualificação deste trabalho;
- ✓ Aos amigos de orientação, Adriana, Alice, Cleibson, Denise, Deoclécio, Gilmário, Graycy, Leandro, Líbia, Mariana, Nadja, Rafael, Saloana e Wanderson, por toda a ajuda e compartilhamento de conhecimentos;
- ✓ Aos amigos do LACOM, Laís, Luzia, Débora, Juliana, Nayara, Marcela, Ana Zélia, Suelen, Arnayra, Jaqueline, Ana Rita, Alex e Thiago por todo o companheirismo. Agradeço especialmente a Laís pelas várias análises de DRX realizadas e por toda paciência e disposição para ajudar e a Ana Rita e Alex pelas análises de FTIR;
- ✓ Aos amigos do laboratório de Ecobiomateriais por toda ajuda e atenção;

- ✓ Aos professores do LACOM, em especial a professora Dr^a. Ieda Maria Garcia dos Santos e ao professor Dr Ary da Silva Maia, pela disponibilidade e ajuda nas horas das dúvidas;
- ✓ A professora Dr^a Maguy Jaber da Université Pierre et Marie Curie, pela realização das análises de RMN de ¹³C, ³¹P e ²⁷Al e Difratometria de Raios-X em baixo ângulo;
- ✓ Aos professores Adriana Almeida Cutrim, Ieda Maria Garcia Dos Santos, João Sammy Nery Souza e Júlio Santos Rebouças pela gentileza de aceitarem participar como membros da banca;
- ✓ Aos funcionários do PPGQ/UFPB e amigos, Marcos Pequeno, Fernando e Josilda (Dona Jô) pela dedicação;
- ✓ Enfim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

Sumário

Lista de figuras.....	xiii
Lista de tabelas.....	xvi
Lista de siglas.....	xvii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xx
PREFÁCIO	xxi
Capítulo 1	22
1.0 Introdução	23
1.1 Objetivos.....	24
1.1.1 Geral	24
1.1.2 Específicos.....	24
Capítulo 2	26
2.1 Montmorillonita (Mt).....	27
2.1.1 Estrutura e propriedades	27
2.2 Interações e modificações de argilominerais com RNA e moléculas com atividade antimicrobiana	28
2.2.1 Interação com ácido ribonucleico (RNA).....	29
2.2.2 Incorporação de óleos essenciais em Mt	33
2.2.3 Incorporação de clorexidina em Mt.....	44
Capítulo 3	49
3.1 Introdução	50
3.2 Parte experimental	51
3.2.1 Reagentes químicos	51
3.2.2 Mt sódica	51
3.2.3 Troca iônica	51

3.2.4 Adsorção do derivado do RNA em Mt.....	52
3.3 Técnicas de caracterização.....	53
3.3.1 Difração de raios-X (DRX)	53
3.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	53
3.3.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	53
3.3.5 Análise termogravimétrica (TG/DTG)	53
3.3.6 Ressonância magnética nuclear de ^{27}Al , ^{13}C e ^{31}P no estado sólido.....	54
3.4 Resultados e Discussão	54
3.4.1 Difração de raios X (DRX).....	54
3.4.2 Espectroscopia de absorção na região de infravermelho (IV).....	57
3.4.3 Ressonância magnética nuclear no estado sólido de ^{27}Al , ^{13}C e ^{31}P	60
3.4.4 Análise termogravimétrica (TG/DTG)	64
3.4.5 Proposta do mecanismo de interação RNA/Mt	67
3.5 Conclusões	68
Capítulo 4	69
4.1 Introdução	70
4.2 Parte experimental	71
4.2.1 Reagentes químicos	71
4.2.2 Amostra de bentonita.....	72
4.2.3 Organofuncionalização da bentonita	72
4.2.4 Obtenção do híbrido Nerolidol/Argila.....	72
4.3 Técnicas de caracterização.....	73
4.3.1 Difração de raios X (DRX).....	73
4.3.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	73
4.3.3 Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN).....	73
4.4 Atividade antibacteriana	73

4.4.1 Preparação do inóculo	73
4.4.2 Ensaio de contato direto	74
4.5 Resultados e Discussão	74
4.5.1 Difração de raios X (DRX).....	74
4.5.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	78
4.5.3 Análise elementar CHN.....	79
4.5.4 Atividade antibacteriana	81
4.6 Conclusões	83
Capítulo 5	84
5.1 Introdução	85
5.2 Parte experimental	86
5.2.1 Reagentes químicos	86
5.2.2 Bentonita sódica	86
5.2.3 Síntese do híbrido Clorexidina/Argila.....	86
5.3 Técnicas de caracterização.....	88
5.3.1 Difração de raios X (DRX).....	88
5.3.2 Medidas de potencial Zeta.....	88
5.3.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	88
5.4 Atividade antibacteriana	88
5.5 Resultados e Discussão	88
5.5.1 Difração de raios X (DRX).....	88
5.5.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	91
5.5.3 Proposta de mecanismos de interação entre clorexidina e bentonita.....	92
5.5.4 Atividade antibacteriana	93
5.6 Conclusões	97
Capítulo 6	98
6.1 Considerações finais	99

6.2 Perspectivas	99
Capítulo 7	101
7 Referências Bibliográficas	102
APÊNDICE A.....	129

Lista de figuras

Figura 2-1: Representação da estrutura planar de um filossilicato 2:1, mostrando cátions trocáveis e água interlamelar. As esferas em vermelho (átomos de oxigênio), cinza (átomos de silício) e amarelo (átomos de alumínio) (Figura gerada com o programa VESTA 3–Gratuito (MOMMA; IZUMI, 2011)).	27
Figura 2-2: (A) As bases purinas e pirimidinas encontradas no RNA. (B) Exemplo de uma unidade de nucleotídeo do RNA. A base nitrogenada, ribose e o grupo fosfato são marcados por parênteses azul, verde e vermelho, respectivamente. As designações comumente usadas (nomes) dos átomos individuais são escritas em cinza. (C) Representação esquemática mostrando a sequência de RNA 5'-ACGU-3'. Os grupos fosfatos, riboses e bases são traçados em vermelho, verde e azul, respectivamente.	30
Figura 2-3: Influência do cátion interlamelar na adsorção de RNA em argilomineral.	32
Figura 2-4: Isopreno e exemplos de terpenos que constituem os OEs.	34
Figura 2-5: Propostas de possíveis sítios (e tipos de interação) em Mt com moléculas de óleos essenciais. (Figura gerada com o programa VESTA 3–Gratuito (MOMMA; IZUMI, 2011)).	36
Figura 2-6: Modificação da superfície externa e espaço interlamelar da Mt com surfactantes para adsorção de óleos essenciais.	38
Figura 2-7: Tipos de compósitos derivados da interação polímero/Mt que podem aumentar a difusão de óleos essenciais: a) Nanocompósito intercalado e b) Nanocompósito exfoliado.	40
Figura 2-8: Estrutura da clorexidina.	45
Figura 2-9: Mecanismo de interação entre clorexidina e Mt (troca iônica).	47
Figura 3-1: Esquema de reação de adsorção do RNA em Mt e obtenção do híbrido RNA/Mt.	52
Figura 3-2: Difrátogramas de raios X das Mts mono iônicas (i) e imagens de microscopia eletrônica de varredura da Na-Mt.	55
Figura 3-3: Difrátogramas de raios X dos híbridos RNA@cátions-Mt obtidos em (i) pH 6,2-6,5 e em (ii) pH 2,9-3,1.	57
Figura 3-4: Espectros na região do infravermelho para (i) Mts Na-Mt, Ca-Mt, Mg-Mt e Sr-Mt, e híbridos RNA@cátions-Mt obtidos a (ii) pH 6,2-6,5 e (iii) pH 2,9-3,1.	58
Figura 3-5: Espectros de RMN de ²⁷ Al para (i) Mts de partida e (ii) híbridos RNA@cátions-Mt obtidos em pH 2,9-3,1.	60
Figura 3-6: Espectros de RMN de ³¹ P do RNA (i) e híbridos RNA@Na-Mt (ii), RNA@Ca-Mt (iii), RNA@Mg-Mt (iv) e RNA@Sr-Mt (v) em pH 2,9-3,1.	62

Figura 3-7: Espectros de RMN de ^{13}C do RNA e híbridos RNA@Mt obtidos em pH 2,9-3,1. Para uma melhor compreensão, o símbolo C' representa o carbono presente no grupo ribose e U ₅ , por exemplo, representa o carbono 5 na base nitrogenada uracila.	63
Figura 3-8: Nucleotídeos constituintes do RNA apresentados de forma isolada, com os respectivos átomos numerados. Em vermelho os átomos de carbono e em azul os átomos de nitrogênio.....	64
Figura 3-9: Curvas termogravimétricas - TG (i) para Na-Mt, Ca-Mt, Mg-Mt e Sr-Mt, e (ii) para os híbridos em pH 2,9-3,1, RNA@Na-Mt, RNA@Ca-Mt, RNA@Mg-Mt e RNA@Sr-Mt, e DTG (iii) para Na-Mt, Ca-Mt, Mg-Mt e Sr-Mt e (iv) para os híbridos em pH 2,9-3,1, RNA@Na-Mt, RNA@Ca-Mt, RNA@Mg-Mt e RNA@Sr-Mt,.....	65
Figura 3-10: Tipos de interação na intercalação de RNA em Mt em pH 2,9-3,1.....	67
Figura 4-1: Resumo ilustrativo da formação dos híbridos Nerolidol/Argila.....	73
Figura 4-2: Difratoogramas de raios X para (i): (a) Na-Bent, (b) etanol/Bent e híbridos nerolidol/Na-Bent em (c) NE5/Na-Bent, (d) NE10/Na-Bent, (e) NE20/Na-Bent, (f) NE30/Na-Bent, (g) NE40/Na-Bent e (h) NE50/Na-Bent; (ii) (a) CTAB-Bent, (b) etanol/CTAB-Bent e híbridos nerolidol/CTAB-Bent em (c) NE5/CTAB-Bent, (d) NE10/CTAB-Bent, (e) NE 20/CTAB-Bent, (f) NE30/CTAB-Bent, (g) NE40/CTAB-Bent e (h) NE50/CTAB-Bent.	75
Figura 4-3: Representação das dimensões da molécula de nerolidol (as esfera pretas, brancas e vermelha representam o átomo de carbono, hidrogênio e oxigênio) (a), e do esquema de intercalação do nerolidol na Na-Bent (b).	76
Figura 4-4: Proposta do arranjo da molécula de CTAB na região interlamelar da bentonita. .	77
Figura 4-5:Espectros de infravermelho para (i): (a) Nerolidol, (b) Na-Bent, (c) etanol/Bent e híbridos nerolidol/Na-Bent em (d) NE5/Na-Bent, (e) NE10/Na-Bent, (f) NE20/Na-Bent, (g) NE30/Na-Bent, (h) NE40/Na-Bent e (i) NE50/Na-Bent; (ii) (a) Nerolidol, (b) CTAB-Bent, (c) etanol/CTAB-Bent e híbridos nerolidol/CTAB-Bent em (d) NE5/CTAB-Bent, (e) NE10/CTAB-Bent, (f) NE20/CTAB-Bent, (g) NE30/CTAB-Bent, (h) NE40/CTAB-Bent e (i) NE50/CTAB-Bent.	79
Figura 4-6: Ação inibitória dos híbridos Nerolidol/Na-Bent e Nerolidol/CTAB-Bent Contra E. coli e S. aureus.....	82
Figura 5-1: Esquema ilustrativo da incorporação de digluconato de clorexidina em argila bentonita.	87
Figura 5-2:Espectro de absorção molecular da clorexidina.....	87
Figura 5-3: Difratoogramas de raios X para (a) Na-Bent e híbridos clorexidina/Bent em (b) Clo0,1/Bent, (c) Clo0,3/Bent, (d) Clo0,5/Bent, (e) Clo0,7/Bent e (f) Clo1/Bent.....	89

Figura 5-4: (i) Diagrama de espécies da clorexidina; (ii) clorexidina (1) neutra, (2) diprotonada (3) tetraprotonada; e (iii) potencial zeta da argila bentonita.....	90
Figura 5-5: Espectros de infravermelho para (a) Na-Bent e híbridos clorexidina/Bent em (b) Clo0,1/Bent, (c) Clo0,3/Bent, (d) Clo0,5/Bent, (e) Clo0,7/Bent e (f) Clo1/Bent.....	92
Figura 5-6: Proposta de mecanismos de interação entre a clorexidina e a argila bentonita.	93
Figura 5-7: Imagens das placas de Petri mostrando as colônias de <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) formadas após o contato direto bacteriano, com (a) controle e amostras (b) Na-Bent, (c) Clo0,1/Bent, (d) Clo0,3/Bent, (e) Clo0,5/Bent, (f) Clo0,7/Bent e (g) Clo1/Bent.	94
Figura 5-8: Imagens das placas de Petri mostrando as colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>) formadas após o contato direto bacteriano, com (a) controle e amostras (b) Na-Bent, (c) Clo0,1/Bent, (d) Clo0,3/Bent, (e) Clo0,5/Bent, (f) Clo0,7/Bent e (g) Clo1/Bent.	95
Figura 5-9: Potencial inibitório das amostras (a) Na-Bent e seus híbridos com clorexidina (b) Clo0,1/Bent, (c) Clo0,3/Bent, (d) Clo0,5/Bent, (e) Clo0,7/Bent e (f) Clo1/Bent, contra (i) <i>E. coli</i> e (ii) <i>S. aureus</i>	96
Figura 5-10: Ação antibacteriana dos híbridos clorexidina/Bentonita.	97

Lista de tabelas

Tabela 2-1: Máxima quantidade de óleo essencial incorporado/adsorvido e tipos de interação em Mt em sua forma natural e modificada.	37
Tabela 2-2: Sistemas contendo OEs/Mt e suas aplicações.	41
Tabela 2-3: Híbridos Clorexidina/Mt e suas aplicações.	46
Tabela 3-1: Fórmulas moleculares e dados de pureza dos reagentes químicos utilizados.	51
Tabela 3-2 Deslocamentos químicos dos espectros de RMN de ^{13}C do RNA e híbridos RNA@Mt em pH 3.0*.....	64
Tabela.3-3: Etapas de perda de massa obtidas por termogravimetria das amostras antes e após a interação com RNA em pH 2,9-3,1.	66
Tabela 4-1: Fórmulas moleculares e dados de pureza dos reagentes químicos utilizados.	71
Tabela 4-2: Valores de d para Na-Bent, CTAB-Bent e seus respectivos híbridos com nerolidol.	75
Tabela 4-3: Valores de espaçamento basal e quantidade de surfactante utilizados na preparação de montmorillonitas ou bentonitas modificadas com CTAB de acordo com a literatura.....	77
Tabela 4-4: Resultados de análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio dos híbridos nerolidol/Na-Bent e nerolidol/CTAB-Bent, assim como a quantidade de nerolidol incorporado (q).	80
Tabela 5-1: Quantidades incorporadas de clorexidina, valores de espaçamento basal (d) e distancia interlamelar ($\Delta\mathbf{d}$) dos híbridos clorexidina/Bent.....	89

Lista de siglas

AMP	Monofosfato de adenosina
Ca-Mt	Montmorillonita trocada com cálcio
CHN	Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio
Clo0,1/Bent	Híbrido clorexidina/bentonita sintetizado com 0,1% de clorexidina
Clo0,3/Bent	Híbrido clorexidina/bentonita sintetizado com 0,3% de clorexidina
Clo0,5/Bent	Híbrido clorexidina/bentonita sintetizado com 0,5% de clorexidina
Clo0,7/Bent	Híbrido clorexidina/bentonita sintetizado com 0,7% de clorexidina
Clo1/Bent	Híbrido clorexidina/bentonita sintetizado com 1% de clorexidina
CMP	Monofosfato de citidina
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
CTAB-Bent	Bentonita organofuncionalizada com brometo de cetiltrimetilamônio
CTC	Capacidade de troca catiônica
DRX	Difração de raios X
DTG	Termogravimetria diferencial
FTIR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier
GMP	Monofosfato de guanosina
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Mg-Mt	Montmorillonita trocada com magnésio
Mt	Montmorillonita
Na-Bent	Bentonita sódica
Na-Mt	Montmorillonita sódica
NE10/CTAB-Bent	Híbrido nerolidol/Bentonita organofílica sintetizado com 10% de nerolidol
NE10/Na-Bent	Híbrido nerolidol/Bentonita sintetizado com 10% de nerolidol
NE20/CTAB-Bent	Híbrido nerolidol/Bentonita organofílica sintetizado com 20% de nerolidol
NE20/Na-Bent	Híbrido nerolidol/Bentonita sintetizado com 20% de nerolidol
NE30/CTAB-Bent	Híbrido nerolidol/Bentonita organofílica sintetizado com 30% de nerolidol
NE30/Na-Bent	Híbrido nerolidol/Bentonita sintetizado com 30% de nerolidol

NE40/CTAB-Bent	Híbrido nerolidol/Bentonita organofílica sintetizado com 40% de nerolidol
NE40/Na-Bent	Híbrido nerolidol/Bentonita sintetizado com 40% de nerolidol
NE5/CTAB-Bent	Híbrido nerolidol/Bentonita organofílica sintetizado com 5% de nerolidol
NE5/Na-Bent	Híbrido nerolidol/Bentonita sintetizado com 5% de nerolidol
NE50/CTAB-Bent	Híbrido nerolidol/Bentonita organofílica sintetizado com 50% de nerolidol
NE50/Na-Bent	Híbrido nerolidol/Bentonita sintetizado com 50% de nerolidol
OE	Óleo essencial
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RNA@Ca-Mt	Molécula de RNA adsorvida em montmorillonita trocada com cálcio
RNA@Mg-Mt	Molécula de RNA adsorvida em montmorillonita trocada com magnésio
RNA@Na-Mt	Molécula de RNA adsorvida em montmorillonita sódica
RNA@Sr-Mt	Molécula de RNA adsorvida em montmorillonita trocada com estrôncio
Sr-Mt	Montmorillonita trocada com estrôncio
TG	Análise termogravimétrica
UMP	Monofosfato de uridina

RESUMO

Título: Híbridos de nerolidol ou digluconato de clorexidina com bentonita como agentes antibacterianos e híbridos de montmorillonitas/RNA

Argilas/argilominerais são materiais versáteis passíveis de interagir com compostos orgânicos, alterando suas propriedades químicas. No presente trabalho, montmorillonita foi aplicada na adsorção de RNA e uma argila bentonita sódica na incorporação de nerolidol e digluconato de clorexidina. Os híbridos da interação das montmorillonitas mono-iônicas com RNA foram obtidos em diferentes pHs e a reação foi seguida por difratometria de raios X, termogravimetria, espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^{27}Al , ^{31}P e ^{13}C no estado sólido. Foi observado que a formação do híbrido RNA/montmorillonita foi dependente do pH. Em um meio ácido, as moléculas de RNA foram intercaladas em uma conformação plana, com contribuição de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio. A presença de diferentes cátions, como Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Sr^{2+} , influenciou a adsorção da biomolécula. A bentonita sódica e modificada com brometo de cetilamônio foram utilizadas para incorporação de nerolidol, cujas atividades antibacterianas contra bactéria gram negativa, *Escherichia coli*, e gram positiva, *Staphylococcus aureus*, foram investigadas. Resultados de difração de raios X em baixo ângulo sugeriram a formação de híbridos de intercalação de nerolidol com a bentonita com valor máximo de espaçamento basal de 3,0 nm. A quantidade de nerolidol foi dependente da composição de partida conforme os dados de CHN. Enquanto que a atividade antibacteriana foi prejudicada provavelmente pela lenta liberação do nerolidol dos sólidos. A formação de híbridos de intercalação de clorexidina/montmorillonita foi acompanhada medidas de difração de raios X resultando em espaçamentos basais entre 1,40-1,56 nm. A quantidade máxima incorporada de clorexidrina foi de 689 mg g⁻¹. A ação antibacteriana dos híbridos foi efetiva e diretamente proporcional à quantidade incorporada de clorexidina, sendo alcançada 100% de inibição contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os resultados indicaram que híbridos de intercalação das moléculas orgânicas com montmorillonita foram obtidos em todos os casos estudados e que a atividade antibacteriana foi dependente da natureza dessas moléculas e da quantidade incorporada, embora todas as amostras apresentaram atividade antibacteriana para ambas as bactérias avaliadas.

Palavras-chave: Argilominerais, híbrido de intercalação, biomoléculas, óleos essenciais, ação antibacteriana, adsorção.

ABSTRACT

Title: Hybrids of nerolidol or chlorhexidine digluconate with bentonite as antibacterial agents and Montmorillonite/RNA hybrids

Clays/clay minerals are versatile materials that can interact with organic compounds, changing their chemical properties. In the present work, montmorillonite was applied in the adsorption of RNA and a sodium bentonite was used for the incorporation of nerolidol and chlorhexidine digluconate. RNA/monoionic montmorillonites hybrids were obtained at different pHs and the reaction was followed by X-ray diffraction, thermogravimetry, infrared spectroscopy and ^{27}Al , ^{31}P and ^{13}C solid state nuclear magnetic resonance. It was observed that the formation of the RNA/montmorillonite hybrid was pH dependent. In an acidic medium, the RNA molecules were intercalated in a flat conformation, with contribution of electrostatic interactions and hydrogen bonds. The presence of different cations such as Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} and Sr^{2+} influenced the adsorption of the biomolecule. Sodium bentonite cetylammonium bentonite were used to incorporate nerolidol, whose antibacterial activities against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were investigated. Low angle X-ray diffraction measurements suggested the formation of nerolidol intercalated hybrids in montmorillonite with a maximum basal spacing of 3.0 nm. The amount of nerolidol depended on the composition as indicated CHN results. Antibacterial activity was probably influenced effect of nerolidol release from solids. The formation of chlorhexidine/montmorillonite intercalated hybrids was followed by X-ray diffraction measurements resulting in basal spacings between 1.40-1.56 nm. The maximum incorporated amount of chlorhexidine was 689 mg g^{-1} . The antibacterial activity of the hybrids was effective and directly proportional to the incorporated amount of chlorhexidine, achieving 100% inhibition against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The results indicated formation of intercalation hybrids of the organic molecules in montmorillonite were and that the antibacterial activity was dependent on the nature of the organic molecules and the composition, although all of the samples showed antibacterial activity for both evaluated bacteria.

Keywords: Clay minerals, intercalation hybrid, biomolecules, essential oil, bactericidal action, adsorption.

PREFÁCIO

No intuito de melhorar a organização e compreensão dos trabalhos desenvolvidos nessa tese, devido às características de cada sistema proposto, o presente trabalho de tese foi dividido em 7 capítulos.

O capítulo 1 é formado pela introdução, objetivos geral e específico de cada trabalho realizado nessa tese. O capítulo 2 trata-se de uma breve fundamentação teórica, sendo abordados a estrutura e propriedades da montmorillonita, assim como a descrição de trabalhos que envolvam os tipos de interação entre RNA (ou moléculas que constituem o RNA), óleos essenciais e clorexidina com montmorillonita. Nos tópicos relacionados a essas duas moléculas orgânicas, são descritos também as possíveis aplicações para os híbridos formados. Ainda neste capítulo, o tópico referente à incorporação de óleos essenciais em montmorillonita compõe parte do artigo intitulado: “*Montmorillonite with essential oils as antimicrobial agents, packaging, repellents, and insecticides: An overview*”, publicado na revista *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, conforme o apêndice.

Nos capítulos 3 ao 5, os trabalhos desenvolvidos foram estruturados na forma de artigo, com introdução, objetivos, metodologia experimental, resultados e discussão, e conclusão. O capítulo 3 trata do estudo da interação entre uma molécula modelo de RNA com montmorillonita sódica sintética e trocada com íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Sr^{2+} , cujos dados foram publicados no artigo: “*When RNA meets montmorillonite: Influence of the pH and divalent cations*”, na revista *Applied Clay Science*, conforme o apêndice.

No capítulo 4, os dados referentes à modificação de uma argila bentonita sódica com sal alquilamônio são apresentados, bem como a incorporação de nerolidol, uma molécula presente em óleo essencial de plantas, em bentonita sódica e organofílica, enquanto que no capítulo 5, foi tratada a incorporação de molécula farmacológica de ampla ação antibacteriana: a clorexidina.

Finalmente, nos capítulos 6 e 7, estão as considerações finais e perspectivas, e as referências bibliográficas utilizadas na escrita dessa tese, respectivamente.

Capítulo 1

Introdução e objetivos



1.0 Introdução

As argilas/argilomineriais são materiais bem conhecidos e utilizados pela humanidade desde a antiguidade. A presença desses sólidos é apontada na terra desde o período hadeano¹, cerca de bilhões de anos atrás (JAMES CLEAVES et al., 2012), sendo atribuído a participação desses filossilicatos na proteção e síntese de biomoléculas e na origem da vida (HASHIZUME, 2015; LAZCANO, 2018).

De fato, propriedades intrínsecas desses sólidos como, por exemplo, elevada área superficial interna e possibilidade de confinar moléculas em seu espaço interlamelar fazem deles excelentes “hospedeiros” para biomoléculas fundamentais para a vida tais como enzimas (AN et al., 2015), proteínas (SCHMIDT; MARTÍNEZ, 2016), aminoácidos (PIRES; JUŻKÓW; PINTO, 2018) e ácidos nucleicos (RUIZ-MIRAZO; BRIONES; DE LA ESCOSURA, 2014). Dentre esses argilominerais, pode-se destacar a montmorillonita.

A montmorillonita é um dos argilominerais mais utilizados nos estudos de confinamento de biomoléculas devido às suas propriedades, que além das já citadas, possuem ainda boa capacidade de troca catiônica e capacidade e intumescimento em água, o que pode auxiliar a intercalação de espécies em sua região interlamelar (FRANÇA et al., 2020a). A importância desse argilomineral vem sendo sugerida e investigada até mesmo em estudos da origem da vida, auxiliando na proteção ou síntese de moléculas ditas prebióticas, como bases nitrogenadas (CARNEIRO et al., 2011; YU et al., 2013) nucleosídeos (FORNARO et al., 2018a), nucleotídeos (MIGNON et al., 2019, 2020), RNA (DE OLIVEIRA et al., 2021; JELAVIĆ et al., 2017) DNA (XIE et al., 2019; YAMAGUCHI et al., 2018) e etc.

Além disso, devido à presença de grupos hidroxilas (disponíveis e reativas) e carga negativa na sua superfície, alta disponibilidade, possuir baixo custo e por ser ambientalmente favorável é um material versátil para aplicações industriais e tecnológicas, principalmente no setor da saúde, na incorporação e liberação de moléculas farmacológicas naturais e/ou sintéticas (KHATOON; CHU; ZHOU, 2020), com ação anti-inflamatória (GHADIRI; CHRZANOWSKI; ROHANIZADEH, 2015; YAN et al., 2020a), antioxidante (KAR et al., 2019) e até mesmo antimicrobiana (FERNÁNDEZ et al., 2020; SUN et al., 2018). A montmorillonita ainda é passível a diversas modificações como a organofuncionalização com

¹ Tempo geológico que engloba desde a formação da terra, há 4,6 Ga até aproximadamente 3,8 Ga, antecedendo as primeiras formas de vida do planeta.

surfactantes (BRITO et al., 2018), o que poderá melhorar o poder de incorporação de moléculas orgânicas farmacológicas (FRANÇA et al., 2020b).

Nesse contexto, o presente trabalho utiliza argila/argilomineral como adsorvente em três estudos distintos: o primeiro trata da adsorção de uma biomolécula modelo de RNA em montmorillonita, avaliando a interação entre essas espécies. Dessa forma, a intercalação de um derivado de RNA em uma montmorillonita sintética é descrito, em que o efeito do íon interlamelar foi avaliado.

O segundo estudo diz respeito à inédita incorporação de nerolidol, uma molécula de óleo essencial de vasta bioatividade, em argila bentonita sódica e bentonita organofuncionalizada com CTAB.

O terceiro e último estudo investiga a incorporação em bentonita sódica de uma molécula farmacológica com excelente atividade antimicrobiana, a clorexidina.

A ação antibacteriana dos híbridos formados nos dois últimos estudos foi investigada contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

1.1 Objetivos

1.1.1 Geral

Avaliar a interação de derivado de uma molécula importante para a vida com argilominerais sintéticos e investigar a incorporação de moléculas com ação antibacterianas em argila sódica e organofuncionalizadas.

1.1.2 Específicos

Obter montmorillonitas sintéticas trocadas com cálcio, magnésio e estrôncio;

Estudar a interação do RNA com as montmorillonitas sódica sintética e suas formas trocadas com os cátions divalentes, em diferentes condições de pH;

Investigar a incorporação de nerolidol em bentonita sódica e organofuncionalizada com sal de amônio;

Avaliar a ação antibacteriana dos híbridos nerolidol/argilas contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*;

Investigar a incorporação de digluconato de clorexidina em bentonita sódica avaliando a atividade antibacteriana dos híbridos clorexidina/bentonita frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Capítulo 2

Fundamentação teórica



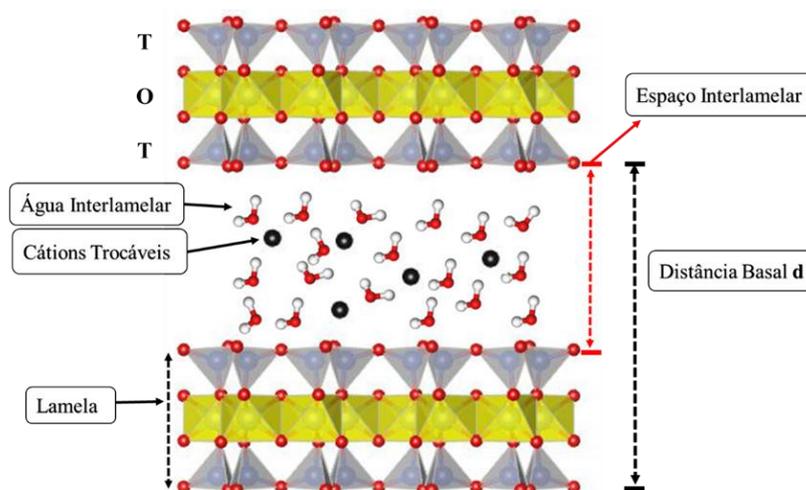
2.1 Montmorillonita (Mt)

2.1.1 Estrutura e propriedades

Bentonita é uma terminologia adotada a argilas que possuem em sua composição, no mínimo, 50% de montmorillonita ou outra esmectita como o principal constituinte (HELLRUP et al., 2016). Apesar de poder conter outras fases nesse sólido, como quartzo, caulinita, ilita, feldspato, sendo diretamente dependente do depósito em que foram formadas, aqui, será discutido somente a respeito da fase montmorillonita, uma vez que é o argilomineral alvo dessa tese.

A montmorillonita (Mt) é um argilomineral do grupo das esmectitas que apresenta estrutura do tipo 2:1, com fórmula geral ideal ${}^{\text{IV}}(\text{Si}_4)^{\text{VI}}(\text{Al}_{2-y}\text{Mg}_y)\text{O}_{10}(\text{OH})_2, {}_y\text{M}^{\text{x}+}.\text{nH}_2\text{O}$, em que $\text{M}^{\text{x}+}$ é o cátion interlamelar de carga x (BERGAYA; JABER; LAMBERT, 2011). Esse material possui carga lamelar entre 0.2 – 0.6 por meia célula unitária, sendo sua estrutura constituída, idealmente, por duas folhas de silício coordenado tetraedricamente a átomos de oxigênio, ligadas através de uma folha de alumínio coordenado octaedricamente também a átomos de oxigênio e a hidroxilas (FONSECA et al., 2016; SCHOONHEYDT; JOHNSTON; BERGAYA, 2018), como representado na Figura 2-1. Na folha octaédrica além de Al^{3+} , íons de Mg^{2+} também podem ocupar esse sítio (GHADIRI; CHRZANOWSKI; ROHANIZADEH, 2015).

Figura 2-1: Representação da estrutura planar de um filossilicato 2:1, mostrando cátions trocáveis e água interlamelar. As esferas em vermelho (átomos de oxigênio), cinza (átomos de silício) e amarelo (átomos de alumínio) (Figura gerada com o programa VESTA 3–Gratuito (MOMMA; IZUMI, 2011)).



Fonte: Próprio autor.

A carga negativa permanente derivada da substituição isomórfica no sítio octaédrico é compensada por cátions trocáveis, geralmente Na^+ , Ca^{2+} ou Mg^{2+} presentes no espaço interlamelar desse sólido na sua forma natural (MOUSA et al., 2018). Uma propriedade marcante das Mts é a capacidade de expansão em água, que está correlacionada com a presença dos cátions interlamelares, uma vez que a carga limitada da camada atrai os cátions com forças eletrostáticas fracas, que não superam a afinidade dessas espécies metálicas por água, fazendo assim com que esses cátions trocáveis absorvam água circundante, e conseqüentemente levando à expansão do argilomineral, ou seja, à expansão do espaço interlamelar (FERRAGE et al., 2010; NGOUANA W.; KALINICHEV, 2014; TEICH-MCGOLDRICK et al., 2015).

Esse argilomineral ainda possui capacidade de troca catiônica (CTC), disponibilidade e capacidade de intercalar moléculas de diversos tamanhos na sua região interlamelar como polímeros (DARDER; COLILLA; RUIZ-HITZKY, 2003; GHASEMI HAMIDABADI et al., 2017) e proteínas (JOHNSTON et al., 2012; LEPOITEVIN et al., 2014). Há também a presença de sítios com grupos hidroxilas, chamados hidroxilas terminais ou de borda, que são influenciados pelo pH (PECINI; AVENA, 2013). Essas propriedades fazem desses sólidos excelentes candidatos como suporte para adsorção de compostos orgânicos e biomoléculas, assim como os tornam passíveis a modificações para melhorar ainda mais as suas propriedades (GHADIRI; CHRZANOWSKI; ROHANIZADEH, 2015).

2.2 Interações e modificações de argilominerais com RNA e moléculas com atividade antimicrobiana

Estudos das interações de biomoléculas em argilominerais, tais como RNA e DNA, abordam um tópico de crescente interesse, tendo em vista uma ampla área de aplicações como por exemplo, na síntese de nucleotídeos (YADAV; KUMAR; KRISHNAMURTHY, 2020) e fossilização experimental (JACQUEMOT et al., 2019) e principalmente em estudos para ajudar a desvendar o “*Big Puzzle*” sobre a origem da vida (JAMES CLEAVES et al., 2012; PEDREIRA-SEGADE et al., 2018).

Outro tipo de biomolécula de bastante interesse são os óleos essenciais por possuírem uma elevada gama de funções antibacteriana, antifúngica, inseticida entre outras (YU et al., 2020; JUGREET et al., 2020). Esses compostos, quando associados aos argilominerais, podem gerar materiais com propriedades e atividades biológicas melhoradas em diversos setores importante, como por exemplo na agricultura e no setor de alimentos (SOUZA et al., 2019a).

Uma outra molécula orgânica de intensa ação antimicrobiana é a clorexidina, que possui um amplo espectro de ação antimicrobiana, sendo usada em diversos setores da saúde humana como antisséptico na odontologia, medicina, cosméticos entre outros, e na saúde animal (BROOKES et al., 2020; CARVALHO et al., 2020). Essa última molécula, em conjunto com argilominerais, tais como a Mt pode atuar de maneira mais “controlada” e desempenhar sua função por um período mais prolongado (LOBATO-AGUILAR et al., 2020). Dessa forma, a seguir, será discutido estudos que envolvem a adsorção/incorporação de RNA, óleos essenciais e clorexidina em Mt, desde os tipos de interações entre essas espécies a aplicações dos híbridos formados.

2.2.1 Interação com ácido ribonucleico (RNA)

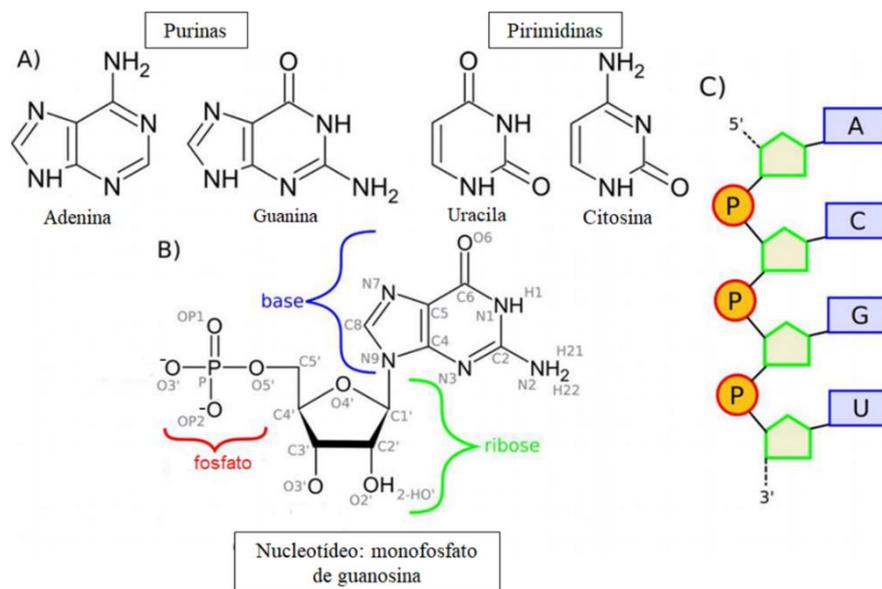
Argilominerais possuem a capacidade de adsorver diversas biomoléculas, que podem incluir enzimas (AN et al., 2015), proteínas (SCHMIDT; MARTÍNEZ, 2016), aminoácidos (YANG et al., 2016), DNA (KUMARI et al., 2014) e RNA (THENG, 2012), em um ambiente natural. De fato, os estudos da interação dessas moléculas em argilominerais exercem um papel significativo na compreensão da evolução bioquímica da terra e origem da vida, imobilização enzimática, segurança no ecossistema do solo e engenharia genética (YU et al., 2013). Esses argilominerais, na Terra prebiótica, podem ter servido como suporte para essas moléculas em sua superfície, catalisando suas polimerizações ((HASHIZUME; VAN DER GAASST; THENG, 2010; PEDREIRA-SEGADE et al., 2016, 2018; MIGNON et al., 2020), assim como atuando na “proteção” contra radiação UV por exemplo (SWADLING; COVENEY; CHRISTOPHER GREENWELL, 2012; FORNARO et al., 2013; FORNARO et al., 2018a).

Uma das biomoléculas de suma importância para a vida é o ácido ribonucleico (RNA) (HIGGS; LEHMAN, 2015). Essas moléculas intervêm em várias funções biológicas importantes, como por exemplo, na regulação, codificação e descodificação genética (ŠPONER et al., 2018). Estudos sugerem a importância dessas biomoléculas na terra prebiótica, devido à sua capacidade catalítica e em atuar como depósito de informação genética (ŠPONER et al., 2016; HARRISON; LANE, 2018).

O ácido ribonucleico (RNA), Figura 2-2, é uma molécula polimérica linear constituída por unidades menores chamadas de nucleotídeos. Cada uma dessas unidades é composta por um grupo fosfato, ribose e bases nitrogenadas que, por sua vez, subdividem-se em purinas (adenina e guanina) e pirimidinas (citosina e uracila) (KUMAR; KUMAR, 2014). As cadeias de RNA são construídas pela formação de ligações fosfodiéster entre resíduos de ribose

sucessivos com grupos fosfato, ligando o carbono 3' de cada ribose ao carbono 5' do seguinte, deixando livre as posições na extremidade da molécula para os carbonos 5' e 3', Figura 2-2.

Figura 2-2: (A) As bases purinas e pirimidinas encontradas no RNA. (B) Exemplo de uma unidade de nucleotídeo do RNA. A base nitrogenada, ribose e o grupo fosfato são marcados por parênteses azul, verde e vermelho, respectivamente. As designações comumente usadas (nomes) dos átomos individuais são escritas em cinza. (C) Representação esquemática mostrando a sequência de RNA 5'-ACGU-3'. Os grupos fosfatos, riboses e bases são traçados em vermelho, verde e azul, respectivamente.



Fonte: Adaptado de (ŠPONER et al., 2018).

Talvez, a principal dúvida que direciona a grande maioria dos estudos sobre a química prebiótica, é de como esses ácidos nucleicos se formaram, ou seja, como ocorreu a polimerização de seus constituintes na era prebiótica (RUIZ-MIRAZO; BRIONES; DE LA ESCOSURA, 2014; ERASTOVA et al., 2017). Diversos trabalhos utilizando argilominerais, como a Mt, têm sido reportados na catálise de oligômeros de RNA como reportado em detalhes em recente revisão (YADAV; KUMAR; KRISHNAMURTHY, 2020). Por exemplo, trabalhos de Ferris et al (ERTEM; FERRIS, 1996; FERRIS et al., 1996; ERTEM; FERRIS, 1997; FERRIS, 1999; ERTEM et al., 2000; HUANG; FERRIS, 2006) resultaram em oligômeros de RNA com mais de 50 monômeros. No entanto, as sequências de RNA desse comprimento são suficientemente longas para exibir fidelidade na replicação, bem como atividade catalítica. Dessa forma, a compreensão de como essa polimerização poderia ter ocorrido na terra em condições prebióticas ainda é um desafio, assim como o total entendimento da interação RNA/argilomineral.

Nos últimos anos, estudos sobre as interações de Mt com moléculas de RNA e seus constituintes vem ganhando destaque, com o propósito de tentar entender e de fato validar a hipótese de como esses argilominerais puderam funcionar como uma forma primitiva de

“hospedeiro” para esses biopolímeros (HASHIZUME, 2015). As interações entre esses silicatos lamelares e o RNA, ou até mesmo seus componentes, podem ser regidas por mecanismos como forças eletrostáticas, ligação de hidrogênio e ponte catiônica (ou ponte de cátions) (YU et al. 2013; MIGNON et al., 2019, 2020; MIGNON; SODUPE, 2012; MIGNON; UGLIENGO; SODUPE, 2009). A seguir será discutido, brevemente, a respeito desses mecanismos com base em alguns trabalhos da literatura.

2.2.1.1 Interação por forças eletrostáticas e ligação de hidrogênio

A principal e mais utilizada abordagem da interação para a formação do híbrido RNA/Mt (ou com os constituintes da biomolécula) está relacionada ao pH do meio (THENG, 2012). De fato, é observado um aumento das quantidades adsorvidas de bases nitrogenadas com a diminuição do pH para valores menores do que o pKa de cada grupo, protonando, especificamente os nitrogênios, havendo assim interação eletrostática entre esses grupos positivos e a superfície negativa da argila. Quando o meio é alcalino, outros tipos de mecanismos ocorrem (YU et al., 2013).

A exemplo, Carneiro et al. (2011) observaram que a adsorção de adenina e citosina em uma argila ativada por ácido (Mt-KSF) foi maior em pH 2 do que em pH 7, sendo atribuído à atração eletrostática da base nitrogenada protonada em pH 2 com a superfície negativa da argila. Em pH 7, as bases nitrogenadas se encontravam neutras, e as quantidades adsorvidas foram associadas a ligações de hidrogênio. Resultados similares foram reportados em outros estudos (LAILACH; THOMPSON; BRINDLEY, 1968; BENETOLI et al., 2008; UGLIENGO; SODUPE, 2009; HASHIZUME; VAN DER GAAST; THENG, 2010).

De forma idêntica, os nucleotídeos são adsorvidos por interação eletrostática em Mts, quando o pH do meio é menor do que o pKa dessas biomoléculas. Por exemplo, Perezgasga et al. (2005) investigaram a adsorção de nucleotídeos e polinucleotídeos de adenina e uracila em Mt sódica, variando o pH (2, 6 e 10). Novamente, maiores quantidades foram adsorvidas em pH ácido abaixo do pKa do nucleotídeo, sendo obtido equilíbrio em apenas 15 min. Resultados semelhantes foram obtidos na adsorção de nucleotídeos por interação eletrostática (FEUILLIE et al., 2013; PEDREIRA-SEGAGE et al., 2016).

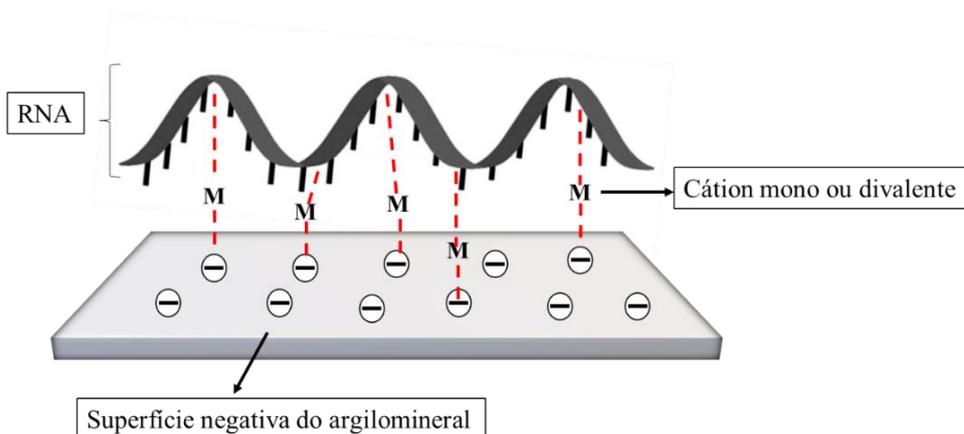
Em relação à molécula de RNA (e não só seus constituintes separadamente) tal abordagem também foi usada, possibilitando a adsorção e até mesmo a intercalação dessa biomolécula na Mt. A exemplo, Greaves e Wilson (GREAVES; WILSON, 1969) observaram

que quando o pH do sistema era abaixo de 5, houve um acentuado aumento da quantidade de RNA adsorvido e no valor da distância basal indicando a intercalação da biomolécula na Mt, principalmente com a diminuição do pH. No entanto, nos sistemas em pH acima de 5 o oposto foi observado. Em outros estudos, em pH fora da faixa ácida, nenhum deslocamento do plano basal da Mt foi observado para sistemas com RNA (VIENNET et al., 2020) e DNA (XIE et al., 2019).

2.2.1.2 Interação por “ponte catiônica”

As cargas negativas presentes na superfície da Mt e no grupo fosfato do RNA se repelem. No entanto, como já discutido, nucleotídeos e até mesmo o RNA podem ser adsorvidos por esses sólidos. Franchi et al (2003) propuseram que os cátions interlamelares possuem um papel fundamental na adsorção em Mts. Esses cátions poderiam potencialmente mediar a interação através da carga negativa usando cátions monovalentes, ou criando uma ponte de cátion divalente entre a superfície do argilomineral e os grupos fosfatos, ambos com cargas negativas, como comentado anteriormente, e representado na Figura 2-3. Nesse mesmo trabalho, foram verificadas maiores adsorções dos polinucleotídeos com cátions divalentes. Estudos similares usando esse mecanismo na adsorção em Mts foram reportados para RNA e seus constituintes (FRANCHI; GALLORI, 2005; KADDOUR et al., 2018; VILLAFANE-BARAJAS et al., 2018; HAO et al., 2019), bem como DNA (CAI; HUANG; ZHANG, 2006; CAI et al., 2007; BEALL et al., 2009; SHENG et al., 2019; XIE et al., 2019).

Figura 2-3: Influência do cátion interlamelar na adsorção de RNA em argilomineral.



Fonte: Adaptado de Franchi et al (2003).

Dessa forma, fatores como o pH e a presença do cátion interlamelar são fundamentais na interação entre essas biomoléculas e os argilominerais, em especial, a Mt.

2.2.2 Incorporação de óleos essenciais em Mt

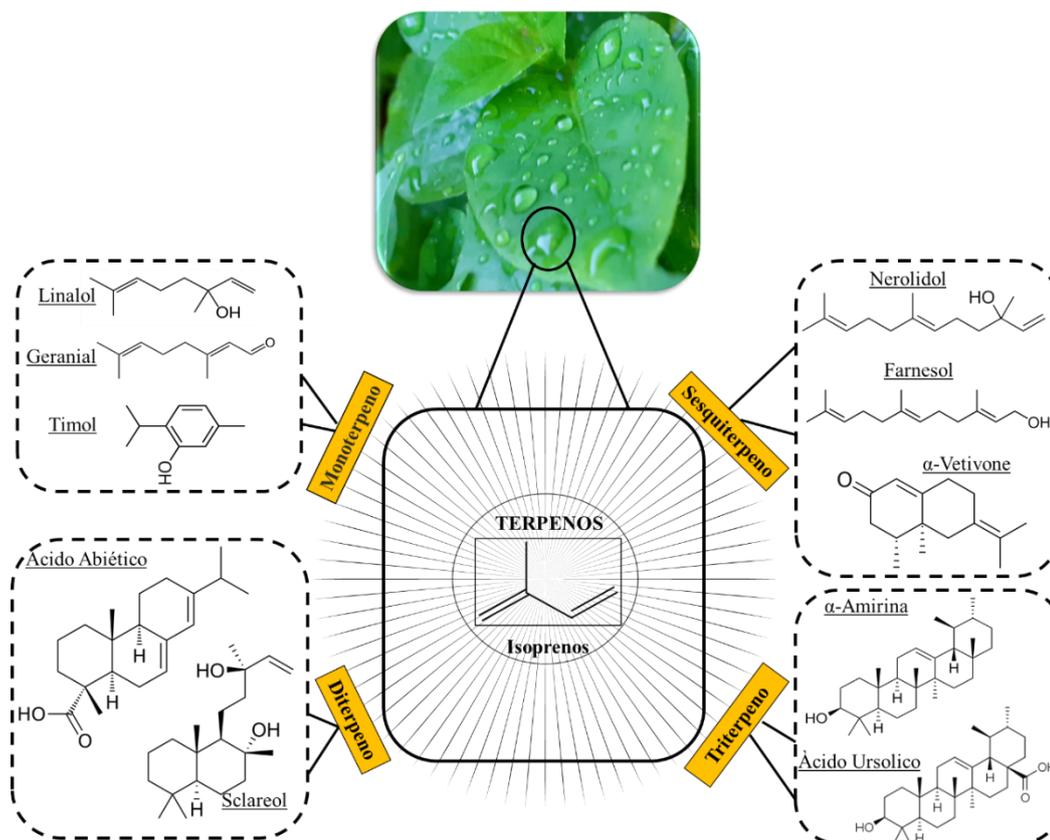
Óleos essenciais (OEs) são misturas voláteis de compostos químicos extraídos de diferentes partes de plantas como folhas, sementes, caules, cascas, raízes, flores e frutos, que apresentam diversas atividades biológicas (AUMEERUDDY-ELALFI et al., 2018). Os OEs não são estritamente insolúveis em água, mas geralmente apresentam pouca solubilidade, assim como também não são “essenciais” em relação a serem indispensáveis aos seres humanos, como por exemplo, os aminoácidos essenciais. Esse termo é adotado, pois são essenciais no sentido de que contém a essência, ou seja, a fragrância da planta característica da qual é derivado (CALO et al., 2015; DHIFI et al., 2016).

Essa propriedade responsável pelo aroma de plantas, aliado com a sua química, resulta que esses compostos executam funções importantes para a planta, como por exemplo, atrair insetos e polinizadores benéficos, assim como poder servir de defesa da planta contra pragas (DHIFI et al., 2016).

Atualmente, mais de 3000 tipos de OEs já foram identificados (FALLEH et al., 2020). Geralmente, esses compostos podem conter aproximadamente de 20 a 60 componentes ou até mesmo em certos casos mais de 100 componentes diferentes, em quantidades bastante distintas; sendo que os componentes principais ou majoritários estão em concentrações razoavelmente altas entre 20 a 90%, enquanto os demais componentes estão presentes em menores proporções (BILIA et al., 2014; DHIFI et al., 2016).

Pode-se destacar que os principais constituintes dos OEs são tipicamente compostos de moléculas simples baseadas em unidades repetidas de isoprenos, chamadas de terpenos (BASER; BUCHBAUER, 2016). Essas moléculas são classificadas de acordo com a quantidade de unidades de isoprenos combinadas, tais como os monoterpênicos (duas unidades de isoprenos), sesquiterpênicos (três unidades de isoprenos), diterpênicos (quatro unidades de isoprenos), triterpeno (seis unidades de isoprenos), etc (JUGREET et al., 2020). Na Figura 2-4, podem ser visualizados alguns exemplos de estruturas dos terpenos, observando-se que podem estar presentes ainda na estrutura do terpeno, outros grupos como óxidos, lactonas, ésteres, álcoois, fenóis, cetonas, aldeídos e ácidos carboxílicos (JUGREET et al., 2020; RAPHAEL IKAN, 1991).

Figura 2-4: Isopreno e exemplos de terpenos que constituem os OEs.



Fonte: Próprio autor.

OEs extraídos de diferentes partes de plantas são conhecidos desde a antiguidade, em diversas culturas, sendo a principal finalidade a medicinal (BASER; BUCHBAUER, 2016; HE et al., 2016). De fato, os OEs possuem alta bioatividade, com ampla variedade de aplicações, que dentre estas, pode-se destacar as do campo da saúde, atuando como antioxidante, anti-inflamatório, antibacteriano, antifúngico; no setor agrícola como biopesticida; na indústria alimentícia, atuando como aditivo e no recobrimento de alimentos, sendo abordadas essas funções nas diversas revisões publicadas na literatura recentemente (BHAVANIRAMYA et al., 2019; BORGES et al., 2019; CALO et al., 2015; DONATO et al., 2020; M. DOMINGUES; SANTOS, 2019; TARIQ et al., 2019).

No que diz respeito à atividade antimicrobiana, essa ação é associada aos grupos químicos presentes nos OEs (JU et al., 2019a, 2020a). Além disso, a característica hidrofóbica dos EOs permite sua interação com lipídios presentes na membrana celular microbiana e na mitocôndria, o que leva à desorganização dessas estruturas, tornando-as mais permeável, e facilitando substancial liberação de íons e outros componentes vitais para a célula, resultando em morte celular (JU et al., 2019a). Entretanto, o mecanismo da atividade antimicrobiana não

é único, havendo dois ou mais mecanismos que operam simultaneamente. Por exemplo, os possíveis modos de ação são direcionados à parede celular (perda de integridade da parede celular), membrana celular (ruptura da membrana celular, alterando sua permeabilidade e interação com moléculas de fosfolipídios e ácidos graxos), DNA microbiano (dano ao DNA microbiano), respiração celular (inibindo a respiração), e no metabolismo energético (interferência com a síntese de proteínas) (JU et al., 2019a, 2019b, 2020b).

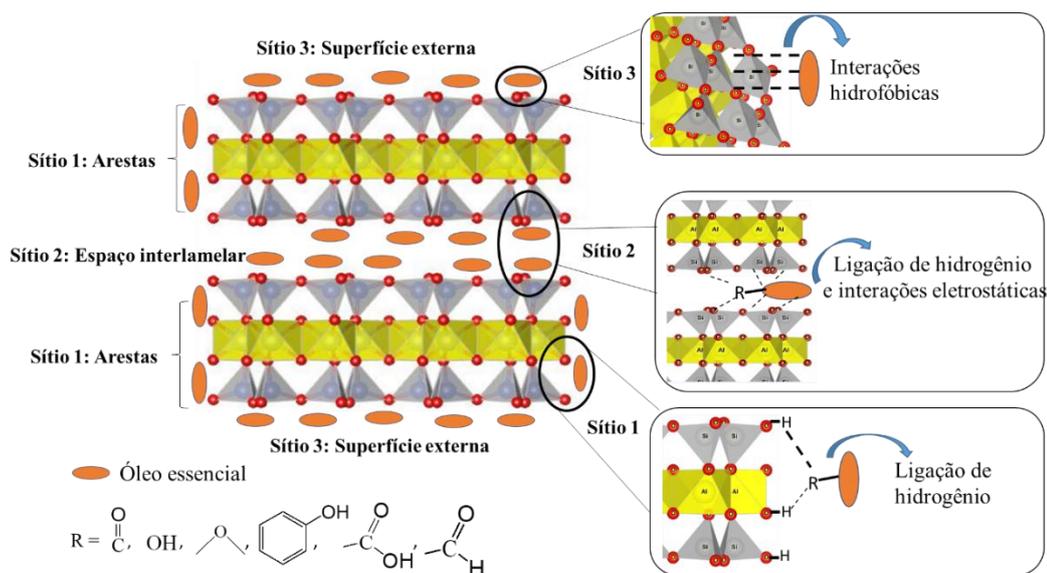
No entanto, algumas propriedades dos OEs podem comprometer a sua aplicabilidade a exemplo da baixa solubilidade aquosa, a alta volatilidade, reatividade e sensibilidade à temperatura (JUGREET et al., 2020). Portanto, tecnologias têm sido desenvolvidas com a finalidade de tentar superar essas limitações, tais como o uso na forma de nanoemulsões (ACEVEDO-FANI et al., 2015; LIU; LIU, 2020), encapsulamento (HECKERT BASTOS et al., 2020; VOLIĆ et al., 2018) e filmes à base de polímeros (JAHED et al., 2017; PRIYADARSHI et al., 2018). Outra alternativa que vem ganhando bastante interesse é a incorporação/adsorção dos OEs em matrizes de argilominerais, uma vez que poderá promover uma diminuição dessas limitações dos OEs quando utilizados livres, sem combinação com outros materiais (DE OLIVEIRA et al., 2022).

2.2.2.1 Tipos de interação OEs/Mt

A interação entre a Mt e OEs pode ocorrer por diferentes sítios como ilustrado na Figura 2-5. Por exemplo, os grupos aluminóis e silanois, Al-OH ou Si-OH, são sítios de interação com moléculas orgânicas por ligação de hidrogênio (BERNARDOS et al., 2019; FERNÁNDEZ et al., 2020; GIANNAKAS et al., 2017). A ligação de hidrogênio pode ocorrer entre os grupos OH na superfície e na região de bordas com grupos presentes nas moléculas de terpeno, principalmente os que contêm oxigênio (BERNARDOS et al., 2019; FERNÁNDEZ et al., 2020).

A superfície externa da Mt recoberta por uma folha tetraédrica de grupos siloxanos (Si-O-Si) fornecem sítios relativamente hidrofóbicos, Figura 2-5. Portanto, esses sítios podem de fato ser local de interação com essas moléculas orgânicas (PRAMANIK et al., 2015).

Figura 2-5: Propostas de possíveis sítios (e tipos de interação) em Mt com moléculas de óleos essenciais. (Figura gerada com o programa VESTA 3–Gratuito (MOMMA; IZUMI, 2011)).



Fonte: Próprio autor.

2.2.2.2 Híbridos OEs/Mt

A adsorção de OEs em argilominerais tem sido descrita na literatura, principalmente em Mt. Um sumário de alguns desses estudos são apresentados nas Tabelas 2-1 e 2-2. Giannakas et al. (2017) estudaram o sistema Mt sódica e OEs (óleo essencial de orégano, tomilho e manjerição) e observaram que embora não tenham sido observadas mudanças no espaçamento basal, através dos espectros de infravermelho, novas bandas características dos OEs foram detectadas e indicaram a adsorção desses compostos orgânicos no argilomineral por ligações de hidrogênio. Além disso, por termogravimetria quantificaram que 20, 19 e 14% para o óleo essencial de orégano, tomilho e manjerição foram adsorvidos na Mt, respectivamente, cuja degradação ocorreu acima de 200 °C.

Bernardos et al. (2019) estudaram a adsorção de componentes de OEs (isotiocianato de alila, carvacrol, *trans*-cinamaldeído, dissulfeto de dialilo, eugenol e timol) em bentonita. Os resultados de análise elementar CHN e difratometria de Raios-X indicaram que até 136 mg/g de eugenol foi intercalado na fase Mt da bentonita. A formação de ligações de hidrogênio entre as moléculas orgânicas na superfície da argila foi o mecanismo principal de interação.

Tabela 2-1: Máxima quantidade de óleo essencial incorporado/adsorvido e tipos de interação em Mt em sua forma natural e modificada.

Material	Óleo essencial	Interação	Quant. max. de OE incorporado/adsorvido	Ref.
Na-Mt e Org-Mt	Oregano, tomilho e manjeriço	Ligação de hidrogênio em Na-Mt e intercalação em Org-Mt	20, 19 e 14% ^a para o óleo essencial de oregano, tomilho e manjeriço para Na-Mt,	(GIANNAKAS et al., 2017)
Mt	<i>Curcuma aromatica</i> e <i>Zanthoxylum limonella</i>	Interação dos componentes da mistura dos óleos com a superfície da Mt	-	(PRAMANIK et al., 2015)
Mt comercial (Fulcat® 400, 435 e 800; Fulcolor®), Laponita® e Laponita® B	Gerânio Bourbon, rosewood, lavanda, origanum, manuka e semente de uva	Ligação de hidrogênio	150 mg/g ^b de óleo de gerânio para a Laponita® B	(KINNINMONTH et al., 2013)
Na-Bent	Componentes do óleo essencial de <i>Lavandula angustifolia</i>	-	1506 ug/g ^b do componente 2-β-pineno	(EL MIZ et al., 2014)
Bent	Isotiocianato de alila, carvacrol, <i>trans</i> -cinamaldeído, dissulfeto dialilo, eugenol and timol	Ligação de hidrogênio na superfície externa e interna (intercalação)	136 mg/g ^c de eugenol	(BERNARDOS et al., 2019)
Na-Mt e HDL modificadas com lecitina e lisolecitina	Limoneno	-	14,6% ^a para as Mt modificadas	(NAGY et al., 2013)
Na-Mt modificada com lecitina	Citronelol, Citral e Linalol	Intercalação	-	(FERNÁNDEZ et al., 2020)
Na-Kt, Na-Mt, e modificadas com ferro (Fe/Kt and Fe/Mt)	<i>Ocimum gratissimum</i>	Ligação de hidrogênio, forças eletrostáticas, forças de Van der Waals e Interação hidrofóbica	0.017 mol/g ^b para Fe/Mt	(NAKHLI et al., 2017)
Na-Kt e Na-Mt ativadas com H ₂ SO ₄ e NaOH	<i>Xylopiya aeothiopica</i>	Ligação de hidrogênio e forças de Van der Waals	0.009 mol/g ^b para Mt ativada com H ₂ SO ₄ 2 mol/L	(NAKHLI et al., 2018)
Bent modificada com CTMA, PTMA, óxido de ferro e alumínio.	Timol	Interação hidrofóbica	0,027 g/g ^b para CTMA/Bent	(NGUEMTCHOUIN et al., 2015)
Bent pilarizada	Timol	Ligação de hidrogênio e forças de Van der Waals	319.5 mg/g ^d	(EL MIZ et al., 2014)
Solo argiloso, Mt, Kt, illite, ácido húmico e ferrihidrita	Carvona (isômeros R e S)	-	Entre os filossilicatos, a máxima quantidade adsorvida, K _d = 6.3 L/kg ^e , para Mt	(GÁMIZ; HERMOSÍN; CELIS, 2018)

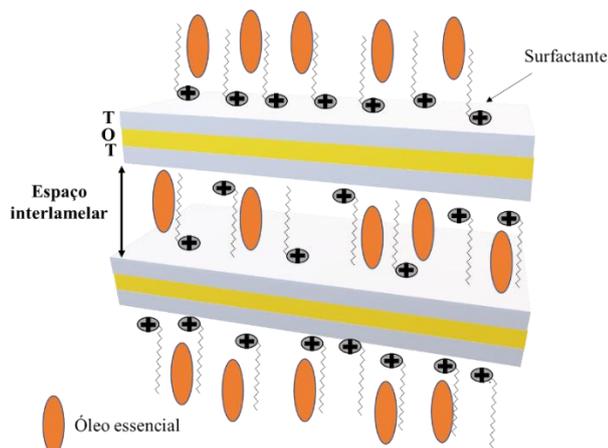
^aQuantificado por termogravimetria (TG); ^bQuantificado por cromatografia gasosa (CG); ^cAnálise elementar CHN; ^dQuantificado por UV/Vis; ^eQuantificado por HPLC; Mt: montmorillonita; Na-Mt: montmorillonita trocada com sódio; Org-Mt: montmorillonita comercial organomodificada com (C14-18); Fulcat® 400: Bentonita comercial trocada com cálcio; Fulcat® 435, Fulcat® 800 e Fulcolor®: bentonita comercial ativadas com ácido; Laponita RD: laponite sintética; Laponita B: fluossilicato sintético; Bent: Bentonita; Na-Bent: bentonita trocada com sódio; Kt: Caulinita; HDL: Hidróxidos duplos lamelares; CTMA: cloreto de cetiltrimetilamônio; PTMA: cloreto de feniltrimetilamônio.

Mt e outros argilominerais podem ser modificados por ativação ácida (KOMADEL, 2016; KOMADEL; MADEJOVÁ, 2013). Esse método é de fácil execução, baixo custo e pode alterar as propriedades do silicato como área superficial e porosidade, além de aumentar a quantidade de sítios ácidos, favorecendo a interação com os OEs.

Mts ativadas com H_2SO_4 em concentração 0.5, 1 e 2 mol L^{-1} foram avaliadas na adsorção do óleo essencial dos frutos de *Xylopiya aeothiopica*, que possui o sabineno como maior constituinte desse óleo essencial por Nakhli et al. (2018). Mt e caulinita ativadas com NaOH foram utilizadas para comparação. No estudo, os maiores valores da área superficial foram obtidos para os sólidos ativados com ácido, principalmente para os derivados da Mt com H_2SO_4 , que favoreceu a afinidade desses sólidos pelo sabineno em comparação aos demais.

Interações hidrofóbicas também podem favorecer a adsorção de OEs em Mt (NAKHLI et al., 2017). Além disso, a hidrofobicidade pode ser alterada com a modificação com surfactantes, como os sais de amônio, entre outros, resultando em Mt organofílicas com novos sítios de adsorção (BIANCHI et al., 2013; BRITO et al., 2018). A formação de argila organofílicas resultou em um aumento do espaço interlamelar pela inserção dos surfactantes, permitindo assim, a melhor interação e intercalação de outras moléculas orgânicas também hidrofóbicas, como os OEs. Uma ilustração é apresentada na Figura 2-6.

Figura 2-6: Modificação da superfície externa e espaço interlamelar da Mt com surfactantes para adsorção de óleos essenciais.



Fonte: Próprio autor.

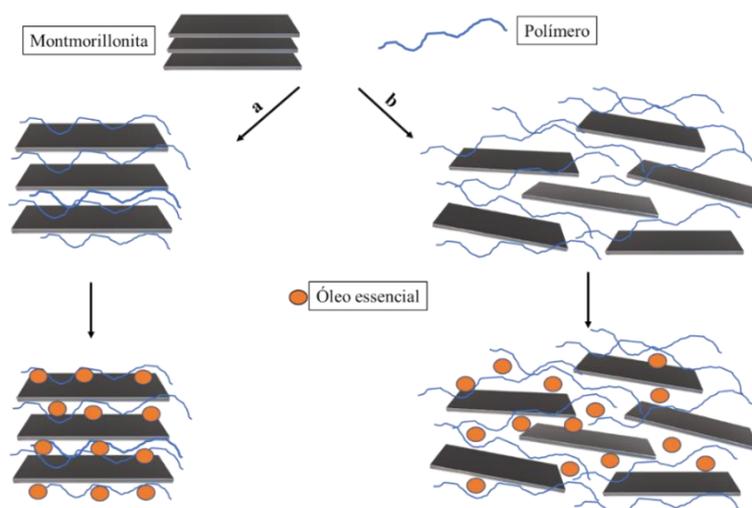
Nguemtchouin et al. (2015) modificaram uma bentonita sódica com cloreto de cetiltrimetilamônio CTMA e cloreto de feniltrimetilamônio PTMA e com policátions de alumínio e ferro e avaliaram a capacidade de adsorção de timol. As modificações causaram mudanças na região interlamelar, indicando intercalação e esfoliação com a introdução dos cátions orgânicos e inorgânicos, respectivamente. Houve melhoria na capacidade de adsorção

para os sólidos organomodificados em relação a bentonita de partida sendo de 4 mg/g, 22 mg/g e 27 mg/g para a Na-Bent, PTMA/Bent e CTMA/Bent respectivamente, indicando a melhor afinidade ao timol.

Uma outra estratégia adotada tem sido o uso de nanocompósitos polímero/Mt para a incorporação de OEs. Uma das principais vantagens desta rota é a presença dos sítios de interação do polímero, que somados com os do argilomineral, podem estabilizar as moléculas dos OEs. Neste sentido, polímeros utilizados são de origem sintética como polietileno (CAMPOS-REQUENA et al., 2015, 2016; GIANNAKAS, 2020; TORIN et al., 2018), Poli(etileno-co-álcool vinílico) (CERISUELO et al., 2012), polivinilpirrolidona (PVP) (SANTOS et al., 2020) e, principalmente, os polímeros naturais como quitosana (PIRES; DE SOUZA; FERNANDO, 2018; SOUZA et al., 2019a, 2019b), celulose (QUINTERO et al., 2014; TUNÇ; DUMAN, 2011; TUNÇ; DUMAN; POLAT, 2016), alginato (ALBOOFETILEH et al., 2014, 2018; HAMMOUDI et al., 2020), amido (CAMPOS-REQUENA et al., 2017, 2018; IAMAREERAT et al., 2018), gelatina (ALEXANDRE et al., 2016), kappa-caragenana (SHOJAEI-ALIABADI et al., 2014) e poliácido láctico (VILLEGAS et al., 2019).

No geral, a entrada/dispersão do argilomineral no polímero altera as propriedades finais dos nanocompósitos em relação aos materiais de partida (AZEREDO, 2009; RHIM; PARK; HA, 2013), incluindo as propriedades mecânicas (SOUZA et al., 2019a), térmicas (TUNÇ; DUMAN; POLAT, 2016) e de barreira (água e O₂) (POLA et al., 2016; TUNÇ; DUMAN; POLAT, 2016). Além disso, a Mt pode exercer um papel fundamental nesse sistema por diminuir a difusão das moléculas dos OEs, ou seja, liberando-o de forma gradativa (CAMPOS-REQUENA et al., 2015, 2016). Isto ocorre porque a incorporação direta de OEs em polímeros pode causar a sua rápida evaporação, principalmente durante a etapa de processamento (GIANNAKAS, 2020; GIANNAKAS et al., 2017). A liberação mais lenta desses compostos voláteis é atribuída à formação de novos sítios difusionais quando o argilomineral é disperso no polímero, formando nanocompósitos intercalados e, principalmente, esfoliados (AZEREDO, 2009; CAMPOS-REQUENA et al., 2015, 2016; DAIRI et al., 2019; ROJAS et al., 2017). Uma ilustração dos diferentes tipos de nanocompósitos polímero/argila é apresentada na Figura 2-7.

Figura 2-7: Tipos de compósitos derivados da interação polímero/Mt que podem aumentar a difusão de óleos essenciais: a) Nanocompósito intercalado e b) Nanocompósito exfoliado.



Fonte: Próprio autor.

2.2.2.3 Aplicações do híbrido OEs/Mt

A significativa bioatividade dos OEs pode proporcionar várias aplicações dependendo do sistema OE/Mt. Na Tabela 2-2, podem ser observados várias aplicações para esse sistema, como atividade antibacteriana, atividade antifúngica *in vitro*, repelente/inseticida e como embalagem ativa de alimentos. Aqui, a ênfase será dada na atividade antibacteriana.

A resistência microbiana tem sido estudada nas últimas décadas (OWEN; LAIRD, 2018), tendo em vista a resistência dos micróbios à antibióticos ou medicamentos antimicrobianos comumente usados (YU et al., 2020), o que pode causar sérios danos à saúde dos seres vivos, principalmente dos seres humanos, sendo considerada uma das maiores ameaças à saúde global (OWEN; LAIRD, 2018). Assim, estudos de novos sistemas que possam atuar como agentes antimicrobianos vêm sendo realizados, incluindo os sistemas contendo OEs/Mt. Bernardos et al. (2019) avaliaram a adsorção de componentes de OEs (Isotiocianato de alila, carvacrol, *trans*-cinamaldeído, dissulfeto de dialilo, eugenol e timol) em bentonita. Os componentes orgânicos incorporados na argila permaneceram com boa bioatividade mesmo após 10 dias de testes, principalmente para timol, carvacrol e eugenol contra *Aspergillus niger* (MICs de 512, 512 e 1024 µg/mL, respectivamente). Os autores ainda observaram uma menor evaporação dos compostos orgânicos intercalados na bentonita a 25 e 37 °C em relação aos compostos em sua forma livre, indicando efetiva participação da argila, tanto na manutenção da bioatividade quanto na menor difusão dos compostos.

Tabela 2-2: Sistemas contendo OEs/Mt e suas aplicações.

Material	OEs/ componentes de OEs	Aplicação	Organismo alvo	Ref.
Mt	OEs de <i>Curcuma aromatica</i> e <i>Zanthoxylum limonella</i>	Antibacteriana e inseticida	inseto: <i>Aedes albopictus</i> Bactéria: <i>P. aeruginosa</i> e <i>B. subtilis</i>	(PRAMANIK et al., 2015)
Na-Mt modificada com lecitina	Componentes de OEs: Citronelol, citral e linalol	Antifúngica e como componente de tinta	Fungo: <i>C. globosum</i> , <i>A. alternata</i> e <i>A. fumigatus</i>	(FERNÁNDEZ et al., 2020)
Bent	Componentes de OEs: Isotiocianato de alila, carvacrol, trans-cinamaldeído, dissulfeto de dialilo, eugenol e timol		Fungo: <i>A. niger</i> and bactéria: <i>S. aureus</i>	(BERNARDOS et al., 2019)
Nanocompósito Alginato/Mt	Óleo de limão		Bactéria: <i>S. aureus</i> ; <i>S. enteritidis</i> ; <i>E. coli</i> e <i>B. cereus</i> ; Fungos: <i>A. baraziliensens</i> e <i>C. albicans</i>	(HAMMOUDI et al., 2020)
Filme nanocompósito de Acetato de celulose /Mt Cloisita®30B	Componentes de OE: Carvacrol e cinamaldeído		Bactéria: <i>L. innocua</i> and <i>E. coli</i> . Fungo: <i>S. cerevisiae</i>	(QUINTERO et al., 2014)
Filme nanocompósito a base de LDPE/ Mt Dellite®72T	Componente de OEs: Carvacrol	Antimicrobiana	Bactéria: <i>E. coli</i> e <i>L. innocua</i> ; fungo: <i>A. alternata</i>	(SHEMESH et al., 2015a)
Filme nanocompósito a base de Acetato de celulose/AgNP-MtGe	Componente de OEs: Timol		Bactéria: <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. entérica</i> , <i>S. aureus</i> e fungos: <i>A. Niger</i> e <i>A. Flavus</i>	(DAIRI et al., 2019)
Filme nanocompósito a base de Metilcelulose/Mt			<i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i>	(TUNÇ; DUMAN, 2011)
Nanocompósito LDPE/ Mt (Cloisita Na, Cloisita 10A, Cloisita 15A, Cloisita 20A, Nanomer I30P, Nanomer I44PA e Dellite 72T.	Componente de OEs: Carvacrol		<i>E. coli</i>	(SHEMESH et al., 2015b)
Filme nanocompósito a base de Amido/Na-Bent	OEs de Canela		<i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> and <i>S. aureus</i>	(IAMAREERAT et al., 2018)
Nanocompósito Alginato/Mt	OEs de <i>Origanum majorana</i>	Antibacteriana	<i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , e <i>B. cereus</i>	(ALBOOFETILEH et al., 2018)
Nanocompósito Quitosana/Mt	OEs de gengibre e alecrim		<i>E. faecalis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureuse</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	(SOUZA et al., 2019c)

Filme nanocompósito a base de Kappa-caragenina/Mt (Cloisite Na)	OEs de <i>Zataria multiflora boiss</i>		<i>S. aureus, B. cereus, E. coli, P. aeruginosa e S. typhimurium</i>	(SHOJAEE-ALIABADI et al., 2014)
Nanocompósito PLA/Mt Cloisite®30B	Componentes de OEs: Timol e Cinamaldeído		<i>E. coli e S. aureus</i>	(VILLEGAS et al., 2019)
Filme nanocompósito a base de Alginato/Na-Mt	OEs de cravo, cominho, alcavaria, majerona, canela e Coentro		<i>E. coli, S. aureus e L. monocytogenes</i>	(ALBOOFETILEH et al., 2014)
Mt	OEs de <i>Clausena anisata</i>		<i>Acanthoscelides obtectus</i> (Say)	(NDOMO et al., 2008)
Na-Mt e CTMA-Mt	OEs de <i>Ocimum gratissimum</i>	Inseticida	<i>Sitophilus zeamais</i>	(NGUEMTCHOUIN et al., 2013)
Nanocompósito Bent/PVP	OEs de <i>Syzygium aromaticum</i>		<i>Aedes aegypti</i>	(SANTOS et al., 2020)
Filme nanocompósito LPDE/Mt Nanomer® I44P		Filmes ativos para recobrimento de comida (morango)	Fungo: <i>B. cinerea</i>	CAMPOS-REQUENA et al., 2015)
Filme nanocompósito a base de Amido/Na-Mt	Componentes de OEs: Carvacrol e Timol		Fungo: <i>B. cinerea</i>	(CAMPOS-REQUENA et al., 2017)
Nanocompósito Quitosana/Na-Mt	OEs de gengibre			(SOUZA et al., 2018)
Nanocompósito quitosana/Montmorillonitas (Mt, Cloisite Na e Cloisite Ca)	OEs de alecrim e gengibre	Filmes ativos para recobrimento de comida (frango)	Bacterias aerobicas mesofílas e coliformes	(PIRES; DE SOUZA; FERNANDO, 2018)
Filme nanocompósito a base de Quitosana/Na-Mt e Org-Mt	OEs de Tomilho		Bacteria: <i>E. coli</i>	(GIANNAKAS et al., 2020)
Nanocompósito LDPE/Mt e LDPE/Haloisita	Componentes de OEs: Timol, Eugenol e Carvacrol	Filmes ativos para recobrimento de comida (carne)	<i>E. coli</i> O157: H7, bacteria aerobica mesofila, bactérias ácido láctica, levedura, bolor e <i>Enterobacteriaceae</i>	(TORNUK et al., 2015)
Nanocompósito Quitosana/Mt	OEs de Alecrim	Recobrimento de peixe	Bactéria psicotrófica	(ABDOLLAHI; REZAEI; FARZI, 2014)

Mt: montmorillonita; Na-Mt: montmorillonita sódica; Org-Mt: Montmorillonita comercial organomodificada com (C14-18); Bent: Bentonita; Na-Bent: Bentonita sódica; LDPE: Polietileno de baixa densidade; Dellite®72T: Montmorillonita modificada com sais quaternários de amônio; AgNP: nanoparticular de prata; MtGe: montmorillonita modificada com gelatina; PLA: poli(ácido láctico); Cloisite®30B: Bentonita comercial modificada com sal quaternário de amônio; Cloisite 20A: Bentonita comercial modificada com sal quaternário de amônio; Cloisite 10A: Bentonita comercial modificada com sal quaternário de amônio; Cloisite 15A: Bentonita comercial modificada com sal quaternário de amônio; Nanomer I30P: Montmorillonita comercial modificada com sal quaternário de amônio; Nanomer I44PA: Montmorillonita comercial modificada com sal quaternário de amônio; PVP: Polivinilpirrolidona.

Recentemente, Fernández et al. (2020) modificaram Na-Mt com leticina de soja, para adsorção de um entre os três terpenóides comerciais escolhidos: citronelol (Col), citral (Cal) e linalol (Lol) que podem ser extraídos a partir de óleos de plantas do gênero *Cymbopogon*. O Col foi o utilizado já que apresentou maior atividade (concentração de 1,2 mg/mL foi suficiente para inibir em 100% o crescimento) contra a fungos das espécies *Chaetomium globosum* e *Alternaria alternata*. Assim, foram formados híbridos Mt/Col a partir de Na-Mt e organoflizada S-Mt) em diferentes concentrações de Col (2,5; 5; 10 e 20% em massa). Além disso, mais dois híbridos de intercalação obtidos com 40% em peso de Col em Mt foram sintetizados sendo obtidos por duas rotas: um sistema em que o Col foi intercalado na S-Mt (S-Mt40A) e uma segunda rota em que ambos, surfactante e o Col (S-Mt40B), reagiram *in situ* com a Mt simultaneamente. Os híbridos foram os mais eficazes contra os fungos já citados, sendo que o S-Mt40B foi o mais promissor mantendo sua atividade antifúngica após 6 dias de teste de difusão em ágar.

Outros nanocompósitos polímeros/Mt foram investigados também nessas aplicações. Por exemplo, Tunç e Duman (2011) estudaram o potencial antimicrobiano do nanobiocompósito à base metilcelulose/carvacrol/Mt e a liberação controlada do carvacrol com o aumento da concentração de Mt no sistema. Foi observado que além da capacidade antibacteriana (0.65 log CFU/mL para *E. coli* e 0.70 log CFU/mL *S. aureus*), que houve um aumento estabilidade térmica no sistema e uma gradativa liberação do óleo essencial com maior quantidade do argilomineral na formulação do nanocompósito.

Em outro trabalho, Shojaee-Aliabadi et al. (2014), investigaram as propriedades físicas, mecânicas, permeabilidade ao vapor de água, além da atividade antibacteriana de filmes nanocompósitos de kappa-carragenana (KC)/Cloisita-Na/Óleo essencial de *Zataria multiflora* Boiss (ZEO). As propriedades dos filmes nanocompósitos foram influenciadas pelo teor de argila, sendo observadas melhores propriedades físicas, mecânicas e de permeabilidade ao vapor de água em relação aos filmes de KC puros. Com a incorporação do ZEO (3% em volume) no sistema, houve acentuada melhora da atividade antibacteriana. Foi observado que houve a inibição do crescimento de todas as bactérias testadas, cujos valores de halo de inibição foram de 226.9, 232.8, 176.2, 150 e 30 mm² contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente.

Alboofetileh et al. (2014) investigaram a incorporação de OEs de manjerona, cravo e canela em filme nanocompósito de alginato/Mt, sendo também avaliada a eficácia antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*

durante 12 dias, em placas de Petri, em meio TSA-NaCl, armazenados a 10 °C. Esses óleos essenciais foram escolhidos devido ao melhor desempenho entre outros óleos contra esses mesmos micro-organismos. Os filmes contendo OE de manjerona mostraram melhores resultados na inibição do crescimento de todos os patógenos, principalmente quando foi usada nos testes a maior concentração do óleo (1.5% m/v com base na solução do filme puro), ocorrendo inibição total do crescimento dessas bactérias durante todo período de armazenamento.

Em um trabalho recente, Souza et al. (2019c) desenvolveram filmes bionanocompósitos à base de quitosana/Mt e incorporados com dois OE, alecrim (REO) e gengibre (GEO), e avaliaram suas propriedades antimicrobianas em ensaios *in vitro* contra bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). A liberação de GEO foi acelerada em simulador etanol a 95%, e que formulações com Mt diminuíram a liberação de compostos ativos dos filmes incorporados com REO, enquanto os filmes incorporados ao GEO facilitaram a migração. Além disso, para a atividade antibacteriana, foi observado maior redução logarítmica em filmes com 2% de GEO + Mt contra *Staphylococcus aureus* (7.9) e 2% de REO + Mt contra *Listeria monocytogenes* (7.7).

2.2.3 Incorporação de clorexidina em Mt

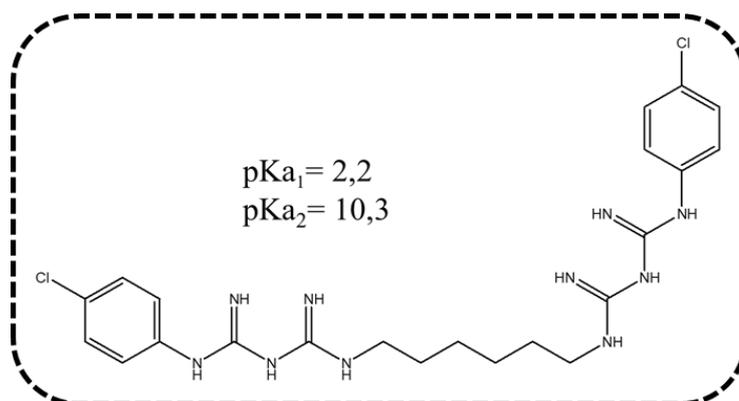
A clorexidina é uma das moléculas de maior eficiência na atuação como desinfetante e antisséptico pois possui excelente ação antifúngica, bactericida de amplo espectro (capaz de eliminar tanto bactérias gram-positivas quanto gram-negativas) e bacteriostática (inibindo a proliferação bacteriana) (AGARWAL et al., 2012; ECHAGUE; HAIR; CUNNION, 2010; SUN et al., 2018). Definida como uma biguanida catiônica, a clorexidrina foi sintetizada pela primeira vez na década de 50 para atuar como agente antibacteriano (ROSE; SWAIN, 1956).

Nos últimos anos, o uso de clorexidina tem sido cada vez mais comum em diferentes áreas, estando presente frequentemente em diversas formulações, como enxaguante bucal, géis, preparação galênicas, cremes ou dentifrícios (FIORILLO, 2019). As inúmeras composições refletem em diversas aplicações e nos diferentes campos de uso, principalmente na área da saúde humana (FIORILLO, 2019; GUPTA et al., 2018; HEWITT et al., 2020; KAMPF, 2019), e animal (CARVALHO et al., 2020; STROH et al., 2010; VISWANATHAN et al., 2016).

Estruturalmente, a clorexidina, Figura 2-8, é composta por grupamentos biguanidas conectados por uma cadeia de hexametileno, tendo em seus extremos anéis clorofenólicos. Esta

molécula, que é catiônica em pH fisiológico, é uma base quase insolúvel em água, sendo vendida principalmente em sua forma de digluconato de clorexidina, mas também pode ser encontrada nas formas de acetato de clorexidina e cloridrato de clorexidina (AGARWAL et al., 2012; DUPONT et al., 2008; PERARO et al., 2020; SUN et al., 2018). Na forma de digluconato de clorexidina, por exemplo, é comercializado uma solução aquosa, que contém não menos que 19% (190 g/L) e não mais que 21% (210 g/L) de digluconato de clorexidina.

Figura 2-8: Estrutura da clorexidina.



Fonte: Próprio autor.

Quando utilizada em baixas concentrações de clorexidina (0,02 – 0,06%), o efeito bacteriostático é atuante, causado pelo deslocamento de Ca^{2+} , Mg^{2+} e perda de K^{+} da parede celular (BROOKES et al., 2020; CIEPLIK et al., 2019). Em concentração acima de 0,1%, a intensa ação antimicrobiana (bactericida) da clorexidrina é atribuída aos dois grupos clorofenil e bisguanida, que dispostos simetricamente permitem que essa molécula penetre na parede celular microbiana e rompa de maneira irreversível a membrana celular, matando assim o micro-organismo gradualmente e de maneira eficaz (BROOKES et al., 2020; LUO et al., 2016; PERARO et al., 2020; TABARY et al., 2014).

De fato, a clorexidina (molécula com carga positiva em ampla faixa de pH) interage com argila/argilominerais, atribuída à carga negativa da matriz do silicato, presença de grupos reativos em sua superfície e possibilidade de incorporar moléculas na região interlamelar. Entre os argilominerais que já foram estudados para incorporação da clorexidina estão a caulinita (ISAH et al., 2020; JOU; MALEK, 2016), vermiculita (HOLEŠOVÁ et al., 2013, 2014), haloisita (WU et al., 2017), laponita (PERARO et al., 2020) e paligorsquita (LOBATO-AGUILAR et al., 2018, 2020). Em relação a Mt, um sumário dos estudos com clorexidina é apresentado na Tabela 2-3.

Tabela 2-3: Híbridos Clorexidina/Mt e suas aplicações.

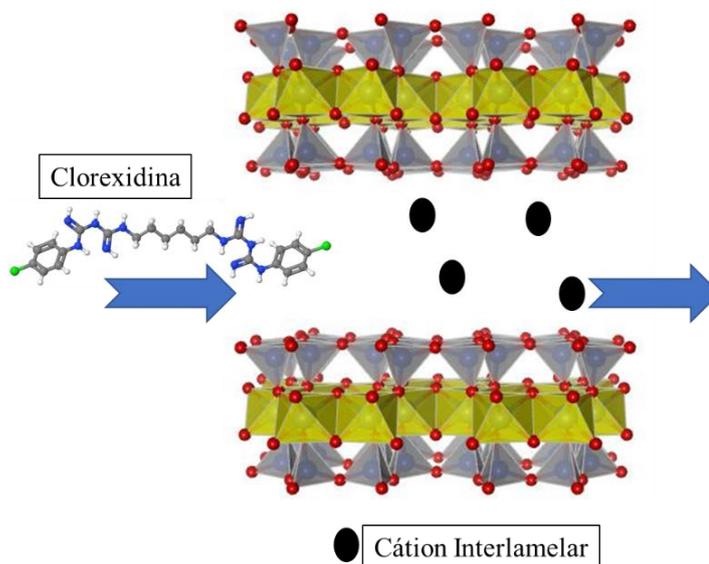
Material	Clorexidina	Tipos de interação	Quantidade incorporada	Organismo alvo	Ref.		
Ca-Mt	Acetato de clorexidina	Troca iônica	18,95% ^a	Bactéria: <i>E. coli</i>	(HE et al., 2006)		
Na-Mt e Ca-Mt			19.10% ^a e 16.26% ^a para Na-Mt e Ca-Mt, respectivamente.		(YANG et al., 2007)		
Na-Mt			32.6% ^a	Bactéria: <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i>	(MENG et al., 2009a)		
Nanocompósito de PDMS/Na-Mt				Bactéria: <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	(MENG et al., 2009b)		
Na-Mt			24% ^a		(SAHA; BUTOLA; JOSHI, 2014)		
Na-Mt			32.6% ^a	Bactéria: <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> ; Fungo: <i>C. albicans</i>	(SUN et al., 2018)		
Nanocompósito de polietileno/Mt				-	Bactéria: <i>E. coli</i>	(ZHANG et al., 2018)	
Nanocompósito de poliuretano/Mt				11,4% ^a	Bactéria: <i>S. epidermidis</i>	(FONG; SIMMONS; POOLE-WARREN, 2010) (FONG; POOLE-WARREN; SIMMONS, 2013)	
Mt e Pal			Diacetato de clorexidina		22,5% ^a para Mt e 15,2% ^a para Pal	Bactéria: <i>E. coli</i>	(LOBATO-AGUILAR et al., 2020)
Ca-Mt e Mg-Ver					-	Bactéria: <i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	(HOLEŠOVÁ et al., 2013)
Na-Mt e Na-Ver		-		Bactéria: <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> ; Fungo: <i>C. albicans</i>	(PAZOURKOVÁ et al., 2019)		
Mt		-		Bactérias: <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	(WU et al., 2013)		
Nanocompósito de quitosana/Mt		32% ^a e 27% ^b		Bactérias: <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>P. aeruginosa</i> ; Fungo: <i>C. albicans</i> .	(AMBROGI et al., 2017)		
Dellite 67G		-		-	(DE MENEZES et al., 2019)		
Na-Mt e β ciclodextrina		-	-	(PUPE et al., 2011)			
Mt	Gluconato de clorexidina	Troca iônica e ligação de hidrogênio	175.5 ^b	-	(BELLO et al., 2015)		
Nanocompósito de quitosana/Mt	Digluconato de clorexidina		-	Bactéria: <i>S. aureus</i>	(ONNAINTY et al., 2016)		

a: quantificado por termogravimetria; **b:** quantificado por Uv-Vis; Ca-Mt: Montmorillonita trocada com cálcio; Na-Mt: Montmorillonita trocada com sódio; Pal: Paligorsquita;

Ver: Vermiculita; PDMS: Dimetil polissiloxano; Dellite 67G: Montmorillonita comercial modificada com sais quaternários de amônio.

O principal mecanismo de interação para a formação do híbrido clorexidina/Mt, trata-se majoritariamente de uma reação de troca iônica, em que há a entrada da clorexidina protonada na região interlamelar, e a saída dos cátions interlamelares, Figura 2-9 (LOBATO-AGUILAR et al., 2020; PERARO et al., 2020). Por exemplo, He et al. (2006) investigaram a incorporação de acetato de clorexidina em Mt, variando a quantidade de clorexidina em relação a CTC (0,2 a 4 vezes) do argilomineral. Os resultados de difração de raios X indicaram que a intercalação da clorexidina em monocamada para os sistemas com maior quantidade do fármaco, com quantidade máxima de incorporação de 18,95% em massa, calculado por termogravimetria. Os resultados da ação antibacteriana (teste do halo) contra *E. coli*, mostraram que a inibição depende da concentração da clorexidina incorporada, sendo os melhores resultados para os sistemas com maior quantidade de clorexidina.

Figura 2-9: Mecanismo de interação entre clorexidina e Mt (troca iônica).



Fonte: Próprio autor.

Em outro trabalho, Meng et al. (2009a) avaliaram a liberação de clorexidina do sistema Clorexidina/Mt em sacos de diálise, em que o meio de liberação foi tampão fosfato a pH 7,4. A incorporação da clorexidina no argilomineral ocorreu em relação massa/massa, sendo observado a maior incorporação e maior valor do espaçamento basal ocorreu para uma proporção 2:1 de Clorexidina/Mt. A atividade bacteriana desse sólido contra *P. aeruginosa* e *S. aureus* foi efetiva, mostrando zona de inibição em 21,4 e 24,5 mm, respectivamente. Para a liberação da clorexidina, os autores indicaram o mecanismo de troca iônica com outros cátions. Uma lenta e contínua liberação foi observada até 72 h, com apenas 24% da clorexidina liberada durante as primeiras 24 h.

Lobato-Aguilar et al. (2018) estudaram a incorporação de diacetato de clorexidina em Mt e paligorsquita, assim como a liberação dessa molécula em meio tamponado com PBS a pH 7,3, durante 24 h. Maiores quantidades de clorexidina foram incorporadas na Mt (22,5% em massa) em relação a paligorsquita (12,5% em massa), devido à maior CTC da Mt. Os autores observaram um perfil de liberação da clorexidina semelhante para ambos os sólidos, mantendo-se constante após 5 h. Posteriormente, os mesmos autores (LOBATO-AGUILAR et al., 2020), avaliaram a atividade antibacteriana desses sólidos contra a *E. coli* pelo teste de halo, cujo diâmetro de inibição foi maior para o híbrido clorexidina/Mt (2,39 mm), cujo híbrido foi obtido com 200% da CTC do argilomineral.

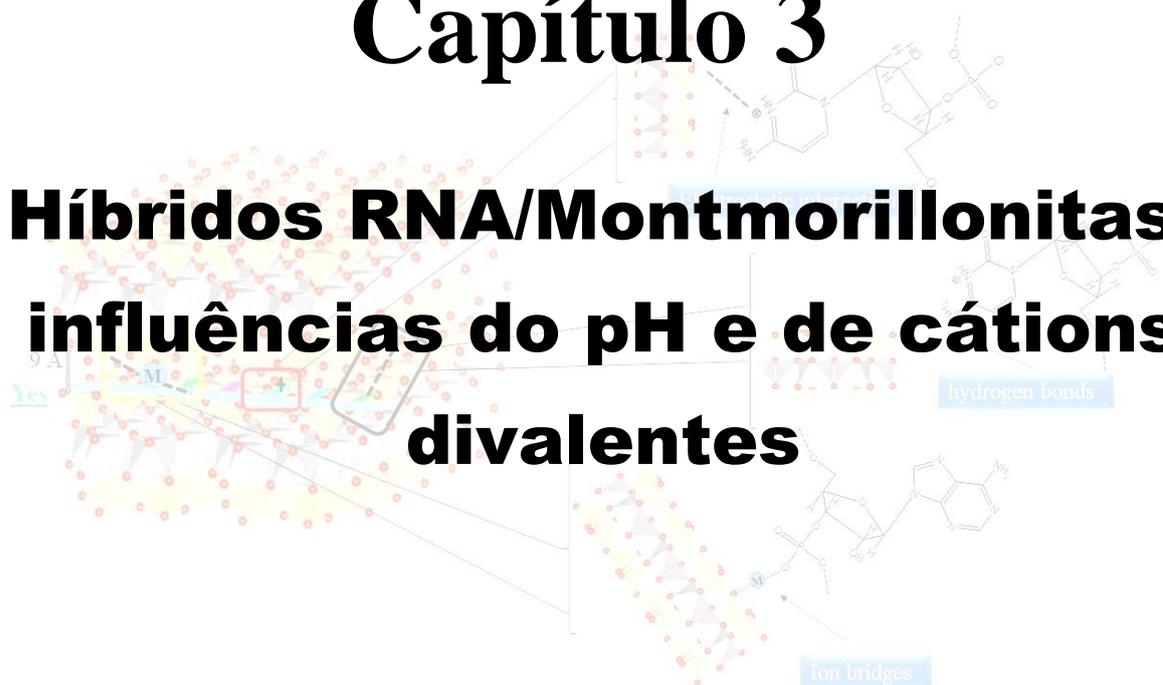
Em outro trabalho, Sun et al. (2018) estudaram a intercalação conjunta de acetato de clorexidina e cloridrato de terbinafina em Mt sódica, avaliando a liberação e ação antibacteriana contra vários micro-organismos (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*). Os resultados de difração de raios X indicaram intercalação de ambas as moléculas na região interlamelar, alcançando um valor de d_{001} de 2,97 nm e quantidade incorporada dos fármacos em torno de 39% em massa. No ensaio de liberação, foram observadas mudanças na tendência de liberação das drogas e na quantidade liberada sendo de 35% nas primeiras 24 h, para os sólidos contendo as duas drogas em relação aos que continham apenas uma. A atividade antimicrobiana determinada pelo método do halo indicou os diâmetros de inibição de 21,42; 21,42; 21,42 e 18,34 mm para *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, respectivamente.

Com o objetivo de intensificar o potencial antibacteriano, Wu et al. (2013) formaram nanocompósito de clorexidina e cobre intercalados em Mt. Inicialmente, os autores reagiram a clorexidina com cobre e o produto posteriormente interagiu com a Mt. A lenta e contínua liberação do complexo clorexidina/Cu em até 288 h e a efetiva atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus* (diâmetro de inibição 23 e 28 mm, respectivamente) indicaram a eficácia desse sistema.

A utilização de nanocompósitos polímero/Mt para a incorporação de acetato de clorexidina foi também avaliada. A exemplo, Fong et al. (2010) avaliaram a eficácia da atividade antibacteriana pelo teste de adesão contra *S. epidermidis* usando um nanocompósito à base de poliuretano/clorexidina/Mt. Composições de clorexidrina em Mt nas proporções de 110, 200 e 300 da CTC foram verificadas. No teste antimicrobiano, o nanocompósito, com maior quantidade de clorexidina (11,4% em massa), foi o mais eficaz na redução da adesão bacteriana.

Capítulo 3

Híbridos RNA/Montmorillonitas: influências do pH e de cátions divalentes



3.1 Introdução

As interações entre biomoléculas e argilominerais são fundamentais para diferentes campos, como processos de separação e nanomateriais híbridos. Entre os argilominerais, as Mts, pertencentes ao grupo das esmectitas, apresentam estrutura em camadas do tipo 2:1, cargas superficiais negativas, contrabalanceadas por cátions presentes na região interlamelar, elevada área superficial interna, capacidade de troca catiônica e grupos reativos em suas superfícies, além de possuir a habilidade de confinar moléculas em seu espaço interlamelar (JABER; MIEHÉ-BRENDLÉ, 2008; WU; LIAO; LV, 2015). Essas propriedades intrínsecas, aliadas a relatos da presença desse silicato há bilhões de anos fazem dele um possível “hospedeiro” de biomoléculas como o RNA (JAMES CLEAVES et al., 2012).

Os mecanismos de interação para as bases nitrogenadas, nucleotídeos e RNA com Mt foram revisados e ambas atrações eletrostáticas e ligações de hidrogênio desempenham um significativo papel na formação de híbridos entre essas espécies (YU et al., 2013). Alguns estudos sugeriram a participação dos cátions interlamelares como uma “ponte” para interação entre a superfície da argila, carregada negativamente, e o grupo fosfato do RNA, que também carrega uma carga negativa (FRANCHI; FERRIS; GALLORI, 2003; HAO et al., 2019; PEDREIRA-SEGADE et al., 2018). Foi observado que cátions de metais alcalino-terrosos aumentam fortemente a adsorção de RNA de fita simples (mas não de fita dupla) em Mt (GUJJARI et al., 2018). Estudos sugerem a provável presença desses cátions metálicos em rochas e oceanos primitivos (EDER; RODE, 1994; IZAWA et al., 2010). Eles são importantes para o dobramento, estrutura e função do RNA, especialmente o íon divalente Mg^{2+} (LEONARSKI; D’ASCENZO; AUFFINGER, 2017; PYLE, 2002), e seu envolvimento foi sugerido na estabilização e/ou ativação de macromoléculas biológicas (BLACK; HUANG; COWAN, 1994). Villafañe-Barajas et al. (2018) também sublinharam a importância de cátions adicionados para a adsorção de nucleotídeos, os monômeros de RNA; e estudos de modelagem molecular (CARRASCOZA MAYÉN et al., 2019) sugerem que eles podem desempenhar um papel significativo na reatividade das moléculas orgânicas adsorvidas.

O pH é um parâmetro chave que controla a adsorção de biomoléculas, uma vez que se espera que a especiação ácido-básica controle a interação eletrostática entre o RNA e a superfície do argilomineral (LAWLESS et al., 1985; THENG, 1982). Embora nos últimos anos alguns estudos tenham abordado a interação de bases nitrogenadas (HASHIZUME; VAN DER GAAST; THENG, 2010), nucleotídeos (HAO et al., 2019; PEDREIRA-SEGADE et al., 2016)

e mais raramente nucleosídeos (FORNARO et al., 2018b) com Mt variando o pH e a presença de cátions metálicos, tentando elucidar os tipos de interação entre essas moléculas e a Mt, as interações do RNA polimérico com a superfície de argilominerais ainda são pouco estudadas, principalmente por estudos em nível molecular. Nessa perspectiva, o objetivo deste estudo foi avaliar a adsorção de RNA (sal de dietilaminoetanol do ácido ribonucléico) na Mt e contribuir para a compreensão de um quebra-cabeça maior que envolve a origem da vida. As interações orgânico-inorgânicas foram investigadas em nível molecular e a influência de diferentes parâmetros como a natureza do cátion intercalar (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Sr^{2+}) e o pH foram avaliados.

3.2 Parte experimental

3.2.1 Reagentes químicos

Os reagentes usados estão descritos na Tabela 3-1 e foram obtidos comercialmente em grau analítico e utilizados sem purificação prévia.

Tabela 3-1: Fórmulas moleculares e dados de pureza dos reagentes químicos utilizados.

Reagentes	Fórmula molecular	Fabricante	Pureza (%)
Cloreto de cálcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich	99
Cloreto de magnésio	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Nuclear	99
Nitrato de estrôncio	$\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$	Sigma-Aldrich	99
Ácido clorídrico	HCl	Vetec	37
Sal dietilaminoetanol de ácido Ribonucleico (sal de RNA) de levedura torula tipo IX	-	Sigma-Aldrich	-

3.2.2 Mt sódica

A Mt sódica (Na-Mt) usada nesse trabalho foi fornecida pela Université Pierre et Marie Curie, sintetizada pelo método hidrotermal seguindo a metodologia descrita na literatura (JABER et al., 2014; TRIGUEIRO et al., 2018a). O sólido produzido apresentou capacidade de troca catiônica de $0,38 \text{ mmol g}^{-1}$.

3.2.3 Troca iônica

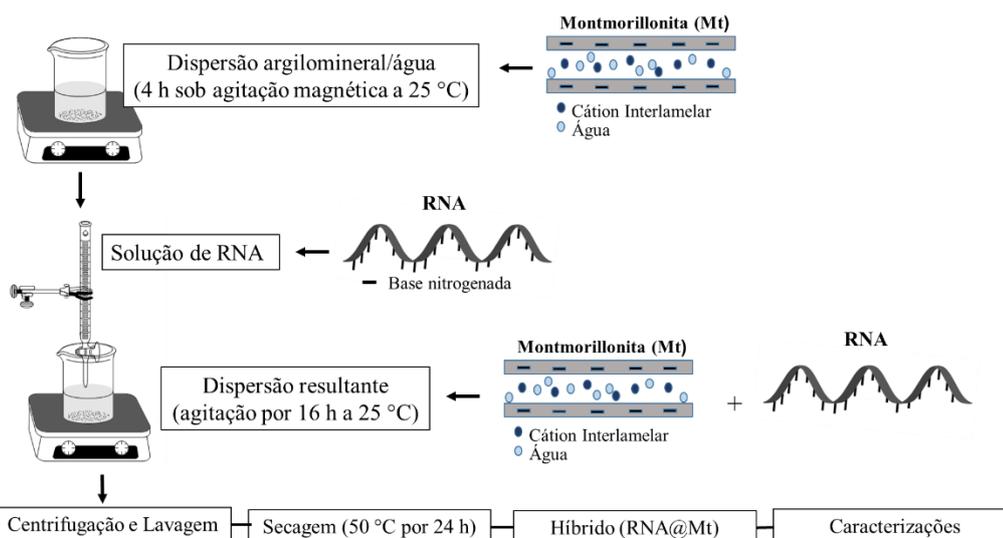
A reação de troca iônica na Na-Mt sintética ocorreu conforme a literatura (LEPOITEVIN et al., 2014). Em cada ensaio, 2 g da amostra Na-Mt foi dispersa em 200 mL das soluções de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ na concentração de 1 mol L^{-1} durante 24

h e foram mantidas sob agitação magnética a 25 °C. Em seguida, o material obtido foi centrifugado, lavado com água destilada e submetido ao processo de troca iônica por mais duas vezes nas respectivas soluções salinas. Posteriormente, os sólidos foram lavados com água destilada e secos a 50 °C e denominados Ca-Mt, Mg-Mt e Sr-Mt.

3.2.4 Adsorção do derivado do RNA em Mt

A adsorção da molécula derivada do RNA nas Mts seguiu a metodologia de (GREAVES; WILSON, 1969) com algumas modificações. Inicialmente, as argilas (Na-Mt, Ca-Mt, Mg-Mt e Sr-Mt) foram dispersas em água destilada em concentração de 1,25 mg mL⁻¹ por um período de 4 h sob agitação magnética a 25 °C. Em todos os casos, o pH da dispersão do argilomineral foi em torno de 5,0. Então, 250 mL da solução de RNA em pH 6,8 na concentração de 1 mg mL⁻¹ foi vagarosamente adicionada. Após esse processo, o pH de todos os sistemas foi entre 6,2-6,5 sem qualquer ajuste de pH. Os sistemas foram mantidos sob agitação magnética por 16 h a 25 °C. O mesmo procedimento foi também realizado em pH 2,9-3,1 para todos os sistemas, ajustados com solução 0,5 mol L⁻¹ de HCl. As amostras resultantes foram centrifugadas, lavadas com água destilada e secas a 50 °C por 24 h, sendo os sólidos, por fim, caracterizados. Os produtos obtidos foram nomeados como RNA@Na-Mt, RNA@Ca-Mt, RNA@Mg-Mt e RNA@Sr-Mt. Um resumo de todo processo reacional pode ser observado na Figura 3-1.

Figura 3-1: Esquema de reação de adsorção do RNA em Mt e obtenção do híbrido RNA/Mt.



Fonte: Próprio autor.

3.3 Técnicas de caracterização

3.3.1 Difração de raios-X (DRX)

As análises de difração de raios X (DRX) foram realizadas no Núcleo de Pesquisa e Extensão Laboratório de Combustíveis e Materiais (NPE-Lacom - UFPB), em um difratômetro de raios X modelo XRD-6000, marca SHIMADZU, utilizando como fonte de radiação $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 0,15406 \text{ nm}$), operando em uma potência de 2 kVA, voltagem de 40 kV e corrente de 30 mA. Foram realizadas varreduras no intervalo de 2θ entre 3 e 80° , com um passo de $0,02^\circ$ e velocidade de $0,5^\circ \text{ min}^{-1}$.

3.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Laboratório de Materiais Avançados (Limav - UFPI), utilizando um FEI/Thermo Fischer, modelo Quanta FEG 250 com canhão por campo e tensão de aceleração de 1 a 30 kV. As amostras foram fixadas em fita de carbono e revestidas com ouro em um dispositivo de revestimento por pulverização catódica Quorum modelo Q150R por 35 s a 20 mA por um plasma gerado sob uma atmosfera de argônio.

3.3.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de absorção da região do infravermelho foram obtidos no Núcleo de Pesquisa e Extensão Laboratório de Combustíveis e Materiais (NPE-Lacom - UFPB), em um espectrômetro modelo PRESTIGE – 21, da marca SHIMADZU pela técnica da pastilha de KBr, na proporção em massa de 1:100 de KBr. A varredura foi na região de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, com resolução de 4 cm^{-1} e 30 scans de acumulação.

3.3.5 Análise termogravimétrica (TG/DTG)

A análise termogravimétrica foi realizada no Laboratório de Materiais Avançados (Limav - UFPI), em um equipamento da TA Instruments modelo SDT Q600. Os materiais, por volta de 10 mg, foram aquecidos a uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ até uma temperatura de 1000°C em atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 100 mL min^{-1} , utilizando cadinho de alumina.

3.3.6 Ressonância magnética nuclear de ^{27}Al , ^{13}C e ^{31}P no estado sólido

Os espectros de MAS-RMN de ^{31}P , CP/MAS RMN de ^{13}C e MAS-RMN ^{27}Al no estado sólido foram obtidos através do Laboratório de Arqueologia Molecular e Estrutural (LAMS - Sorbonne Université), em um espectrômetro Bruker Avance III equipado com uma sonda HX de 4 mm, operando em frequência de 500,17 MHz (^1H), 202,47 MHz (^{31}P), 125,77 MHz (^{13}C) e 130,33 MHz (^{27}Al), com base em estudos anteriores (CAVALCANTI et al., 2021; GUILLERMIN et al., 2019). Os deslocamentos químicos foram calibrados usando a trifenilfosfina para ^{31}P , o sinal de carboxila de adamantano para ^{13}C e AlNO_3 para ^{27}Al como padrão externo. Todos os espectros foram registrados com uma taxa de rotação de 14 kHz. Os espectros de ^{13}C foram adquiridos com um tempo de contato rampa-CP de 2 ms e um retardo de reciclagem de 1,5 s e com desacoplamento 64 de ^1H . O tempo de aquisição foi de 40 ms. O número de varreduras para obter os espectros dependeu do S/N obtido para cada amostra. Os espectros foram processados com um fator de preenchimento zero de 2 e com um decaimento exponencial correspondente a um alargamento da linha de 50 Hz nos espectros transformados. Apenas espectros com o mesmo alargamento de linha são comparados diretamente. Experimentos de ^{27}Al usando pulso de 30° foram registrados com largura espectral de 100 kHz e com atraso de reciclagem de 500 ms. Os experimentos de ^{31}P usando 90° foram adquiridos com 5 s de atraso de ciclo e com um sinal de desacoplamento de ^1H 64.

3.4 Resultados e Discussão

Nessa seção será dada ênfase à caracterização estrutural dos sistemas obtidos. Nesse sentido o entendimento das alterações a longo e curto alcance foram investigados por técnicas de difração de raios X e espectroscópicas (FTIR e RMN de ^{27}Al , ^{13}C e ^{31}P), respectivamente. Além disso, as medidas de termogravimetria permitiram quantificar os teores de RNA incorporados, enquanto que medidas de microscopia eletrônica de varredura averiguaram se aconteceram alterações na morfologia dos diversos sistemas.

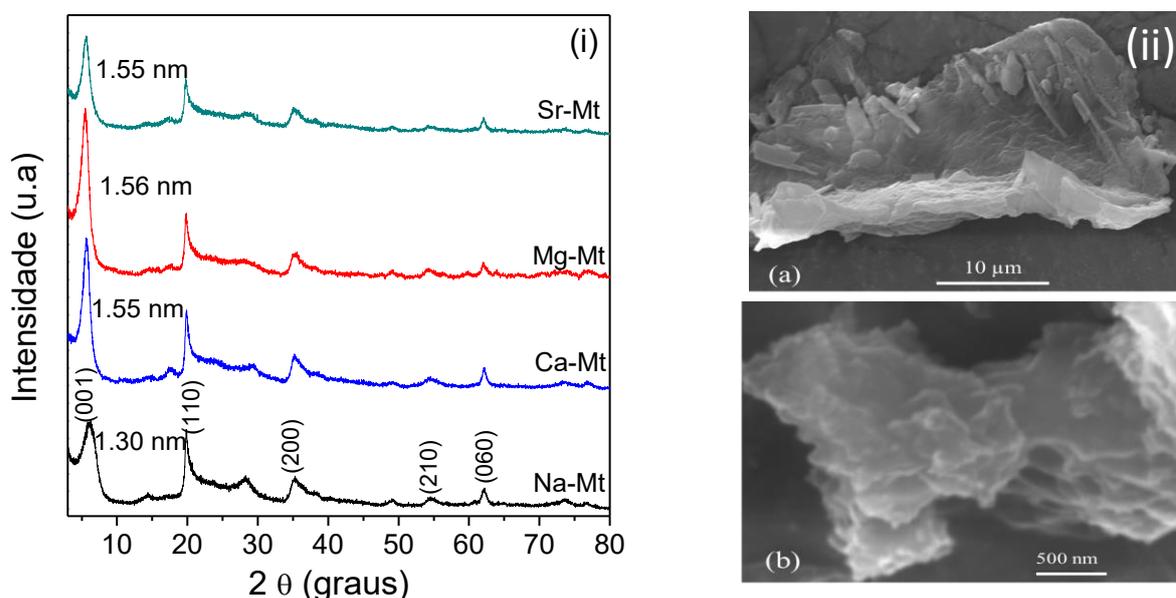
3.4.1 Difração de raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X da Mt sódica (Na-Mt), das Mts obtidas pela troca iônica e dos híbridos RNA@Mt são mostrados nas Figuras 3-2 e 3-3. Para a amostra Na-Mt, o difratograma mostra picos de reflexão característicos de uma esmectita, sendo o de maior intensidade, referente ao plano de reflexão (001), com 2θ no valor de $6,77^\circ$, correspondente à

distância interlamelar, d , de 1,3 nm, calculada pela Lei de Bragg. Todos os picos foram indexados segundo a literatura (JABER et al., 2014; TRIGUEIRO et al., 2018b). O último pico em $2\theta = 62,13^\circ$ confirmou o caráter dioctaédrico esperado para a amostra, ou seja, indica a predominância de cátions trivalentes na folha octaédrica de Na-Mt (MOORE; REYNOLDS, 1997; REINHOLDT et al., 2001, 2005). A morfologia da Na-Mt foi ainda monitorada por MEV conforme apresentado na Figura 3-2. Partículas bem formadas em morfologia típicas de placas foram observadas.

Após a reação de troca iônica, os difratogramas das Mts mostraram padrões similares, sendo possível observar mudanças referentes ao plano (001), com valores de 2θ em $5,69^\circ$ ($d = 1,55$ nm); $5,64^\circ$ ($d = 1,56$ nm) e $5,68^\circ$ ($d = 1,55$ nm) correspondendo, respectivamente, aos sólidos Ca-Mt, Mg-Mt e Sr-Mt. Esses valores da distância interlamelar estão em concordância com a literatura para cada troca catiônica realizada na Mt (CHANG; JIANG; LI, 2018; CAVALCANTE et al., 2016; CASES et al., 1997).

Figura 3-2: Difratogramas de raios X das Mts mono iônicas (i) e imagens de microscopia eletrônica de varredura da Na-Mt.



Após a adsorção, foi observado variação no pH das soluções entre 6,2-6,5 e 2,9-3,1 para os sistemas sem e com ajuste de pH. A Figura 3-3 (i) e (ii) apresentam os difratogramas de raios X dos híbridos RNA@cátions-Mt em pH 6,2-6,5 e em pH 2,9-3,1, respectivamente. Para o sistema em pH 6,2-6,5, o valor de d_{001} é 1,37 nm para todas as amostras, sugerindo que não houve intercalação da biomolécula nessas condições. A possibilidade de intercalação depende fortemente das interações eletrostáticas entre as camadas do argilomineral (carregadas

negativamente) e a molécula a ser intercalada. Os nucleotídeos individuais exibem dois ou três pares ácido-básico devido à protonação/desprotonação de nitrogênios das bases nitrogenadas e do grupo P-OH (FEUILLIE et al., 2013; MARTIN, 1985). As bases nitrogenadas podem ser protonadas para AMP (N1, pKa = 3,84), CMP (N3, pKa = 4,33), GMP (N7, pKa = 2,48) e UMP (pKa = 9,6) (FEUILLIE; SVERJENSKY; HAZEN, 2015). Esta parte dos nucleotídeos estaria, então, principalmente na forma neutra em pH 6,2 a 6,5, enquanto em pH 2,9 a 3,1, a maioria dos grupos AMP e CMP, estariam protonados. Finalmente, o grupo fosfato tem um pKa da ordem de 0,5 e está sempre desprotonado nessas condições.

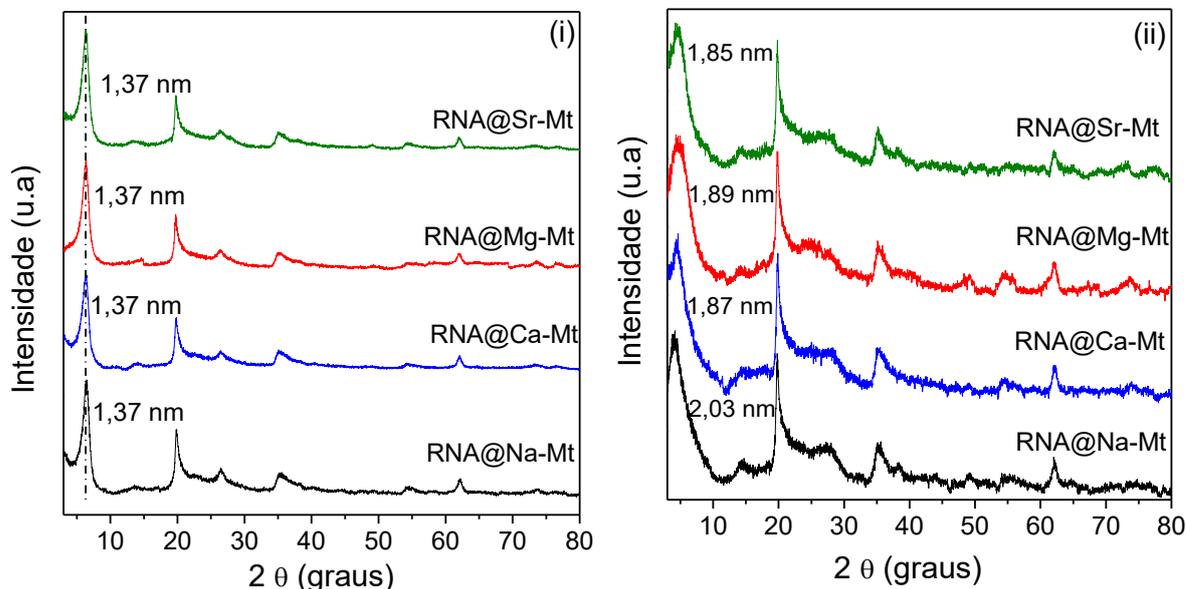
Assim, em meio neutro, a intercalação do biopolímero seria eletrostaticamente desfavorecida por causa das interações repulsivas com a camada negativa do argilomineral, uma vez que a Mt tem uma carga negativa em todas as condições de pH (GUILLERMIN et al., 2019; LIU et al., 2017; SAKA; GÜLER, 2006; YUKSELEN; ERZIN, 2008). É provável, então, que as moléculas de RNA em pH 6,2-6,5 sejam adsorvidas na superfície externa e nas bordas das amostras do argilomineral (MIGNON; SODUPE, 2012; MIGNON; UGLIENGO; SODUPE, 2009). Além disso, os cátions de Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ e Sr²⁺ podem estar contribuindo para a adsorção, criando “pontes iônicas” entre a superfície negativa da Mt e os grupos fosfatos presentes no RNA. Um mecanismo semelhante foi invocado para a adsorção de DNA na Mt na presença de diferentes cátions (SHENG et al., 2019).

Em pH 2,9-3,1, conforme os difratogramas da Figura 3-3 (ii), a reflexão (001) mudou para distâncias basais mais altas cujos valores d_{001} foram de 2,03 nm, 1,87 nm, 1,89 nm e 1,85 nm para RNA@Na-Mt, RNA@Ca-Mt, RNA@Mg-Mt e RNA@Sr-Mt, respectivamente, correspondendo a espaçamentos interlamelares na faixa de 0,9 nm. As maiores reflexões basais foram observadas para todas as amostras, indicando a intercalação de uma biomolécula bastante grande no espaço interlamelar do argilomineral.

A ocorrência de intercalação está associada à protonação parcial das bases nitrogenadas nos nucleotídeos do RNA em pH inferior ao seu pKa. Nessas condições, a repulsão eletrostática entre a cadeia de RNA e a superfície carregada negativamente é reduzida, permitindo a intercalação. Essas interpretações são compatíveis com outros estudos de adsorção de RNA (GREAVES; WILSON, 1969; JELAVIĆ et al., 2017) e também estudos sobre adsorção de bases nitrogenadas (CARNEIRO et al., 2011) e nucleotídeos (PEDREIRA-SEGADÉ et al., 2016) em Mt. Resultados semelhantes foram observados na intercalação de RNA em Mt em meio ácido em valores de pH 5 a 3,5 (GREAVES; WILSON, 1969). Outros estudos não observaram deslocamento do plano interlamelar em RNA de levedura torula/Mg-esmectita

(VIENNET et al., 2020) e DNA/Mt trocado por íons (Li^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} e Al^{3+}) (XIE et al., 2019). No entanto, esses trabalhos não foram conduzidos em pH na faixa ácida.

Figura 3-3: Difratoogramas de raios X dos híbridos RNA@cátions-Mt obtidos em (i) pH 6,2-6,5 e em (ii) pH 2,9-3,1.

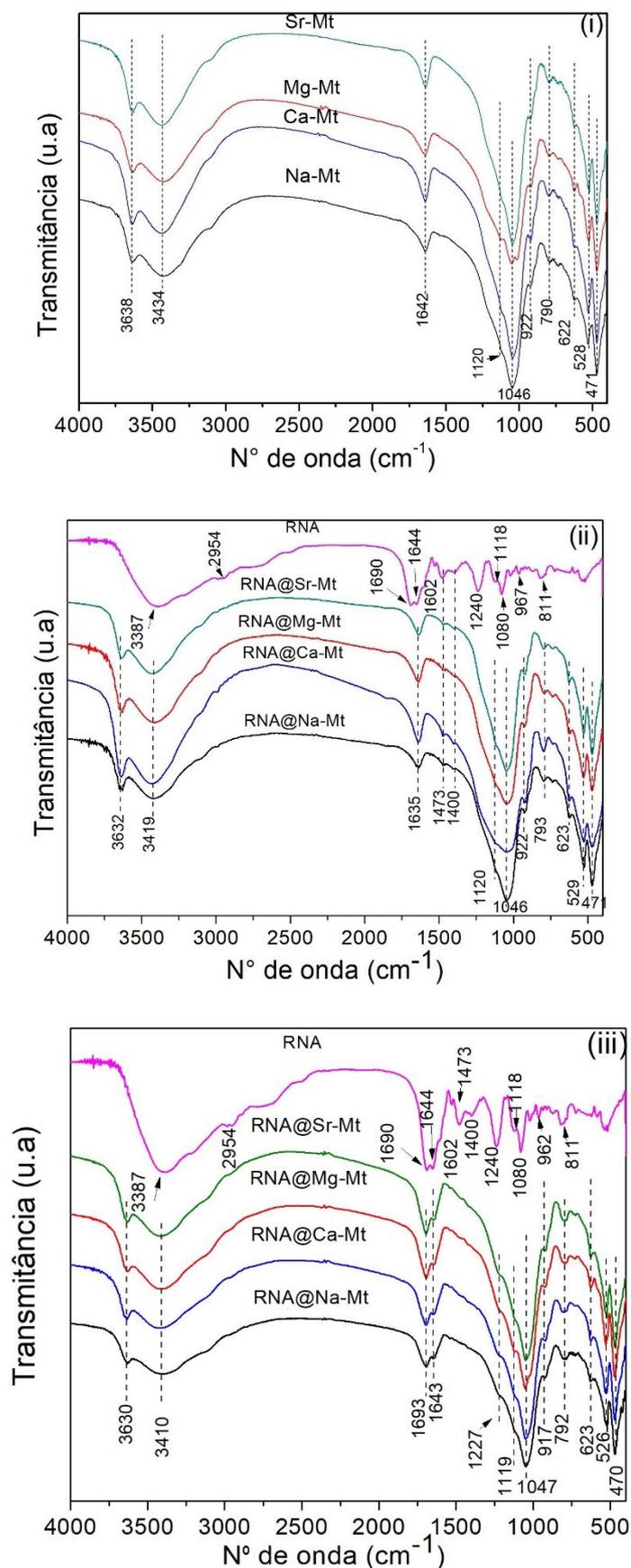


3.4.2 Espectroscopia de absorção na região de infravermelho (IV)

Os sólidos antes e após a adsorção com o derivado do RNA foram avaliados por espectroscopia na região do infravermelho conforme a Figura 3-4. Independentemente do cátion interlamelar, os espectros vibracionais dos sólidos foram semelhantes com absorções em 3638 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação Al-OH, e em 3434 cm^{-1} à ligação OH da água (BIZOVSKÁ; JANKOVIČ; MADEJOVÁ, 2018; GU et al., 2015). As bandas na região em 1640 e 922 cm^{-1} foram associadas às deformações das ligações OH da água e OH ligado ao cátion metálico da folha octaédrica, Al-OH, respectivamente (MADEJOVÁ; GATES; PETIT, 2017).

As absorções em 1046 cm^{-1} e em 1120 cm^{-1} são referentes aos estiramentos simétrico e antissimétrico da ligação Si-O-Si, respectivamente (BIZOVSKÁ; JANKOVIČ; MADEJOVÁ, 2018). Ao mesmo tempo, observa-se ainda duas bandas, uma em 790 cm^{-1} e em 622 cm^{-1} associadas à vibração Al-O-Si no plano e às vibrações Al-O fora do plano e vibrações Si-O, respectivamente (MADEJOVÁ; GATES; PETIT, 2017). Por fim, as absorções em 528 e 471 cm^{-1} foram atribuídas às deformações Al-O-Si e Si-O-Si, respectivamente (PENTRÁK et al., 2018; WIŚNIEWSKA; FIJAŁKOWSKA; SZEWCZUK-KARPISZ, 2018).

Figura 3-4: Espectros na região do infravermelho para (i) Mts Na-Mt, Ca-Mt, Mg-Mt e Sr-Mt, e híbridos RNA@cátions-Mt obtidos a (ii) pH 6,2-6,5 e (iii) pH 2,9-3,1.



Nas Figuras 3-4 (ii) e (iii) mostram os espectros do RNA e dos sólidos após a reação com a biomolécula em condições de pH diferentes. Para o espectro do RNA, a banda em 3387 cm^{-1} foi associada ao estiramento N-H, e em 2954 cm^{-1} atribuída ao estiramento C-H (TSUBOI, 1970). As bandas em 1690 , 1644 e 1602 cm^{-1} foram associadas ao estiramento C=O das purinas e pirimidinas (BANYAY; SARKAR; GRÄSLUND, 2003; TSUBOI, 1970).

A absorção em 1473 cm^{-1} foi atribuída à vibração do anel da base de uracila (KUMAR; SINGH, 2013) e em 1400 cm^{-1} foi associada à vibração C-O-H no plano, na posição 2' do anel da ribose (BANYAY; SARKAR; GRÄSLUND, 2003; TSUBOI, 1970). As bandas em 1240 e 1080 cm^{-1} foram associadas ao estiramento antissimétrico e simétrico de PO_2^- , respectivamente (BENEDETTI et al., 1997; TSUBOI, 1970) e a banda em 1118 cm^{-1} atribuída ao estiramento C-O na ribose (BENEDETTI et al., 1997). Além disso, as absorções em 967 e 811 cm^{-1} foram atribuídas a vibração da cadeia de ribose-fosfato e a vibração da ribose, respectivamente (TSUBOI, 1970; BANYAY; SARKAR; GRÄSLUND, 2003).

Os espectros dos sólidos após a adsorção do RNA, conforme Figuras 3-4 (ii) e (iii), indicou a presença da molécula de RNA pelo surgimento de novas bandas. Nos espectros dos híbridos formados em pH 6,2-6,5, Figura 3-4 (ii), observam-se padrões de absorção similares para os sólidos. A princípio, duas bandas de fraca intensidade podem ser visualizadas. A primeira banda em 1473 cm^{-1} foi atribuída às vibrações do anel da base nitrogenada uracila (ALCOLEA PALAFOX et al., 2010; KUMAR; SINGH, 2013). A absorção em 1400 cm^{-1} foi associada à vibração C-O-H no plano, na posição 2' do anel da ribose (TSUBOI, 1970; BANYAY; SARKAR; GRÄSLUND, 2003).

No sistema em pH 2,9-3,1, Figura 3-4 (iii), observa-se uma banda em todos os espectros por volta de 1693 cm^{-1} atribuída ao estiramento C=O presente nas bases nitrogenadas (MARTY et al., 2009; ROUTH; GARAI; NANDI, 2011; YAMADA; FUNAKI; MIKI, 2019). A banda de estiramento antissimétrico associada ao grupo PO_2^- no RNA observada em 1240 cm^{-1} (Figura 3-4), deslocou para 1227 cm^{-1} para os híbridos formados nesta condição. Este deslocamento está provavelmente associado a distorções na molécula de RNA, possivelmente causadas pelas interações de cátions com grupos fosfato (ANDRUSHCHENKO; BOUŘ, 2009; DUGUID et al., 1993; PEDREIRA-SEGADE; MICHOT; DANIEL, 2018).

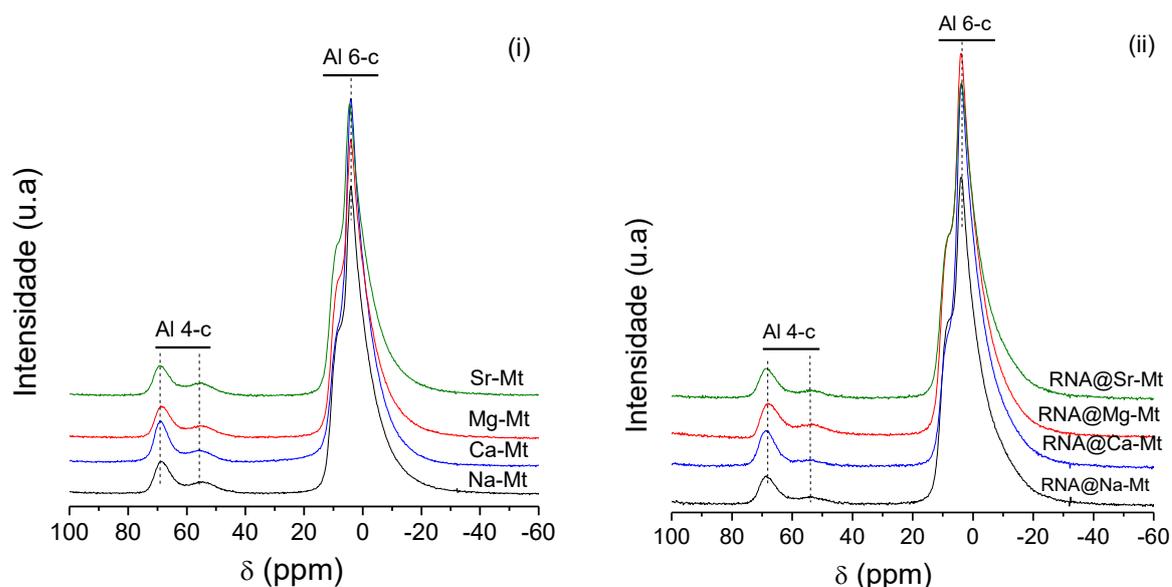
A posição de algumas bandas no espectro de infravermelho dos argilominerais são fortemente influenciadas pelo ambiente químico imediato, o que permite assim, avaliar alguma

interação com moléculas orgânicas (SCHNETZER et al., 2017). De fato, pode ser observado nos espectros das Figuras 3.4 (ii) e (iii), mudanças na posição para menores frequências das absorções referentes ao estiramento O-H associados ao OH estrutural (cátions-Mt: 3638 cm^{-1} , RNA@cátions-Mt em pH 6,2-6,5: 3632 cm^{-1} e RNA@cátions-Mt em pH 2,9-3,1: 3630 cm^{-1}), foram observados, indicando ligações de hidrogênio, como outro tipo de contribuição na interação RNA/Mt.

3.4.3 Ressonância magnética nuclear no estado sólido de ^{27}Al , ^{13}C e ^{31}P

Os espectros de RMN de ^{27}Al para as amostras antes e após a adsorção com a biomolécula em pH 2,9-3,1 podem ser visualizados na Figura 3-5 (i) e (ii). Todas as amostras de partida apresentaram deslocamentos químicos característicos em 3,9 e 69,1 ppm relacionados a alumínio hexacoordenado (Al 6-c) e tetracoordenado (Al 4-c) localizados nas folhas octaédricas e tetraédricas da Mt, respectivamente (CADARS et al., 2012; MARSH et al., 2018). Outro deslocamento químico correspondente ao ambiente (Al 4-c) foi observado em ambos os espectros em 55 ppm e pode ser atribuído a pequenas impurezas de aluminosilicatos amorfos, também observado na literatura para Mt sintética (CADARS et al., 2012) e natural (GARG; SKIBSTED, 2014). Os mesmos deslocamentos químicos foram observados nos híbridos RNA@cátions-Mt e nenhuma alteração foi observada nos sinais de RMN de ^{27}Al , o que indica ausência de interação com os sítios de Al nas condições de síntese.

Figura 3-5: Espectros de RMN de ^{27}Al para (i) Mts de partida e (ii) híbridos RNA@cátions-Mt obtidos em pH 2,9-3,1.

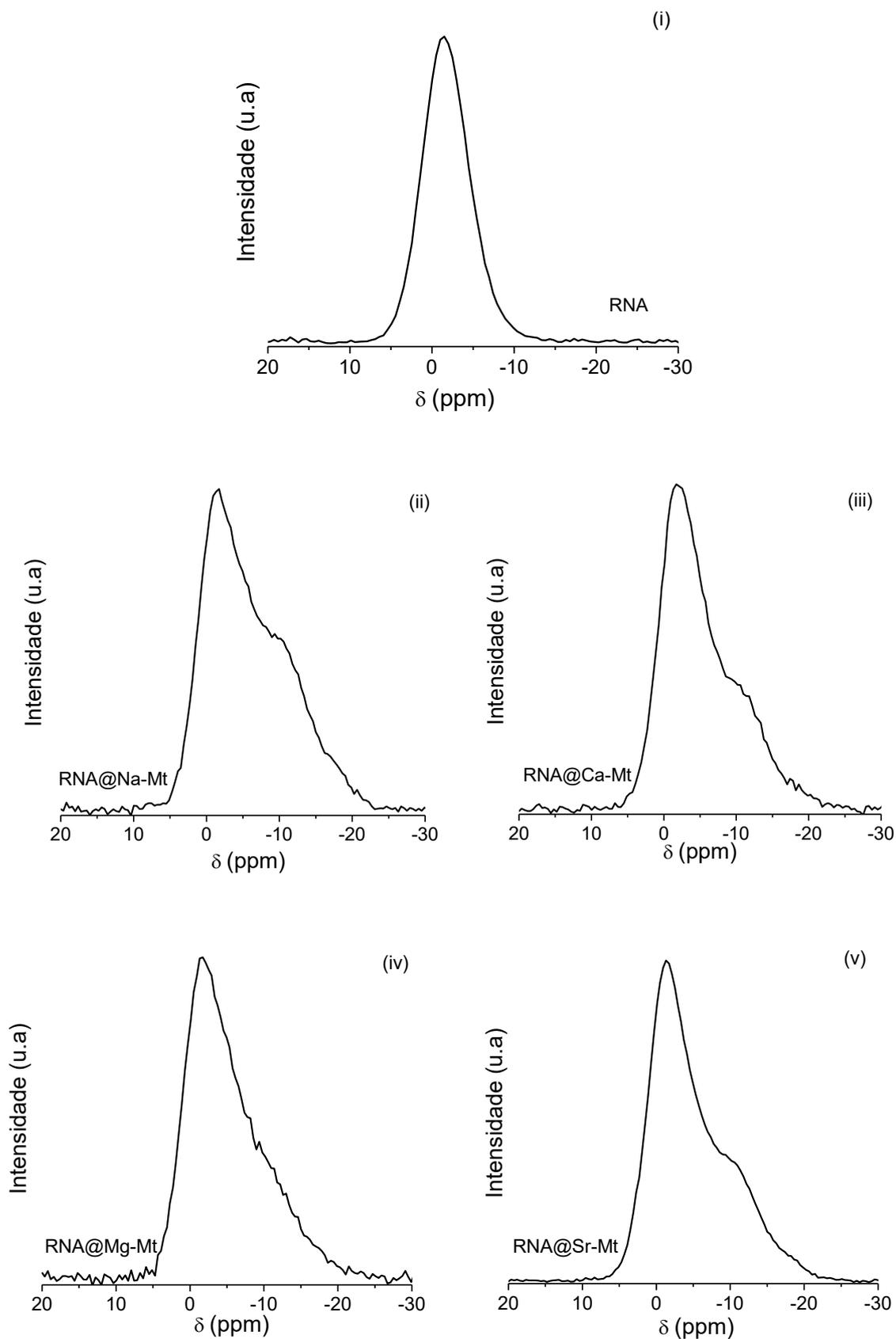


Os espectros de RMN de ^{31}P do RNA e dos híbridos são mostrados na Figura 3-6. Para os espectros de RNA, Figura 3-6 (i), um sinal largo é observado com um máximo de -1,4 ppm relacionados à espécie Q^0 monofosfato (AKOUCHE et al., 2017; CADE-MENUN, 2005). Para as amostras de RNA@cátions-Mt, um novo deslocamento forte apareceu em -9,3 a -10,6 ppm, isto é, 8 a 9 ppm acima do sinal do RNA de partida. Este comportamento é bastante inesperada, uma vez que o deslocamento é comparável à diferença de deslocamento químico que separa o sinal Q^0 no monofosfato do Q^1 no difosfato. A formação de difosfato parece improvável, no entanto, uma vez que seriam necessários uma quebra e um rearranjo da estrutura do RNA.

Outra possibilidade é que o novo sinal possa corresponder ao efeito da interação de adsorção nos grupos fosfato em ponte. Entre as interações prováveis, as interações com os cátions metálicos seriam esperadas para resultar em tais mudanças. De fato, MADERIA et al (MADERIA; HORTON; DEROSE, 2000) também relatam mudanças de vários ppm quando um RNA modificado é posto em contato com cátions Cd^{2+} ou Mg^{2+} . Os autores supuseram que os grupos fosfato afetados não se coordenavam diretamente com os cátions, mas eram indiretamente afetados por mudanças nas conformações do RNA.

Não será mais especulado sobre as razões para o novo sinal observado aqui, exceto para dizer que ele revela uma forte interação RNA/argilominerais. Foi também observado que em pelo menos três das quatro amostras, há deslocamentos químicos que indicam à presença de um novo componente nos espectros ^{31}P . As tentativas de deconvolução do sinal necessitaram da introdução de um componente de -14 a -17 ppm. A hipótese de fortes deformações da cadeia de RNA está de acordo com o quadro estrutural deduzido nos resultados de DRX.

Figura 3-6: Espectros de RMN de ^{31}P do RNA (i) e híbridos RNA@Na-Mt (ii), RNA@Ca-Mt (iii), RNA@Mg-Mt (iv) e RNA@Sr-Mt (v) em pH 2,9-3,1.



Os espectros de RMN de ^{13}C para o RNA e os híbridos obtidos em pH 2,9-3,1, podem ser observados na Figura 3-7 e os valores dos deslocamentos químicos e suas respectivas atribuições foram sumarizadas na Tabela 3-2. Na Figura 3-8, observam-se os nucleotídeos constituintes do RNA de forma isolada e com cada carbono numerado (ŠPONER et al., 2018). Os sinais observados para os híbridos RNA@Mt foram ligeiramente similares. Inicialmente os sinais a 60 – 90 ppm foram atribuídos aos carbonos da ribose, não sendo possível observar o sinal referente a C2' (CHANG et al., 1982; RODRIGUES et al., 2019).

Os sinais detectados entre 100 - 170 ppm foram atribuídos aos carbonos presentes nas bases contidas nos nucleotídeos (CHANG et al., 1982; FUJIWARA et al., 1995). Em particular, os sinais de carbono em G₄ e A₄ foram localizados a 150,3 ppm e atribuídos ao grupo C=C, ver Figura 3-8. Nos híbridos RNA@Mt, esse sinal foi deslocado para 151,5 ppm. O sinal em 165,4 ppm associado a C₄ na citosina (-NH₂ C=N), deslocou para 166,4; 166,6; 166,4 e 166,5 ppm para RNA@Na-Mt, RNA@Ca-Mt, RNA@Mg-Mt e RNA@Sr-Mt, respectivamente. Os demais deslocamentos químicos foram praticamente os mesmos para as diferentes Mts. Esse fato sugere que as bases dos nucleotídeos, principalmente adenine e citosina, podem ter protonado em meio ácido (pH 2,9-3,1), e terem atuado como potenciais sítios para a interação entre as Mts e a biomolécula. Esses resultados corroboram com os resultados de espectroscopia de absorção na região do infravermelho, indicando que a protonação dessas porções induz interações por ligações de hidrogênio e eletrostáticas com a superfície da Mt.

Figura 3-7: Espectros de RMN de ^{13}C do RNA e híbridos RNA@Mt obtidos em pH 2,9-3,1. Para uma melhor compreensão, o símbolo C' representa o carbono presente no grupo ribose e U₅, por exemplo, representa o carbono 5 na base nitrogenada uracila.

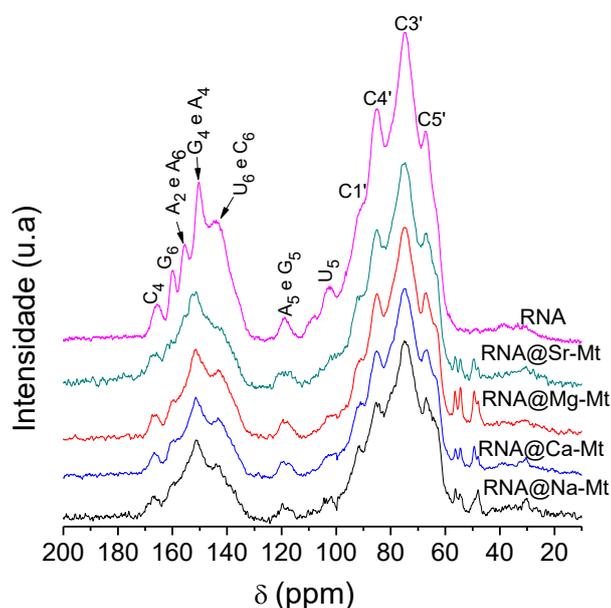
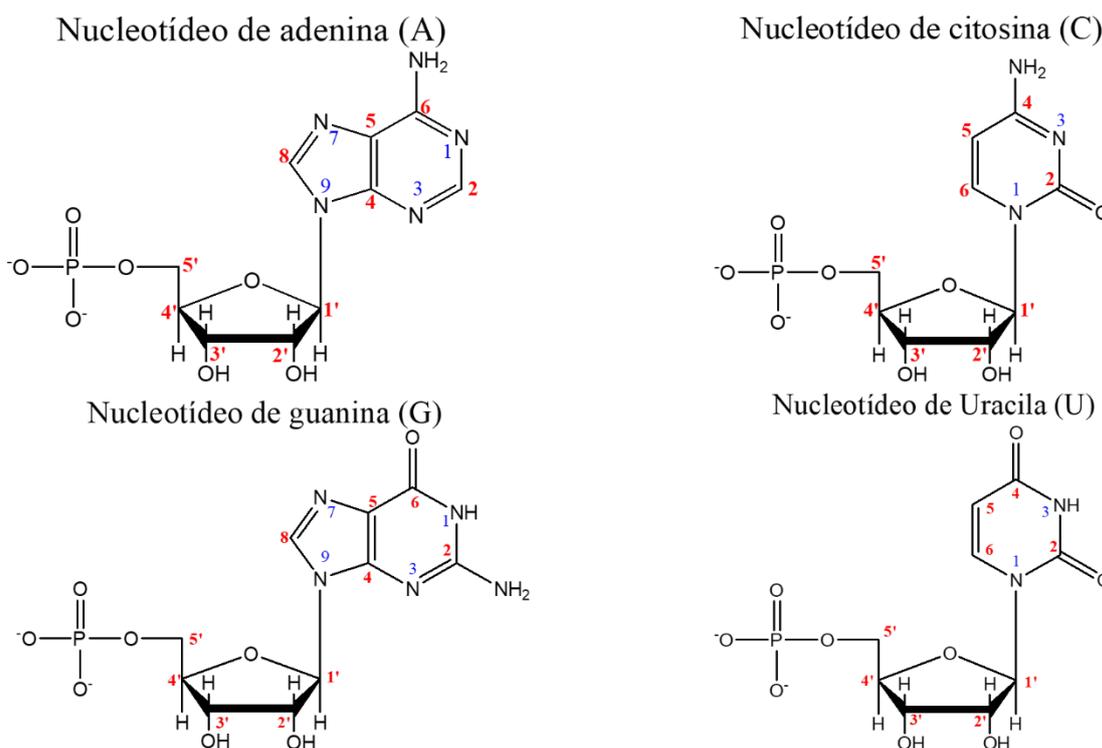


Tabela 3-2 Deslocamentos químicos dos espectros de RMN de ^{13}C do RNA e híbridos RNA@Mt em pH 3.0*.

RNA	RNA@Na-Mt	RNA@Ca-Mt	RNA@Mg-Mt	RNA@Sr-Mt	Atribuições
67,2	67,0	67,1	67,1	67,1	C5 ^a
74,7	74,7	74,8	74,8	74,9	C3 ^b
85,0	85,0	85,0	85,0	85,0	C4 ^a
91,2	91,4	91,2	91,4	91,5	C1 ^b
102,5	102,7	102,6	102,6	102,4	U5 ^b
119,0	119,0	119,0	119,0	119,0	A5 e G5 ^b
144,1	143,9	144,0	143,9	143,8	C6 e U6 ^{b,d}
150,3	151,5	151,5	151,5	151,5	G4 e A4 ^b
155,4	-	-	-	-	A2 e A6 ^{b,c}
159,8	159,7	159,5	159,5	160,0	G6 ^d
165,4	166,4	166,6	166,4	166,5	C4 ^b

*Deslocamentos químicos expressos em ppm. ^a(RODRIGUES et al., 2019); ^b(CHANG et al., 1982); ^c(FUJIWARA et al., 1995); ^d(LAPPER; MANTSCH; SMITH, 1973). C' representa o carbono do grupo da ribose; A₄, C₄, U₄ e G₄ por exemplo, representam o carbono 4 nas bases nitrogenadas adenine, citosina, uracila e guanina (ver Figura 3-8).

Figura 3-8: Nucleotídeos constituintes do RNA apresentados de forma isolada, com os respectivos átomos numerados. Em vermelho os átomos de carbono e em azul os átomos de nitrogênio.



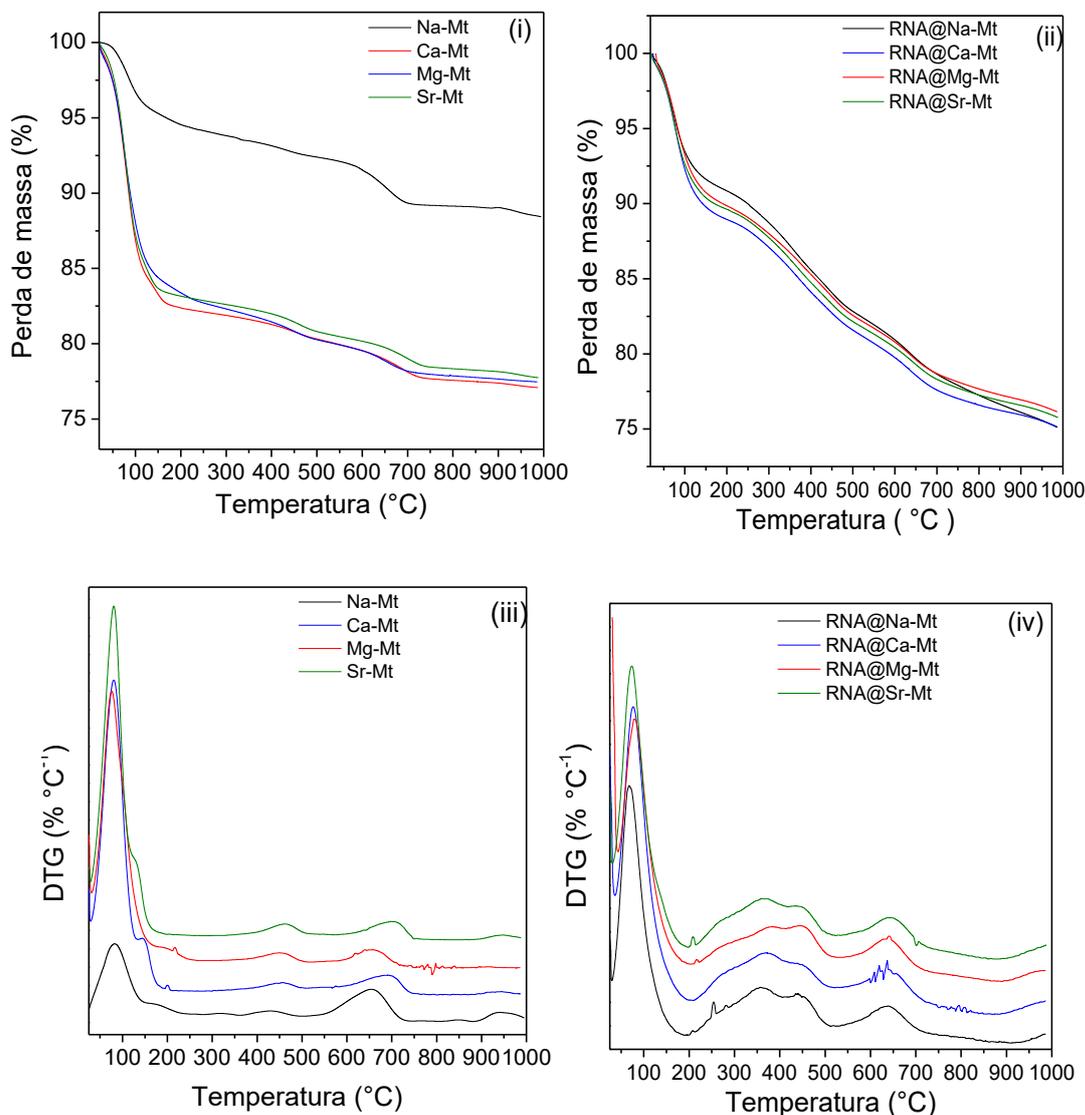
Fonte: Adaptado de (ŠPONER et al., 2018).

3.4.4 Análise termogravimétrica (TG/DTG)

As curvas termogravimétricas (TG) e as respectivas derivadas (DTG) dos sólidos antes e depois da adsorção de RNA em pH 2,9-3,1, podem ser observados na Figuras 3-9.

Observam-se nas Figuras 3-9 e na Tabela 3-3 os eventos e as porcentagens de perda de massa das Mts antes do contato com RNA. O primeiro evento em torno de 30 – 180 °C, com picos na DTG por volta de 82, 133 e 146 °C, corresponde à liberação de água adsorvida fisicamente na superfície externa e da água presente no espaço interlamelar, indicando diferentes hidratações em função do cátion interlamelar (CAVALCANTI et al., 2019; MARSH et al., 2018). O segundo evento observado com picos na DTG 433 - 463 °C foi talvez devido à perda de uma pequena quantidade de matéria orgânica remanescente do procedimento de síntese (possivelmente íons de acetato), e o terceiro evento com picos na DTG em 657 e em torno de 704 °C, são associados à desidroxilação dos grupos OH estruturais (TAJEDDINE et al., 2015).

Figura 3-9: Curvas termogravimétricas - TG (i) para Na-Mt, Ca-Mt, Mg-Mt e Sr-Mt, e (ii) para os híbridos em pH 2,9-3,1, RNA@Na-Mt, RNA@Ca-Mt, RNA@Mg-Mt e RNA@Sr-Mt, e DTG (iii) para Na-Mt, Ca-Mt, Mg-Mt e Sr-Mt e (iv) para os híbridos em pH 2,9-3,1, RNA@Na-Mt, RNA@Ca-Mt, RNA@Mg-Mt e RNA@Sr-Mt,



Após a adsorção da molécula modelo de RNA nas argilas em pH 2,9-3,1, observou-se um primeiro evento por volta de 30 – 180 °C, com pico na DTG em 76 °C associado à saída de menores percentuais de água em relação às amostras de partida, com exceção para Na-Mt, Figura 3-9 e Tabela 3-3. A incorporação da molécula de RNA foi associada ao evento observado entre 200 – 460 °C, com picos na DTG em torno de 362 e 448 °C, atribuídos à eliminação progressiva da matéria orgânica. Esta eliminação continuou até o final da TG (1000 °C), e a eliminação da matéria orgânica não foi completa neste ponto como indicado pela cor preta das amostras após a TG.

Tabela.3-3: Etapas de perda de massa obtidas por termogravimetria das amostras antes e após a interação com RNA em pH 2,9-3,1.

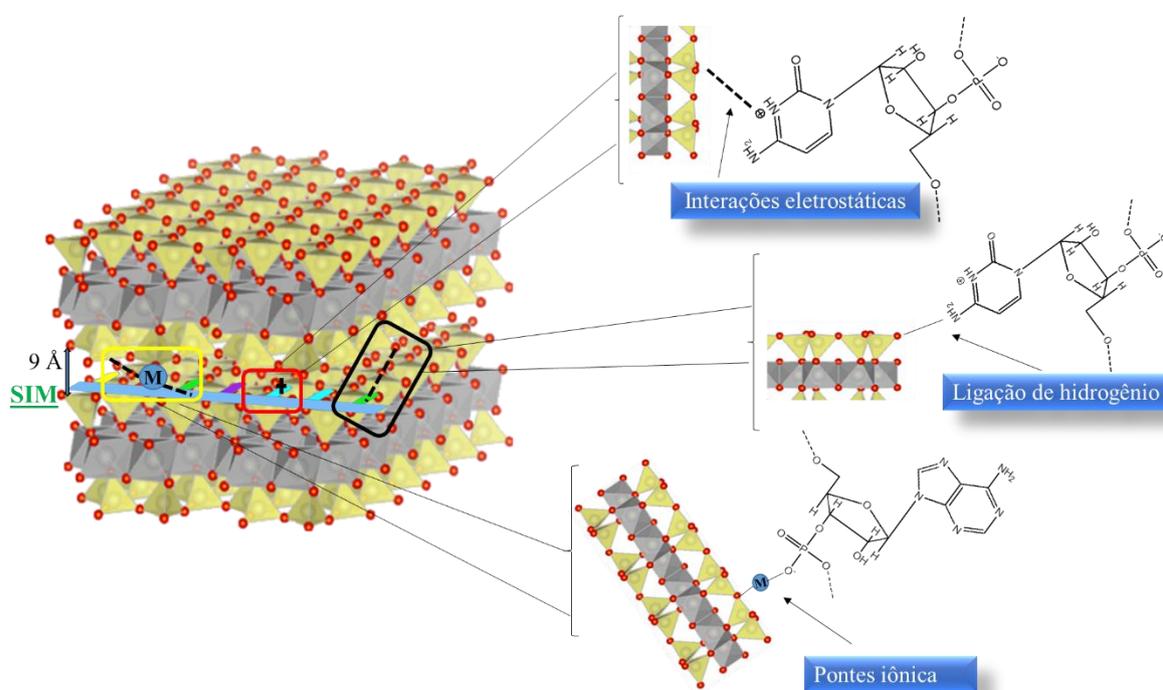
Amostras	Temperatura (°C)	Perda de massa (%)	Perda de massa atribuída ao RNA
Na-Mt	30 – 180	5,7	-
	180-1000	7,3	
Ca-Mt	30 – 180	22,2	-
	180-1000	7,2	
Mg-Mt	30 – 180	21,6	-
	180-1000	8,3	
Sr-Mt	30 – 180	21,2	-
	180-1000	7,3	
RNA@Na-Mt	30 – 180	9,5	14,2
	180-1000	21,5	
RNA@Ca-Mt	30 – 180	14,1	11,7
	180-1000	18,9	
RNA@Mg-Mt	30 – 180	11,3	10,3
	180-1000	18,6	
RNA@Sr-Mt	30 – 180	13,0	11,4
	180-1000	18,7	

A Tabela 3-3 fornece estimativas da quantidade mínima adsorvida de RNA, avaliadas a partir da perda de massa adicional após 180 °C, ou seja, após a eliminação da água fisisorvida, corrigidas com a perda de massa correspondente para as amostras sem o RNA. Esses valores são certamente subestimados uma vez que a matéria orgânica (provavelmente carbonizada) ainda estava presente a 1000 °C, mas eles já são consideráveis com valores de 10,3 a 14,2% com respeito à matriz do argilomineral.

3.4.5 Proposta do mecanismo de interação RNA/Mt

Partiu-se do princípio de que o que foi intercalado não foi o RNA de levedura torula intacto, que tem uma estrutura terciária intrincada e existe em solução como uma molécula em forma de Y (TRIPATHI et al., 2017) com um “raio de giração” de 30 nm (MANZANO; ZYDNEY, 2017). Na verdade, uma fita dupla de ácido nucleico tem um diâmetro de cerca de 2,6 nm e, conseqüentemente, mesmo uma fita simples situada no espaço interlamelar com suas bases nitrogenadas perpendiculares às camadas de argila daria um espaçamento interlamelar de cerca de 1,3 nm, significativamente maior do que os valores observados nos resultados de difração de raios X. É por isso que no esboço estrutural do RNA intercalado que é proposto na Figura 3-10, a fita de RNA é representada com as bases planas no espaço interlamelar. Isso envolveria um forte grau de deformação do RNA, de modo que provavelmente a molécula de RNA não entraria no espaço interlamelar. É proposto que apenas fragmentos da cadeia de RNA foram intercalados, enquanto partes da molécula pode ser adsorvido na superfície ou nas bordas da Mt. Um mecanismo de adsorção semelhante foi documentado para outras biomacromoléculas em Mt, como é o caso de enzimas (GOPINATH; SUGUNAN, 2007; SANJAY; SUGUNAN, 2006).

Figura 3-10: Tipos de interação na intercalação de RNA em Mt em pH 2,9-3,1.



3.5 Conclusões

Este estudo investigou a interação de uma molécula derivada de RNA com Mts sintéticas trocadas com diferentes cátions. Os sistemas foram preparados em meio neutro e ácido.

A interação da biomolécula com a Mt foi dependente do pH: a intercalação de RNA no espaço interlamelar da Mt foi amplamente controlada por interações eletrostáticas. Em pH próximo ao neutro, as moléculas de RNA têm uma carga negativa significativa e são impedidas de entrar no espaço interlamelar por repulsão eletrostática das camadas do argilomineral. É provável que o RNA seja então adsorvido em sítios na região de bordas, com alguns cátions de compensação atuando como pontes catiônicas.

Em valores de pH mais baixos, ocorre intercalação, conforme visto a partir do valor do espaçamento basal observado no DRX. De fato, espera-se que as bases nitrogenadas sejam parcialmente protonadas, resultando em cargas negativas significativamente menores nas moléculas de RNA. A força motriz para a intercalação pode incluir contribuições de interações eletrostáticas localizadas (entre os núcleos aromáticos carregados positivamente e as camadas do argilomineral carregadas negativamente), provavelmente acompanhadas por ligação de hidrogênio, e também por interações com os cátions interlamelares. Alguns autores sugeriram que em pH próximo a 7, as interações de van der Waals entre as camadas de Mt e as bases de purina e pirimidina dos nucleotídeos também podem estar atuando (FERRIS, 2006; KAWAMURA; FERRIS, 1999).

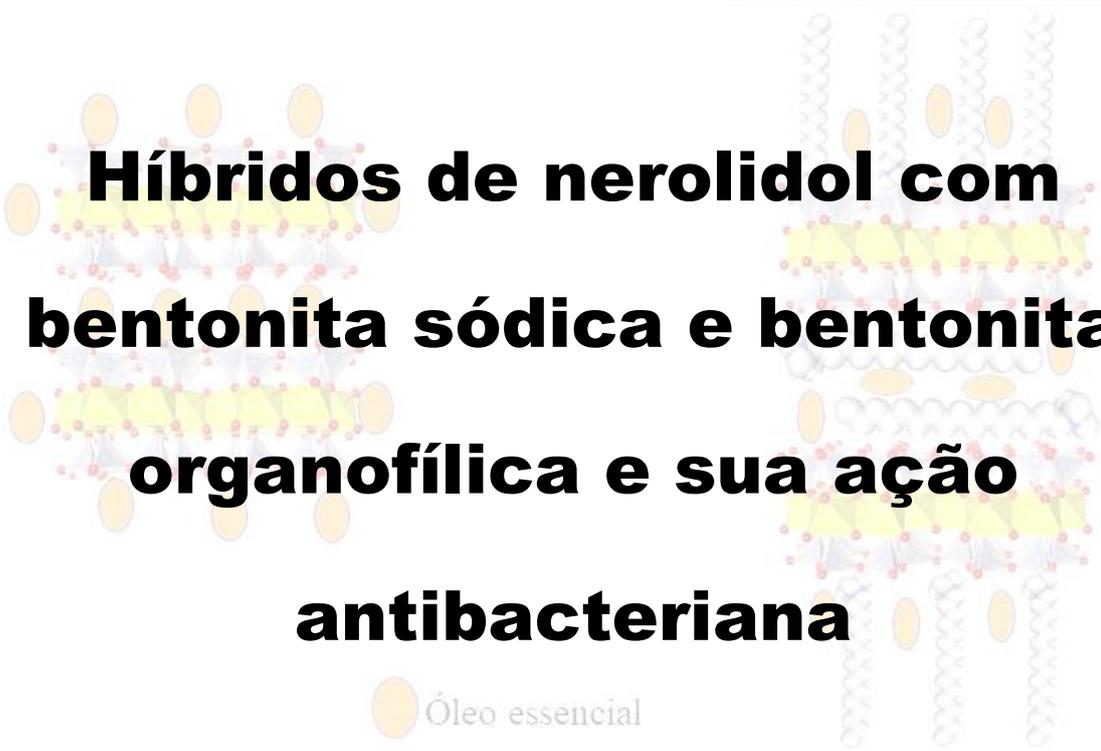
Tanto nos espectros de infravermelho quanto os RMN ^{13}C indicam pequenas modificações, mas significativas, do ambiente de carbonos do anel. Os espectros de infravermelho também mostraram uma mudança bastante importante da banda de fosfato. Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que ambos os grupos estão envolvidos no mecanismo de interação. O RMN ^{31}P mostra um efeito surpreendentemente forte de adsorção nos fosfatos, possivelmente causados pelos cátions interlamelares.

Esses resultados são indicativos de que oligômeros e polímeros de RNA podem ter interagido efetivamente com argilominerais, como a Mt, em um meio ácido na Terra primitiva. Tal interação RNA/Mt pode ter estabilizado e protegido moléculas de RNA de um ambiente de prováveis condições hostis na Terra primitiva, como alta radiação UV.

Capítulo 4

Nerolidol/Na-Bent

Nerolidol/CTAB-Bent



Híbridos de nerolidol com bentonita sódica e bentonita organofílica e sua ação antibacteriana

 Óleo essencial

4.1 Introdução

Óleos essenciais são misturas naturais, complexas e voláteis de compostos extraídos de várias partes de plantas, que possuem características como forte odor (particular da planta que é derivado) e intensa bioatividade (BASER; BUCHBAUER, 2016; JUGREET et al., 2020). Atualmente essas moléculas atuam em diversos setores da indústria como no setor da saúde (OWEN; LAIRD, 2018; YU et al., 2020), da agricultura (LUIZ DE OLIVEIRA; RAMOS CAMPOS; FRACETO, 2018) e também no setor de alimentos (DIMA; DIMA, 2015) uma vez que aliado a sua bioatividade, são ainda classificados, em sua grande maioria, como GRAS (sigla para “geralmente reconhecido como seguro”) pela Food and Drugs Administration (FDA) (JU et al., 2019a; SHEMESH et al., 2015).

Atualmente, cerca de 3000 tipos de óleo essenciais foram identificados, sendo constituídos de diversas moléculas, como por exemplos os terpenos (FALLEH et al., 2020). Entre eles, pode-se destacar um composto de intensa bioatividade, o nerolidol. Nerolidol também conhecido como peruvicol, é um álcool sesquiterpeno de origem natural presente em óleos essenciais extraídos de uma grande variedade de plantas como *Ginkgo biloba* L., *Momordica charantia* L., *Baccharis dracunculifolia* DC., *Piper clausenianum* C. DC. *Zornia brasiliensis* V., *Sálvia* L., entre outras (BARROS SILVA SOARES DE SOUZA et al., 2020; BASER; BUCHBAUER, 2016; CHAN et al., 2016). Esse terpeno possui diversas bioatividades tais como antitumoral, repelente, larvicida, antioxidante, anti-inflamatório, antiparasitária, antimalárico, antiesquistossomal, antileishmania, antifúngico e principalmente antibacteriano (BARROS SILVA SOARES DE SOUZA et al., 2020; CHAN et al., 2016; FERREIRA et al., 2016; SAITO et al., 2016; SILVA et al., 2017, 2014).

No entanto, os óleos essenciais e/ou seus componentes, incluindo o nerolidol, possuem limites na utilização em suas formas livres, principalmente em relação à volatilidade (JUGREET et al., 2020; TUREK; STINTZING, 2013). Como consequência desse fato, tecnologias têm sido desenvolvidas para diminuir esse obstáculo incluindo o seu uso em nanoemulsões (LIU; LIU, 2020), encapsulamento (VOLIC' et al., 2018) e incorporação dessas moléculas principalmente em filmes à base de polímeros (JAHED et al., 2017; PRIYADARSHI et al., 2018). Uma outra alternativa que vem sendo estudada nos últimos anos é a incorporação/adsorção em argilominerais, em especial a montmorillonita (DE OLIVEIRA et al., 2022).

Montmorillonita (Mt) é um argilomineral abundante e principal constituinte das argilas bentonitas. Esse argilomineral possui propriedades, tais como estrutura lamelar (estrutura 2:1), carga superficial negativa, capacidade de troca catiônica, alta área superficial e grupos hidroxilas reativos na superfície (BERGAYA; LAGALY, 2013). Além disso, esse filossilicato pode ainda sofrer modificações na intenção de aumentar sua capacidade de interação/adsorção de espécies orgânicas, como por exemplo com a organofilização com surfactantes (BRITO et al., 2018; FRANÇA et al., 2020b). Assim, as características da Mt a torna um excelente sólido para interagir/adsorver diversas biomoléculas (DE OLIVEIRA et al., 2021; GOLUBEVA; PAVLOVA; YAKOVLEV, 2015; GUO; TIAN; WU, 2019; SHENG et al., 2019; WANG et al., 2019) dentre elas os óleos essenciais (DE OLIVEIRA et al., 2022).

De fato, estudos no desenvolvimento de híbridos óleo essencial/Mt vem sendo realizados nos últimos anos com vários tipos de óleos essenciais como os de orégano, tomilho e manjeriço (GIANNAKAS et al., 2017); *Curcuma aromatica* e *Zanthoxylum limonella* (PRAMANIK et al., 2015); *Ocimum gratissimum* (NAKHLI et al., 2017, 2018; NGUEMTCHOUIN et al., 2013); timol (NGUEMTCHOUIN et al., 2015), entre outros. No entanto, estudos na formação do sistema nerolidol/Mt são escassos. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a incorporação de nerolidol em diferentes concentrações em bentonita sódica e organofuncionalizada com sal de amônio. A atividade antibacteriana dos diversos sistemas foi avaliada contra *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

4.2 Parte experimental

4.2.1 Reagentes químicos

Os reagentes usados estão descritos na Tabela 4-1 sendo obtidos comercialmente em grau analítico e utilizados sem purificação prévia.

Tabela 4-1: Fórmulas moleculares e dados de pureza dos reagentes químicos utilizados.

Reagentes	Fórmula molecular	Fabricante	Pureza (%)
Nerolidol (<i>cis/trans</i>)	C ₁₅ H ₂₆ O	Sigma-Aldrich	98
Etanol	C ₂ H ₆ O	NEON	99
CTAB	CH ₃ (CH ₂) ₁₅ N(Br)(CH ₃) ₃	Sigma-Aldrich	99
Acetona	C ₃ H ₆ O	NEON	99
Nitrato de prata	AgNO ₃	Sigma-Aldrich	99
Meio de infusão Brain Heart (BHI)	-	KASVI	-

4.2.2 Amostra de bentonita

A amostra de bentonita sódica (Na-Bent), de origem argentina, foi gentilmente cedida pela empresa Bentonisa do Nordeste S.A, com sede em Boa Vista, PB. A amostra foi previamente caracterizada (BRITO et al., 2018) cuja capacidade de troca catiônica foi de 74,64 cmol (+) kg⁻¹ e a seguinte composição química SiO₂ (52,98%), Al₂O₃ (18,35%), Fe₂O₃ (3,96%), MgO (2,47%), Na₂O (2,56%), K₂O (0,22%), sendo 18.59% atribuído à perda ao fogo (BRITO et al., 2018).

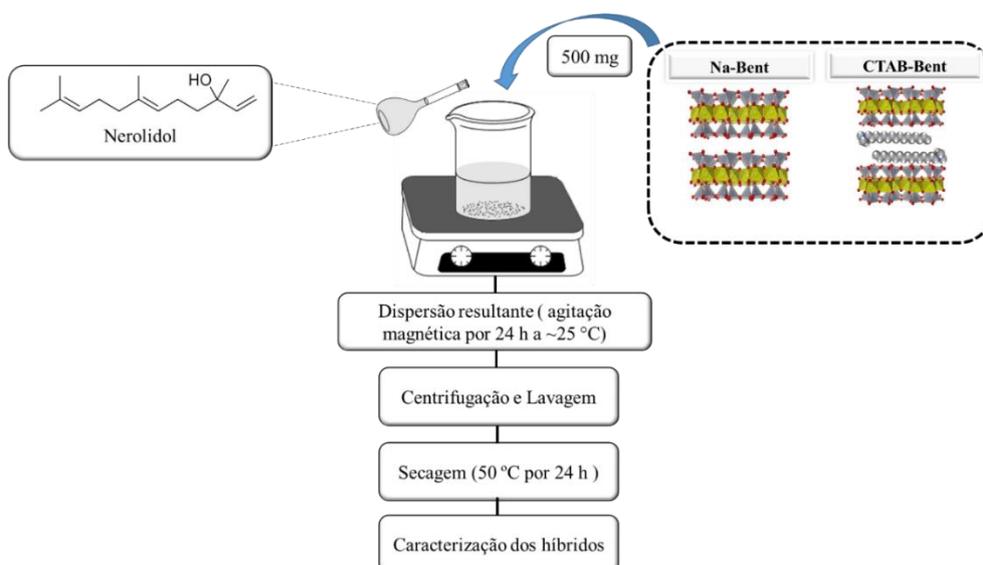
4.2.3 Organofuncionalização da bentonita

A organofuncionalização da bentonita ocorreu conforme a literatura (WANG; WANG, 2008) com algumas modificações. No ensaio, uma amostra de 3,0 g de Na-Bent foi dispersa em 50 mL de água destilada e, em seguida, foi mantida sob agitação magnética a 25 °C por 4 h. Em seguida 100 mL de solução de CTAB preparada na proporção de 100% da CTC da argila foi adicionada à dispersão argila/água. O sistema foi mantido sob agitação magnética por 20 h nas mesmas condições anteriores. Os sólidos foram filtrados a vácuo e lavados com água destilada até teste negativo para o íon brometo, utilizando solução de AgNO₃ 0,1 mol L⁻¹. Finalmente a amostra organofilizada foi seca em estufa a 60 °C por 24 h, seguindo para etapa de desaglomeração em almofariz de ágata e peneirados a 200 mesh. O sólido resultante foi denominado de CTAB-Bent.

4.2.4 Obtenção do híbrido Nerolidol/Argila

A obtenção dos híbridos Nerolidol/Na-Bent e Nerolidol/CTAB-Bent seguiu procedimento publicado anteriormente (FERNÁNDEZ et al., 2020) com algumas modificações. Inicialmente, uma amostra de 500 mg das argilas nas formas sódica ou organomodificada foi dispersa em 50 mL de solução de nerolidol/etanol sob agitação magnética a 25 °C. As quantidades de nerolidol em solução corresponderam à 5, 10, 20, 30, 40 e 50% v/v. O sistema permaneceu sob agitação magnética por 24 h a 25 °C. Em seguida os sólidos foram centrifugados, lavados com etanol e acetona e secos em estufa a 50 °C (±2) por 24 h. Os produtos obtidos foram nomeados como NEX/Na-Bent ou NEX/CTAB-Bent, em que X corresponde à concentração de nerolidol usada na síntese. Um esquema ilustrativo do procedimento é apresentado na Figura 4-1. Para fins de comparação (controle negativo), tanto a amostra Na-Bent e CTAB-Bent foram dispersas em 50 mL de etanol, sem a adição de nerolidol, sob as mesmas condições descritas anteriormente.

Figura 4-1: Resumo ilustrativo da formação dos híbridos Nerolidol/Argila.



Fonte: Próprio autor.

4.3 Técnicas de caracterização

4.3.1 Difração de raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X em baixo ângulo ($1,0-10,0^\circ$) foram obtidos no Laboratoire d'Archéologie Moléculaire et Structurale (LAMAS - Sorbonne Université), utilizando um difratômetro D8 Advance-Bruker AXS, com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0,15405 \text{ nm}$), voltagem de 30 kV e corrente de 30 mA.

4.3.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

As análises foram realizadas de acordo com o item 3.3.2.

4.3.3 Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN)

Os teores de CHN foram determinados no Laboratório de Materiais Avançados (Limav - UFPI), em um analisador microelementar Perkin Elmer, modelo PE 2400.

4.4 Atividade antibacteriana

4.4.1 Preparação do inóculo

As culturas bacterianas (*Escherichia coli* (ATCC-25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)) foram preparadas pela transferência do inóculo do meio nutriente para o meio de infusão Brain Heart (BHI). Aliquotas de 50 μL foram transferidas para tubos contendo 3 mL de solução salina incubados a 37°C por 24 h. O inóculo padronizado foi sucessivamente diluído

para uma concentração de aproximadamente $1,5 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ (Unidade Formadora de Colônia) para uso posterior nos ensaios antimicrobianos (ROSENDO et al., 2020).

4.4.2 Ensaio de contato direto

Um volume de 100 µL de cada suspensão bacteriana ($1,5 \times 10^4$ CFU mL⁻¹) foi espalhado na superfície de uma placa de ágar Muller Hinton. Os materiais de teste foram preparados com 1000 µg de cada sólido (NE5/Na-Bent, NE20/Na-Bent, NE50/Na-Bent e NE50/CTAB-Bent) suspensos em 1,0 mL de solução salina; em seguida, 100 µL de cada suspensão sólida foram lentamente depositados na superfície do meio de cultura. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A atividade antimicrobiana foi analisada pela inibição do crescimento bacteriano no pellet (FERREIRA et al., 2016). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e em duplo cego.

4.5 Resultados e Discussão

A formação dos híbridos nerolidol/bentonita foi acompanhada por técnicas de difração de raios X, espectroscópica (FTIR) e medidas de análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio. Ação antibacteriana dos híbridos foram avaliadas pelo ensaio de contato direto contra bactérias Gram negativa e Gram positiva. A descrição e discussão desses resultados serão feitas nas subseções subsequentes.

4.5.1 Difração de raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X da bentonita sódica, organofílica e os híbridos com nerolidol são apresentados na Figura 4-2 e os seus respectivos valores da distância interlamelar **d** estão sumarizados na Tabela 4-2. O plano de reflexão *001* típico para o argilomineral montmorillonita foi observado em 2θ igual a $7,00^\circ$, que equivale a uma distância basal de 1,26 nm (d_{001}) (HSIAO; HEDSTRÖM, 2017; YESILBAS; HOLMBOE; BOILY, 2018).

Outras reflexões com valores de 2θ igual a $19,8^\circ$ ($d = 0,448$ nm); $28,3^\circ$ ($d = 0,315$ nm) e $34,8^\circ$ ($d = 0,257$) foram indexados à fase montmorillonita, de acordo com a ficha ICDD: 00.029.1498. As reflexões em 2θ igual a $11,7^\circ$ e $26,5^\circ$, sugerem a presença de outras fases contaminantes, como muscovita e quartzo, conforme as cartas ICDD: 00.058.2036 e 01.070.8055, respectivamente.

Para a amostra controle de etanol/Bent, não foi possível observar mudanças significativas em relação ao plano de reflexão 001 , com valor de 2θ igual a $7,21^\circ$, e com respectivo valor da distância basal igual a $1,22$ nm (d_{001}).

Figura 4-2: Difratogramas de raios X para (i): (a) Na-Bent, (b) etanol/Bent e híbridos nerolidol/Na-Bent em (c) NE5/Na-Bent, (d) NE10/Na-Bent, (e) NE20/Na-Bent, (f) NE30/Na-Bent, (g) NE40/Na-Bent e (h) NE50/Na-Bent; (ii) (a) CTAB-Bent, (b) etanol/CTAB-Bent e híbridos nerolidol/CTAB-Bent em (c) NE5/CTAB-Bent, (d) NE10/CTAB-Bent, (e) NE 20/CTAB-Bent, (f) NE30/CTAB-Bent, (g) NE40/CTAB-Bent e (h) NE50/CTAB-Bent.

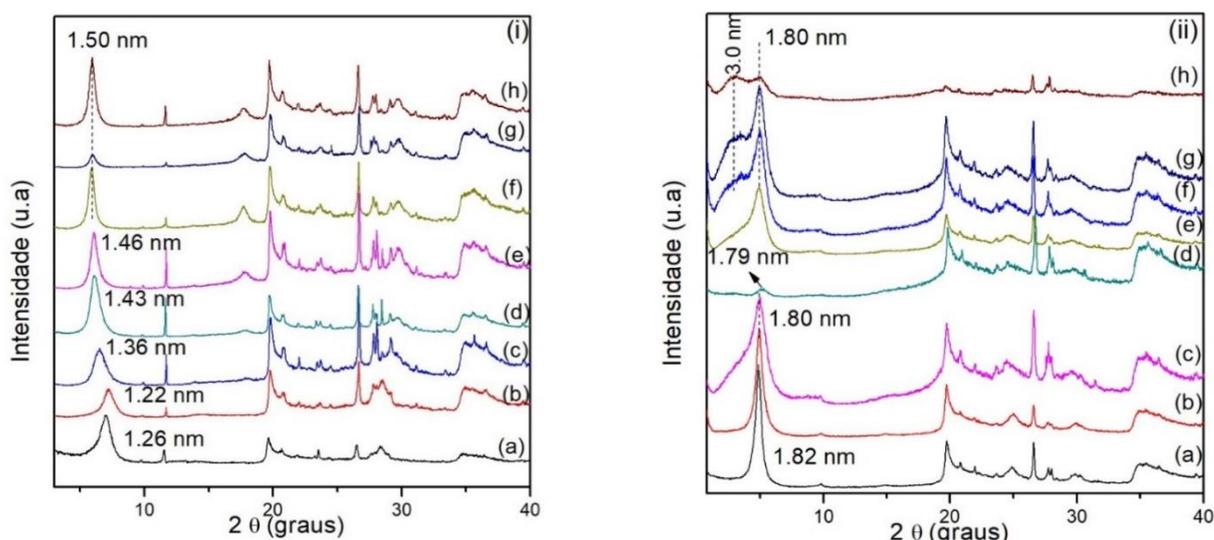


Tabela 4-2: Valores de d para Na-Bent, CTAB-Bent e seus respectivos híbridos com nerolidol.

Amostra	d (nm)	Amostra	d (nm)
Na-Bent	1,26	CTAB-Bent	1,82
etanol/Bent	1,22	etanol/CTAB-Bent	1,80
NE5/Na-Bent	1,36	NE5/CTAB-Bent	1,80
NE10/Na-Bent	1,43	NE10/CTAB-Bent	1,79
NE20/Na-Bent	1,48	NE20/CTAB-Bent	1,80
NE30/Na-Bent	1,50	NE30/CTAB-Bent	1,80 e 3,00
NE40/Na-Bent	1,50	NE40/CTAB-Bent	1,80 e 3,00
NE50/Na-Bent	1,50	NE50/CTAB-Bent	1,80 e 3,00

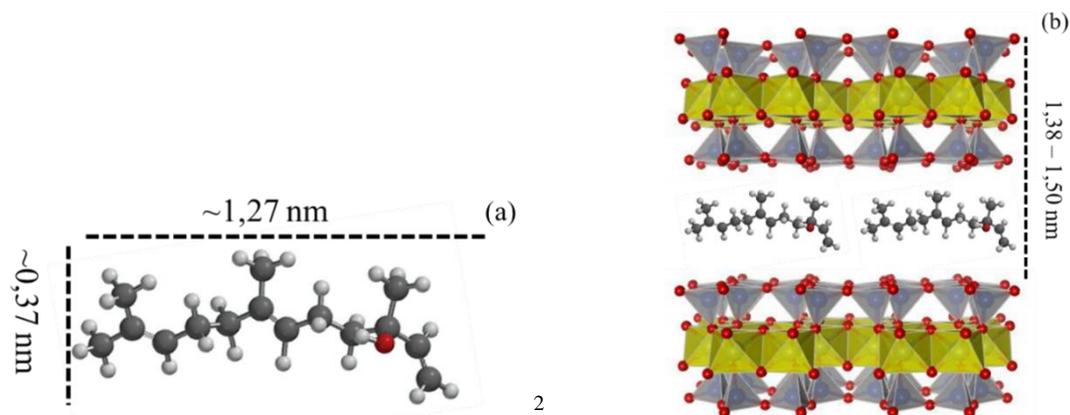
Após a interação da argila com o nerolidol, Figura 4-2i (c)-(f), ocorreram mudanças na reflexão do plano 001 sendo observado valores menores em 2θ para todos os híbridos, o que indica aumento no espaçamento basal possivelmente devido à entrada da molécula orgânica na região interlamelar.

Inicialmente, os maiores valores de d_{001} foram observados para as amostras preparadas em maiores concentrações do óleo, sendo de 1,36 nm, 1,43 nm, 1,48 nm 1,50 nm para os sistemas obtidos com 5, 10, 20 e 30% de nerolidol, respectivamente. Entretanto, nas preparações utilizado 40 e 50% de nerolidol, Figura 4-2i (g)-(h), não se observaram mudanças no espaçamento basal sendo o valor de d_{001} de 1,50 nm.

Considerando o valor da espessura da camada da argila em $\sim 0,96$ nm (DARDER; COLILLA; RUIZ-HITZKY, 2003) e o tamanho estimado do nerolidol, Figura 4-3, os valores do espaço interlamelar livre Δd ($\Delta d = d_{001} - 0,96$ nm) foram de 0,40 nm, 0,47 nm, 0,52 nm, 0,54 nm, 0,54 nm e 0,54 nm para as amostras NE5/Na-Bent, NE10/Na-Bent, NE20/Na-Bent, NE30/Na-Bent, NE40/Na-Bent e NE50/Na-Bent, respectivamente.

Dessa forma, pode-se sugerir que a molécula de nerolidol esteja disposta na região interlamelar em uma configuração de monocamada, em paralelo com a superfície da argila, como sugerido na Figura 4-3 (b).

Figura 4-3: Representação das dimensões da molécula de nerolidol (as esfera pretas, brancas e vermelha representam o átomo de carbono, hidrogênio e oxigênio) (a), e do esquema de intercalação do nerolidol na Na-Bent (b).



Fonte: Próprio autor.

Para a bentonita modificada com CTAB, Figura 4-2ii, houve um significativo aumento do valor do espaçamento basal para 1,82 nm, confirmando a intercalação do surfactante na argila. Esse resultado está em boa concordância com valores de distância basal de bentonitas e montmorillonitas reportados na literatura conforme Tabela 4-3. O valor do espaço interlamelar livre Δd foi em torno de 0,86 nm, próximo aos resultados encontrados na literatura, que

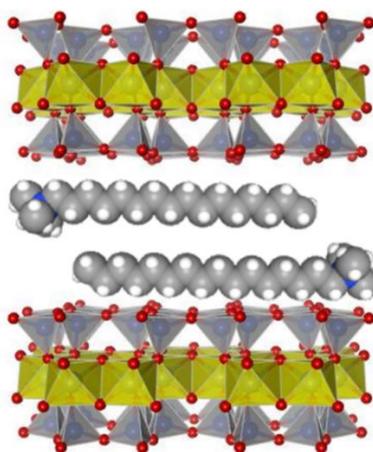
² Valor estimado por Spartan 14 Wavefunction software, Inc. Irvine, CA, USA.

apontam o arranjo em bicamadas do CTAB na região interlamelar da argila (BIANCHI et al., 2013; BRITO et al., 2018; HUANG et al., 2017), conforme ilustrado na Figura 4-4.

Tabela 4-3: Valores de espaçamento basal e quantidade de surfactante utilizados na preparação de montmorillonitas ou bentonitas modificadas com CTAB de acordo com a literatura.

Amostra	Quantidade de surfactante (%)	d (nm)	Referência
Mt	50	1,70	(YANG et al., 2020)
Na-Mt	100	1,91	(DOS SANTOS et al., 2018)
Na-Bent	100	1,90	(BRITO et al., 2018)
Na-Mt	100	1,98	(YAN et al., 2020b)
Na-Mt	100	1,87	(HUANG et al., 2017)
Ca-Mt	200	1,76	(YU et al., 2014)
Na-Mt	100	1,80	(KAR et al., 2019)
Na-Bent	100	1,82	Presente estudo

Figura 4-4: Proposta do arranjo da molécula de CTAB na região interlamelar da bentonita.



Fonte: Próprio autor.

Após a adsorção do nerolidol, Figura 4-2ii, não houve mudanças significativas na reflexão do plano 001 em relação a amostra CTAB-Bent. Tal fato pode indicar que, preferencialmente, o óleo essencial foi adsorvido na superfície da argila organofílica (NAGY et al., 2013). No entanto, um novo plano de reflexão foi observado nas amostras NE30/CTAB-Bent, NE40/CTAB-Bent e NE50/CTAB-Bent, em $2,89^\circ$ ($d = 3,0$ nm), indicando a entrada do nerolidol na região interlamelar. Tal fato pode estar associado à presença de estruturas interlamelares heterogêneas formadas quando adicionado maiores quantidades de óleo ao

sistema. Esses resultados foram similares aos obtidos na incorporação de óleo essencial de orégano, manjeriço e tomilho em montmorillonita organofílica (GIANNAKAS et al., 2017).

4.5.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

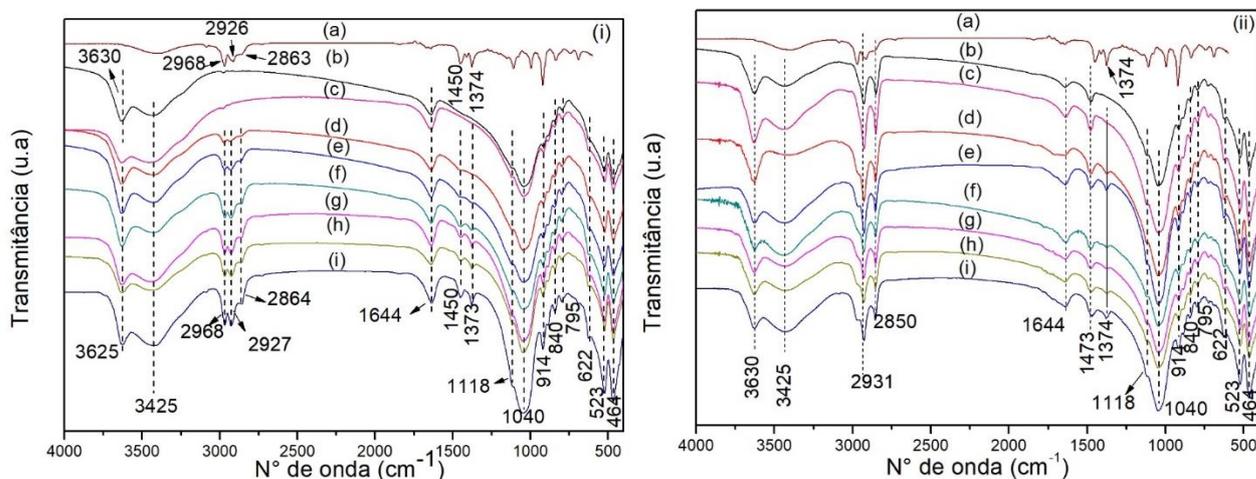
Os espectros de infravermelho do nerolidol e dos sólidos antes e após o contato com nerolidol estão apresentados na Figura 4-5. Inicialmente para a Na-Bent, foram observadas absorções em 3630 cm^{-1} e 3425 cm^{-1} atribuídas aos estiramentos das ligações OH em M-OH (M-OH, M = Al, Mg, Fe) e água, respectivamente (MADEJOVÁ; GATES; PETIT, 2017). As bandas em 1644 cm^{-1} , 1118 cm^{-1} e 1040 cm^{-1} foram atribuídas a deformação OH da água e ao estiramento antissimétrico e simétrico da ligação Si-O, respectivamente (DOS SANTOS et al., 2018; WIŚNIEWSKA; FIJAŁKOWSKA; SZEWCZUK-KARPISZ, 2018).

As absorções em 914 cm^{-1} e 840 cm^{-1} foram associadas à deformação OH em Al-Al-OH e Al-Mg-OH, respectivamente (BIZOVSKÁ; JANKOVIČ; MADEJOVÁ, 2018; MADEJOVÁ; GATES; PETIT, 2017). Além disso, duas bandas em 795 cm^{-1} e uma de menor intensidade em 622 cm^{-1} foram atribuídas a deformação de Al-O-Si no plano e de Al-O-Si fora do plano, respectivamente, (MADEJOVÁ; GATES; PETIT, 2017) enquanto que as absorções em 523 e 464 cm^{-1} foram atribuídas as deformações Si-O-Si (MADEJOVÁ; GATES; PETIT, 2017; WIŚNIEWSKA; FIJAŁKOWSKA; SZEWCZUK-KARPISZ, 2018).

Para a amostra etanol/Bent, não foi possível observar mudanças em relação ao espectro da Na-Bent. No entanto, após a adsorção do nerolidol, Figura 4-5i, novas bandas foram observadas nos espectros, indicando a presença da molécula orgânica. As bandas em $2968 - 2864\text{ cm}^{-1}$ foram referidas aos estiramentos antissimétricos e simétricos da ligação C-H (LIN-VIEN et al., 1991).

As absorções em 1450 e 1373 cm^{-1} foram atribuídas à deformação CH_2 (LIN-VIEN et al., 1991), na mesma região das bandas presentes no nerolidol. Além disso, mudanças na posição das bandas associadas à OH estrutural para menores frequências (Na-Bent: 3630 cm^{-1} , Híbridos nerolidol/argila: 3625 cm^{-1}) podem apontar formação de ligação de hidrogênio entre os grupos OH da argila com o nerolidol.

Figura 4-5: Espectros de infravermelho para (i): (a) Nerolidol, (b) Na-Bent, (c) etanol/Bent e híbridos nerolidol/Na-Bent em (d) NE5/Na-Bent, (e) NE10/Na-Bent, (f) NE20/Na-Bent, (g) NE30/Na-Bent, (h) NE40/Na-Bent e (i) NE50/Na-Bent; (ii) (a) Nerolidol, (b) CTAB-Bent, (c) etanol/CTAB-Bent e híbridos nerolidol/CTAB-Bent em (d) NE5/CTAB-Bent, (e) NE10/CTAB-Bent, (f) NE20/CTAB-Bent, (g) NE30/CTAB-Bent, (h) NE40/CTAB-Bent e (i) NE50/CTAB-Bent.



Nos espectros das argilas organofílica e etanol/CTAB-Bent, Figura 4-5ii (a), todas as bandas presentes na argila sódica foram observadas, sem alteração do número de onda. No entanto, novas bandas indicam a presença do surfactante na argila. Inicialmente, as bandas em $2931 - 2850 \text{ cm}^{-1}$ foram associadas aos estiramentos antissimétricos e simétricos CH (BIZOVSKÁ; JANKOVIČ; MADEJOVÁ, 2018; BRITO et al., 2018). A absorção em 1473 cm^{-1} foi atribuída à deformação CH_2 no plano (BIZOVSKÁ; JANKOVIČ; MADEJOVÁ, 2018; BRITO et al., 2018). Para todos os híbridos após a adsorção do óleo essencial, ambas as vibrações CH foram nítidas e intensas, não mostrando alterações nos números de onda. Além disso, foi possível observar uma nova banda, em 1374 cm^{-1} referente à deformação HCH (LIN-VIEN et al., 1991), coincidindo com a banda no nerolidol na mesma região.

4.5.3 Análise elementar CHN

A quantidade de carbono, hidrogênio e nitrogênio incorporados nos híbridos nerolidol/Na-Bent e nerolidol/CTAB-Bent são mostrados na Tabela 4-4. Para os sólidos Na-Bent e etanol/Bent não foi detectado qualquer teor de carbono e nitrogênio, indicando que as amostras são livres de matéria orgânica e resíduo de solvente.

Para os híbridos nerolidol/Na-Bent, os teores de carbono aumentaram conforme se aumentou a concentração de nerolidol no sistema, Tabela 4-4, sendo um forte indicio da incorporação do OE na argila. A partir dos dados de CHN se calculou a quantidade em mmol de OE incorporado por grama de sólido. A quantidade máxima incorporada foi observada para amostra NE50/Na-Bent, com teor de carbono em 22,3% (18,6 mmol de C por grama de sólido),

o que equivale a 1,24 mmol de nerolidol por grama de argila considerando que cada molécula de óleo possui 15 átomos de C. Esses resultados foram superiores à incorporação de isotiocianato de alila (componente óleo essencial de mostarda) e dialil dissulfeto (componente óleo essencial de alho) em argila bentonita (BERNARDOS et al., 2019).

Para as amostras CTAB-Bent, os resultados são concordantes com aproximadamente total incorporação do surfactante na argila, indicando efetiva interação entre essas espécies. Na amostra Etanol/CTAB-Bent, não houve mudanças significativa no teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio.

Tabela 4-4: Resultados de análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio dos híbridos nerolidol/Na-Bent e nerolidol/CTAB-Bent, assim como a quantidade de nerolidol incorporado (**q**).

Amostras	C		H	N		q
	%	mmol g ⁻¹	%	%	mmol g ⁻¹	
Na-Bent	*	*	0,72	*	*	--
Etanol/Bent	*	*	0,76	*	*	--
NE5/Na-Bent	4,43	3,68	1,39	*	*	0,25
NE10/Na-Bent	7,06	5,88	1,61	*	*	0,40
NE20/Na-Bent	13,9	11,6	2,75	*	*	0,77
NE30/Na-Bent	16,7	14,0	3,00	*	*	0,93
NE40/Na-Bent	18,1	15,1	3,17	*	*	1,01
NE50/Na-Bent	22,3	18,6	3,48	*	*	1,24
CTAB-Bent	15,8	13,3	2,64	1,11	0,79	--
Etanol/ CTAB-Bent	15,8	13,3	2,94	1,15	0,82	--
NE5/CTAB-Bent	22,0	17,6	4,26	0,90	0,64	0,30
NE10/CTAB-Bent	23,8	19,8	4,11	0,92	0,66	0,43
NE20/CTAB-Bent	24,2	20,2	4,12	0,85	0,61	0,46
NE30/CTAB-Bent	24,3	20,5	4,94	0,82	0,58	0,48
NE40/CTAB-Bent	25,6	21,6	4,36	0,85	0,61	0,55
NE50/CTAB-Bent	28,3	23,6	5,37	0,73	0,52	0,69

*Não detectado

Os valores de **q** para as amostras organofílicas com CTAB e óleo foram calculados considerando que não houve dessorção de CTAB após interação da argila organofílica com o óleo. Dessa forma, o total de carbono em mmol por grama observado para as matrizes de NE/CTAB-Bent descontado o total de carbono em CTAB-Bent, indica o teor de óleo que foi incorporado na argila.

Os resultados sugerem que embora a concentração de óleo utilizada seja alta indo de 5 a 50%, não refletiu em maior incorporação do óleo na matriz, possivelmente por efeito de impedimento estérico, tendo em vista que a região interlamelar já esteja previamente ocupada pelos íons do sal de amônio. Portanto, nos híbridos Nerolidol/CTAB-Bent, foi observado teor de carbono crescente com o aumento da concentração de nerolidol, sendo que o máximo incorporado foi de 28,3% (23,6 mmol de C por grama de sólido) correspondendo a quantidade de 0,7 mmol de moléculas de óleo por grama de sólido para a amostra NE50/CTAB-Bent. Esse valor é inferior aos obtidos para os sólidos sem intercalação prévia de sal de amônio.

É bem documentado na literatura a boa afinidade entre as espécies, óleo essencial e argilas organofílicas, sendo associado vários pontos de interação, dentre eles ligação de hidrogênio e principalmente interações hidrofóbicas (GIANNAKAS et al., 2017; NGUEMTCHOUIN et al., 2015).

4.5.4 Atividade antibacteriana

A ação antibacteriana inicial dos híbridos Nerolidol/Na-Bent e Nerolidol/CTAB-Bent foram determinados por contato direto contra bactérias gram negativa: *Escherichia coli* (E. coli); e gram positiva: *Staphylococcus aureus* (S. aureus). A porcentagem de inibição pode ser visualizada na Figura 4-6.

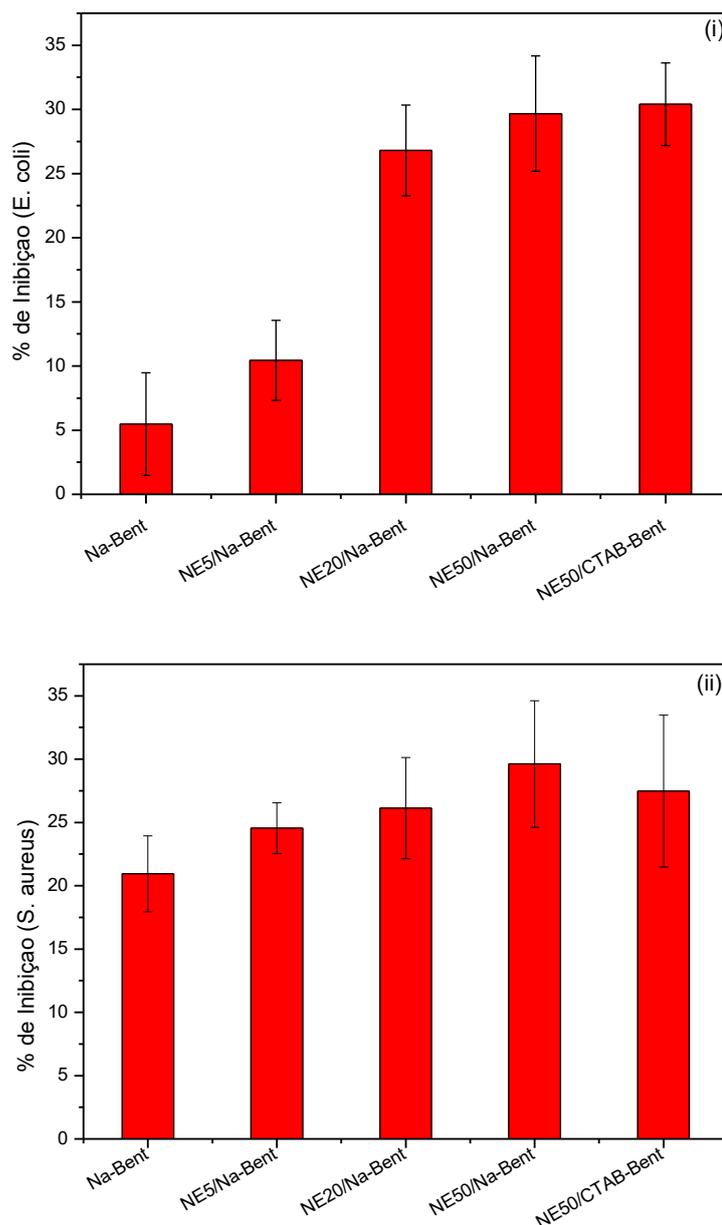
Os híbridos apresentaram atividade antibacteriana contra ambas as cepas Figura 4-6, sendo observado um aumento para as amostras com maior quantidade de nerolidol, com maior atividade para os híbridos NE50/Na-Bent e NE50/CTAB-Bent.

O mecanismo de ação dos óleos essenciais contra bactérias é de múltiplos pontos ao mesmo tempo, causando danos a parede celular, membrana celular e DNA, por exemplo (JU et al., 2019a, 2019b, 2020b). A atividade do nerolidol contra bactérias Gram negativas e Gram positivas é bem documentado na literatura (CHAN et al., 2016; FERREIRA et al., 2016; GONÇALVES et al., 2011; KUHN et al., 2019), sendo atribuída à ruptura da parede celular bacteriana, causando a saída de componentes importantes para o micro-organismo (FERREIRA et al., 2016; INOUE et al., 2004; PARK et al., 2009).

No entanto, o valor da atividade dos híbridos formados pode estar associada à lenta liberação do nerolidol ao sistema. A interação óleo essencial/argila resulta em uma maior estabilidade, o que pode causar uma lenta liberação dos óleos essenciais. Por exemplo,

Bernardos et al., (2019) incorporaram diversos componentes de óleos essenciais em argila bentonita, sendo observado lenta liberação nas primeiras 24 h para a maioria dos componentes, com 40%, 20%, 18%, 20% e 30% para isotiocianato de alila, dialil dissulfeto, carvacrol, eugenol, cinamaldeído e timol. Dessa forma, se faz necessário estudar a liberação de nerolidol dos híbridos Nerolidol/argilas para se obter maiores informações da eficácia dos sistemas preparados.

Figura 4-6: Ação inibitória dos híbridos Nerolidol/Na-Bent e Nerolidol/CTAB-Bent Contra *E. coli* e *S. aureus*.



4.6 Conclusões

Neste estudo foi abordado a incorporação de nerolidol em argila bentonita sódica e organomodificada com CTAB em concentrações crescentes de nerolidol.

A intercalação do nerolidol foi constatada para as argilas na forma sódica e organofílica, sendo observada nova reflexão em baixo ângulo para as amostras NE30/CTAB-Bent, NE40/CTAB-Bent e NE50/CTAB-Bent. O maior teor de carbono foi observado nas amostras com NE50/Na-Bent e NE50/CTAB-Bent.

A ação antibacteriana dos híbridos formados foi determinada pelo método de contato direto, sendo observada baixa atividade antibacteriana, sendo atribuída à lenta liberação de nerolidol. Dessa forma, estudo de liberação dessa molécula se faz necessário para uma melhor avaliação da atividade antibacteriana dos híbridos.

Capítulo 5

Híbridos Clorexidina/bentonita e sua ação antibacteriana

5.1 Introdução

Nos últimos anos, um dos principais “fenômenos” que vem causando problemas à população mundial é a resistência antimicrobiana (NDAGI et al., 2020; YU et al., 2020). Estima-se que em 2050 essa resistência antimicrobiana irá rivalizar, em causa de morte e despesas para o sistema de saúde, com doenças graves como o câncer (MAGENNIS et al., 2016). De fato, as bactérias por exemplo, podem infligir sofrimento significativo aos seres humanos por meio de doenças agudas e crônicas, podendo causar sérios impactos sobre a morbidade e mortalidade (MAGENNIS et al., 2016). Dessa forma, estudos utilizando moléculas farmacológicas eficazes contra micro-organismos vem sendo realizados (SILVA et al., 2016; WU et al., 2019). Entre essas moléculas destaca-se a clorexidina.

A clorexidina é uma molécula farmacológica com elevado poder antisséptico, com atividade contra ampla gama de bactérias (Gram positivas e negativas), fungos e até vírus (BROOKES et al., 2020). Por conta de sua significativa ação antimicrobiana, a clorexidina é utilizada em várias formulações: como para impregnação de cateter venoso urinário ou central (ROSE et al., 2019); para propósitos farmacêuticos na área de odontologia (BROOKES et al., 2020); e em cosméticos de uso tópico como cremes para limpeza da pele, e até mesmo para assepsia de queimaduras e feridas dérmicas (AMBROGI et al., 2017).

No entanto, a incontrolada e rápida liberação de formulações contendo clorexidina, dependendo da aplicação em que é empregada, torna-se a principal desvantagem ou obstáculo enfrentado no uso dessa molécula (LUO et al., 2016; PERARO et al., 2020). Por exemplo, em aplicações odontológicas, o problema relacionado ao seu desempenho oral é a falta de efeitos a longo prazo, ou seja, não mantendo níveis terapêuticos sustentados, o que pode levar a infecções repetitivas (LUO et al., 2016; TABARY et al., 2014).

Assim, estudos de sistemas de liberação controlada de clorexidina vêm sendo realizados, em polímeros (QUEIROZ et al., 2020; SAH; DEWANGAN; SURESH, 2019), sílica (AKRAM et al., 2021; YAN et al., 2018), hidroxiapatitas (KIM; SON; KWON, 2020; SUKHODUB et al., 2018), grafeno (SCAFFARO et al., 2019), e argilominerais, como a Mt (LOBATO-AGUILAR et al., 2020; SUN et al., 2018; ZHANG et al., 2018) por exemplo, em várias faixas de concentração de clorexidina.

Mt é um argilomineral majoritário constituinte de argilas bentonitas. Possui propriedades importantes como estrutura 2:1 (lamelar), capacidade de troca catiônica, carga negativa e grupos hidroxilas disponíveis em sua superfície (BERGAYA; LAGALY, 2013).

Dessa forma, essas características atribuem as argilas bentonitas a capacidade de interação e liberação controlada de diversas moléculas farmacológicas (KHATOON; CHU; ZHOU, 2020), que entre essas espécies, pode-se destacar a clorexidina (LOBATO-AGUILAR et al., 2020; SUN et al., 2018; ZHANG et al., 2018). No entanto, estudos voltados em investigar a cinética de liberação de digluconato de clorexidina em bentonita são escassos, principalmente nos trabalhos que investigam a versatilidade do sistema em diferentes meios de liberação (simulando meio tópico e bucal). Assim, o objetivo desse trabalho é estudar a incorporação e a liberação de digluconato de clorexidina, em várias concentrações, em argila bentonita sódica. A atividade antibacteriana dos híbridos Clorexidina/Bent formados contra bactérias Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) e Gram negativa (*Escherichia coli*) foram também avaliadas.

5.2 Parte experimental

5.2.1 Reagentes químicos

- ✓ Digluconato de clorexidina 20% (Fórmula molecular: $C_{22}H_{30}C_{12}N_{10}$ e número CAS: 18472-51-0) foi obtido da Sigma-Aldrich.

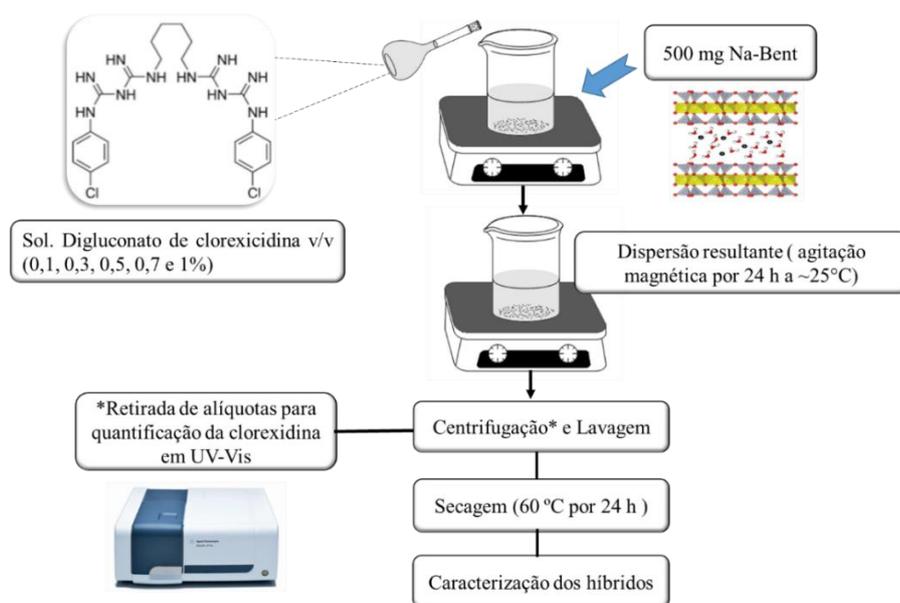
5.2.2 Bentonita sódica

A bentonita utilizada foi a mesma descrita no item 4.2.2.

5.2.3 Síntese do híbrido Clorexidina/Argila

Inicialmente foram preparadas soluções aquosas de digluconato de clorexidina em diferentes concentrações v/v (0,1, 0,3, 0,5, 0,7 e 1%), apresentando pH 6,5. Em seguida, em 50 mL de cada solução de digluconato de clorexidina, foram adicionados 500 mg de Na-Bent vagarosamente, a fim de evitar que a clorexidina precipitasse. Os sistemas resultantes permaneceram sob agitação magnética por 24 h a 25 °C. Após todo processo, o valor do pH final dos sistemas esteve entre 6,2-6,4 sem qualquer ajuste. As amostras resultantes foram centrifugadas, lavadas com água deionizada e secas a 60 °C por 24 h, sendo os sólidos por fim, caracterizados. Os híbridos obtidos foram nomeados como Clo0,1/Bent, Clo0,3/Bent, Clo0,5/Bent, Clo0,7/Bent e Clo1/Bent. Um esquema ilustrativo resumindo todo o processo reacional pode ser visualizado na Figura 5-1.

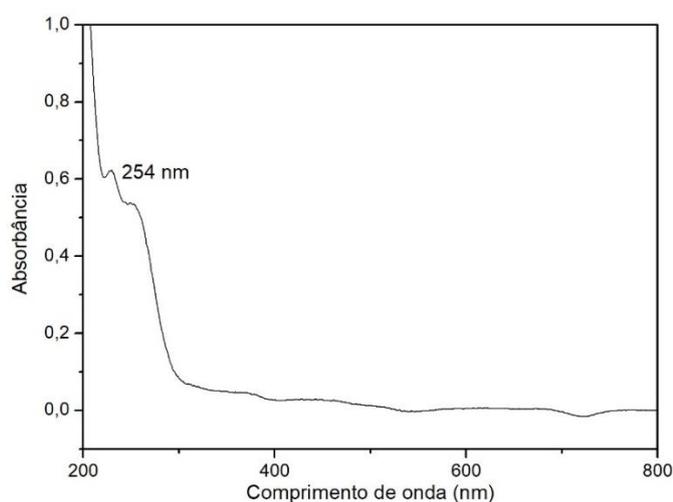
Figura 5-1: Esquema ilustrativo da incorporação de digluconato de clorexidina em argila bentonita.



Fonte: Próprio autor.

A quantidade incorporada de clorexidina foi determinada por espectroscopia UV-Vis em equipamento Agilent, modelo Cary 60. O comprimento de onda utilizado foi de 254 nm, Figura 5-2, correspondendo ao comprimento de onda máximo da clorexidina (PERARO et al., 2020). A análise foi feita em triplicata.

Figura 5-2: Espectro de absorção molecular da clorexidina.



Fonte: Próprio autor.

A quantidade incorporada em mg/g, foi calculada utilizando a Equação 5-1, em que C_i é a concentração inicial da clorexidina (mg/L), C_e a concentração da clorexidina no equilíbrio (mg/L), m a massa da argila (g) e V o volume da solução de clorexidina (L).

$$q = \frac{(C_i - C_e)xV}{m} \quad (5-1)$$

5.3 Técnicas de caracterização

5.3.1 Difração de raios X (DRX)

As análises foram realizadas de acordo com o item 3.3.1.

5.3.2 Medidas de potencial Zeta

As medidas de potencial Zeta foram obtidas no Núcleo de Pesquisa e Extensão Laboratório de Combustíveis e Materiais (NPE-Lacom - UFPB), utilizando um equipamento de espalhamento de luz dinâmico da Malven, modelo ZetaSizer Nano-ZS90.

5.3.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

As análises foram realizadas de acordo com o item 3.3.2.

5.4 Atividade antibacteriana

As análises foram realizadas de acordo com o item 4.5.4.

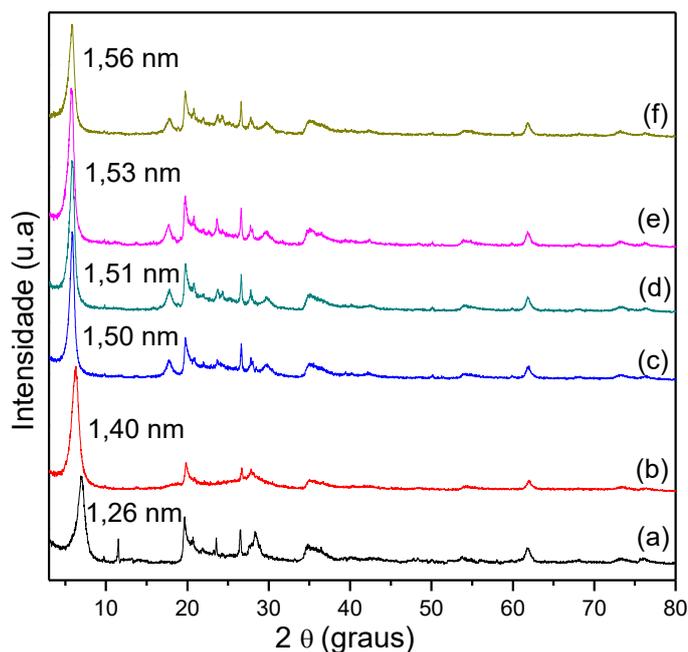
5.5 Resultados e Discussão

Nessa seção será abordado a formação e caracterização de híbridos clorexidina/bentonita que foram avaliados por técnicas de difração de raios X e espectroscópica (FTIR). As análises de UV-Vis permitiram quantificar a clorexidina incorporada na matriz argilosa e a atividade antibacteriana dos híbridos obtidos foi também investigada utilizando o ensaio de contato direto contra bactérias Gram positiva e Gram negativa.

5.5.1 Difração de raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X das amostras Na-Bent e seus híbridos com clorexidina, são apresentados na Figura 5-3. Para a Na-Bent, os resultados de DRX foram discutidos no item 4.5.1.

Figura 5-3: Difratoogramas de raios X para (a) Na-Bent e híbridos clorexidina/Bent em (b) Clo0,1/Bent, (c) Clo0,3/Bent, (d) Clo0,5/Bent, (e) Clo0,7/Bent e (f) Clo1/Bent.



Após a incorporação da clorexidrina, foi observado aumento nos valores da distância basal de 1,26 nm chegando ao máximo de 1,56 nm conforme os valores apresentados na Tabela 5-1, indicando a entrada dessa molécula na região interlamelar da argila. Com exceção a amostra Clo0,1/Bent, Figura 5-3 (b), as demais amostras indicaram um valor de espaçamento basal similar, mesmo com o aumento da concentração e maior quantidade incorporada de clorexidrina, conforme pode ser visto na Tabela 5-1.

Tabela 5-1: Quantidades incorporadas de clorexidrina, valores de espaçamento basal (d) e distancia interlamelar (Δd) dos híbridos clorexidina/Bent.

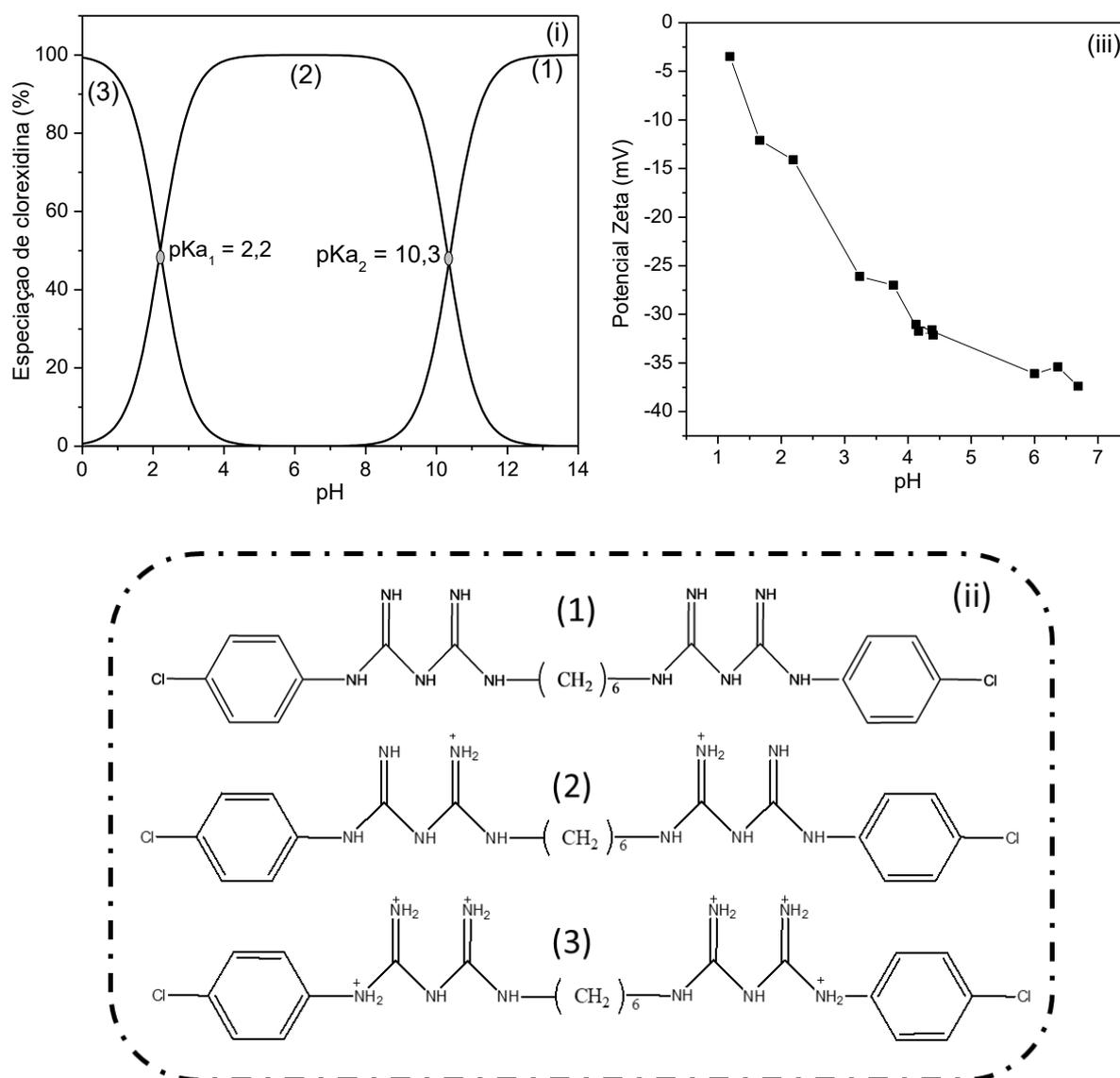
Amostra	Quantidade incorporada (mg g ⁻¹)	Distância basal d (nm)	Δd^* (nm)
Clo0,1-Bent	61	1,40	0,44
Clo0,3-Bent	315	1,50	0,54
Clo0,5-Bent	406	1,51	0,55
Clo0,7-Bent	528	1,53	0,57
Clo1-Bent	689	1,56	0,60

* $\Delta d = d - 0,96$

A intercalação em argilas/argilominerais depende de alguns fatores, dentre eles por exemplo, das interações eletrostáticas entre as superfícies do silicato (para o caso da bentonita

carregada negativamente) e a possível molécula a ser intercalada. O digluconato de clorexidina é uma bisguanida com dois valores de pKa, $pK_{a1} = 10,3$ e $pK_{a2} = 2$ (AGARWAL et al., 2012; AMBROGI et al., 2017), conforme observado no diagrama de espécies da clorexidina na Figura 5-4 i-ii.

Figura 5-4: (i) Diagrama de espécies da clorexidina; (ii) clorexidina (1) neutra, (2) diprotonada (3) tetraprotonada; e (iii) potencial zeta da argila bentonita.



Após a adsorção, as soluções resultantes do sistema apresentaram valores de pH entre 6,2-6,4, sem qualquer tipo de ajuste. Nesse pH, há total predominância (100%) da forma dicatiônica da clorexidina, Figura 5-4 i-ii, que somado ao caráter negativo em toda faixa de pH da Na-Bent, Figura 5-4 iii, pode ter facilitado a interação das espécies por troca catiônica entre o sódio interlamelar da argila e os ions orgânicos predominantes em solução. Em outras palavras, a entrada da molécula de clorexidina na região interlamelar da argila é atribuída aos

grupos protonados positivos presente nessa molécula sendo que pra cada mol de íon orgânico que entra 1 mol de sódio é liberado para solução. Essa interpretação concorda com outros trabalhos de incorporação de clorexidina em montmorillonita (AMBROGI et al., 2017; BELLO et al., 2015; MENG et al., 2009a; SUN et al., 2018).

É conhecido que a espessura da camada inorgânica da Mt é por volta de 0,96 nm (DARDER; COLILLA; RUIZ-HITZKY, 2003). Dessa forma, os valores do espaçamento interlamelar nos híbridos aumentaram na sequência Clo0,1/Bent, Clo0,3/Bent, Clo0,5/Bent, Clo0,7/Bent e Clo1/Bent, respectivamente. Os valores são muito próximos do tamanho da altura do anel clorofenólico da clorexidina (0,5 nm) (MENG et al., 2009a, 2009b). Assim, é suposto que essa molécula esteja adotando um arranjo em monocamada lateral na região interlamelar da argila (MENG et al., 2009a; SUN et al., 2018).

5.5.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

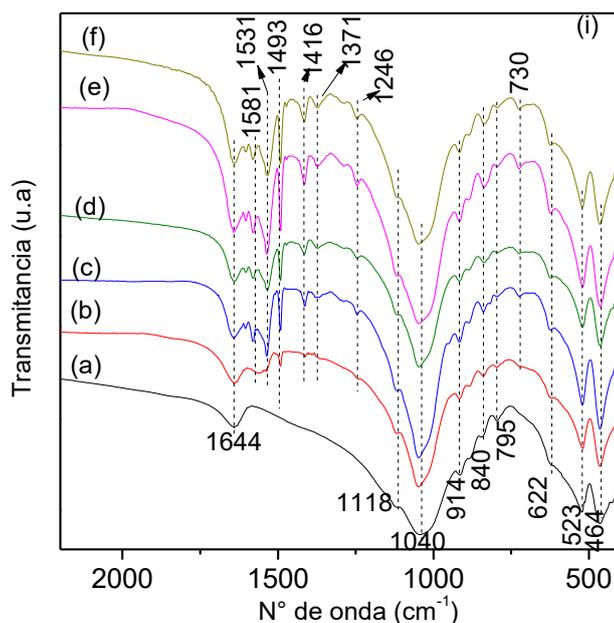
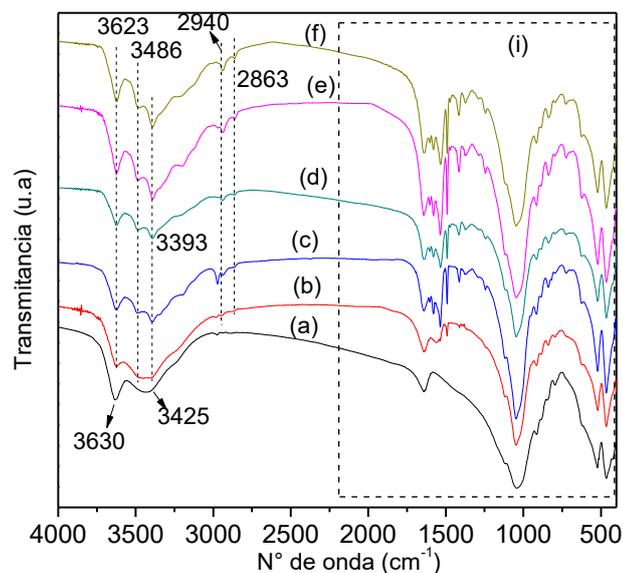
Os espectros de infravermelho dos sólidos antes e após a incorporação de clorexidina estão presentes na Figura 5-5. O espectro na região do IV para a amostra Na-Bent foi discutido anteriormente no item 4.5.2.

Após a incorporação da clorexidina, novas bandas foram observadas, indicando a presença dessa molécula, Figura 5-5. As bandas em 3393, 2940 e 2863 cm^{-1} foram atribuídas ao estiramento N-H e ao estiramento antissimétrico e simétrico de grupos CH, respectivamente (LIN-VIEN et al., 1991; SAHA; BUTOLA; JOSHI, 2014; YANG et al., 2007).

As absorções em 1581 e 1531 cm^{-1} , foram associadas à vibrações C=C aromático (PAL et al., 2009). As bandas em 1493, 1416 e 1371 cm^{-1} foram atribuídas às vibrações C-N-H e deformação CH_2 , respectivamente (LIN-VIEN et al., 1991; ONNAINTY et al., 2016). As absorções 1246 e 730 cm^{-1} foram relacionadas aos estiramentos C-N e C-Cl, respectivamente (LIN-VIEN et al., 1991; WU et al., 2013).

Além disso, observou-se deslocamentos das bandas de OH estrutural para menores frequências na Na-Bent de 3630 cm^{-1} para 3623 cm^{-1} para os híbridos clorexidina/argila: indicam a ocorrência de ligação de hidrogênio entre os grupos nitrogenados da clorexidina e os grupos OH da argila.

Figura 5-5: Espectros de infravermelho para (a) Na-Bent e híbridos clorexidina/Bent em (b) Clo0,1/Bent, (c) Clo0,3/Bent, (d) Clo0,5/Bent, (e) Clo0,7/Bent e (f) Clo1/Bent.



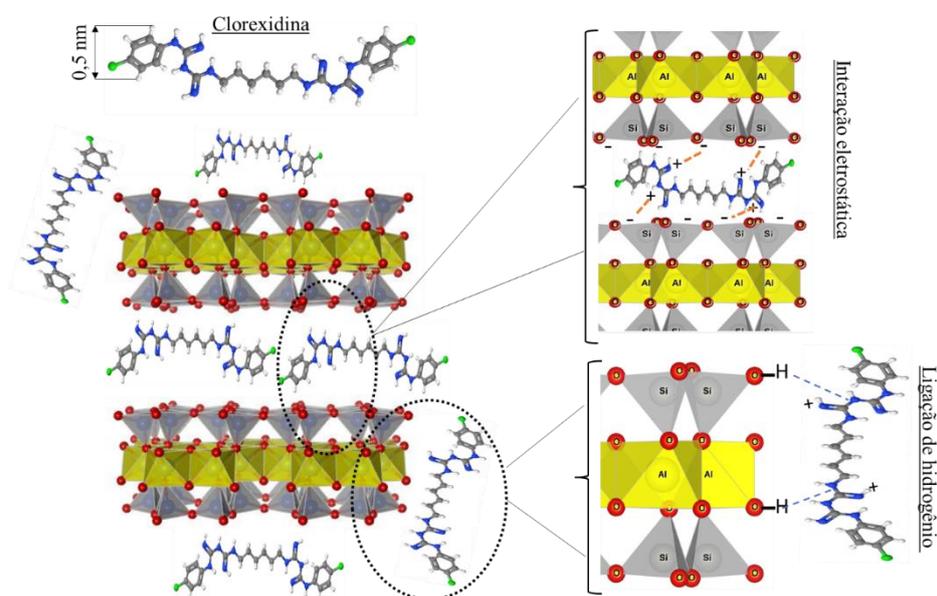
5.5.3 Proposta de mecanismos de interação entre clorexidina e bentonita

Pelos resultados de difração de raios X, foi observada a intercalação da clorexidina na região interlamelar da argila bentonita, sendo atribuída possivelmente à atração eletrostática entre essas espécies (superfície negativa da argila e grupos protonados na clorexidina). No entanto, a máxima incorporação de clorexidina foi de 689 mg g^{-1} , Tabela 5-1, que corresponde a aproximadamente 1,36 mmol do íon por grama. Considerando que o íon divalente foi predominante em solução, estima-se que o valor está muito acima da CTC da argila ($\sim 164\%$),

o que indica que outros mecanismos podem estar envolvidos na interação de clorexidina com bentonita. Uma possível incorporação pode ocorrer na superfície de bordas da argila e na superfície recoberta por grupos OH via ligações de hidrogênio entre a molécula orgânica e a argila conforme indicado pelos resultados de espectroscopia de infravermelho.

Dessa forma, uma proposta de mecanismo de interação pode ser observada na Figura 5-6 que sugerem a presença do íon divalente da molécula orgânica na região interlamelar, mas também presença na superfície via ligação de hidrogênio.

Figura 5-6: Proposta de mecanismos de interação entre a clorexidina e a argila bentonita.



Fonte: Próprio autor

5.5.4 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana das amostras contra *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), foram determinadas pelo método de contato direto. As imagens das placas contendo as colônias de bactérias e a porcentagem de inibição, podem ser visualizadas nas Figuras 5-7, 5-8 e 5-9.

Nas imagens das placas de Petri, Figura 5-7 e 5-8, observa-se a formação de colônias bacterianas, sendo as maiores quantidades dessas colônias bacterianas observadas nas placas de controle (Figura 5-7 (a) e 5-8 (a)) para ambas as bactérias. Dessa forma, essas placas foram usadas como parâmetros para as demais amostras.

Os resultados do ensaio de contato direto sugeriram que a amostra Na-Bent apresentou baixa atividade antibacteriana contra ambas as cepas, com valor de inibição em 5,46% e 20,94%

para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. Esse comportamento foi também observado em outros trabalhos (HE et al., 2006; LOBATO-AGUILAR et al., 2020; SAHA; BUTOLA; JOSHI, 2014), o que indica que a argila possui baixa ação antibacteriana, principalmente contra a Gram-negativa *E. coli*.

Figura 5-7: Imagens das placas de Petri mostrando as colônias de Escherichia coli (*E. coli*) formadas após o contato direto bacteriano, com (a) controle e amostras (b) Na-Bent, (c) Clo0,1/Bent, (d) Clo0,3/Bent, (e) Clo0,5/Bent, (f) Clo0,7/Bent e (g) Clo1/Bent.

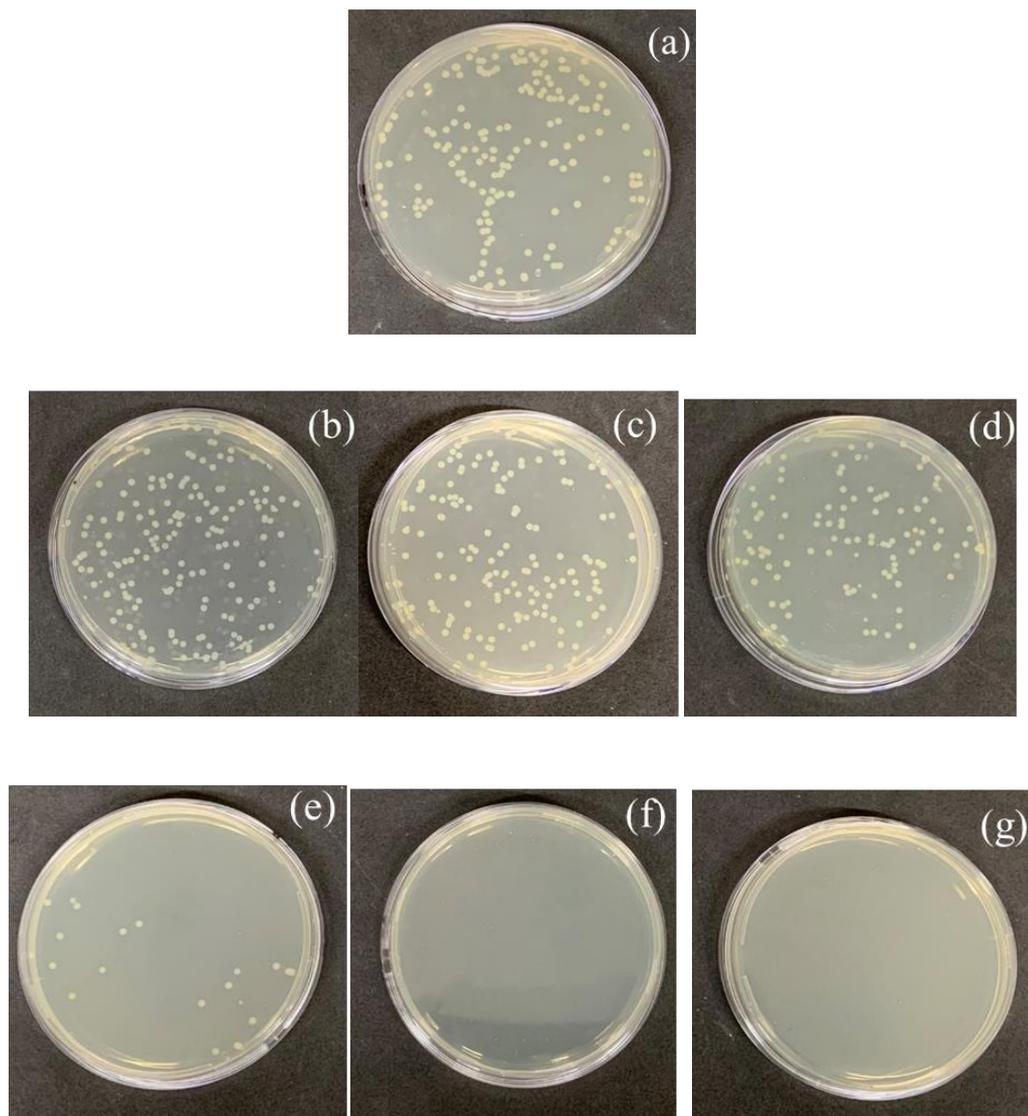
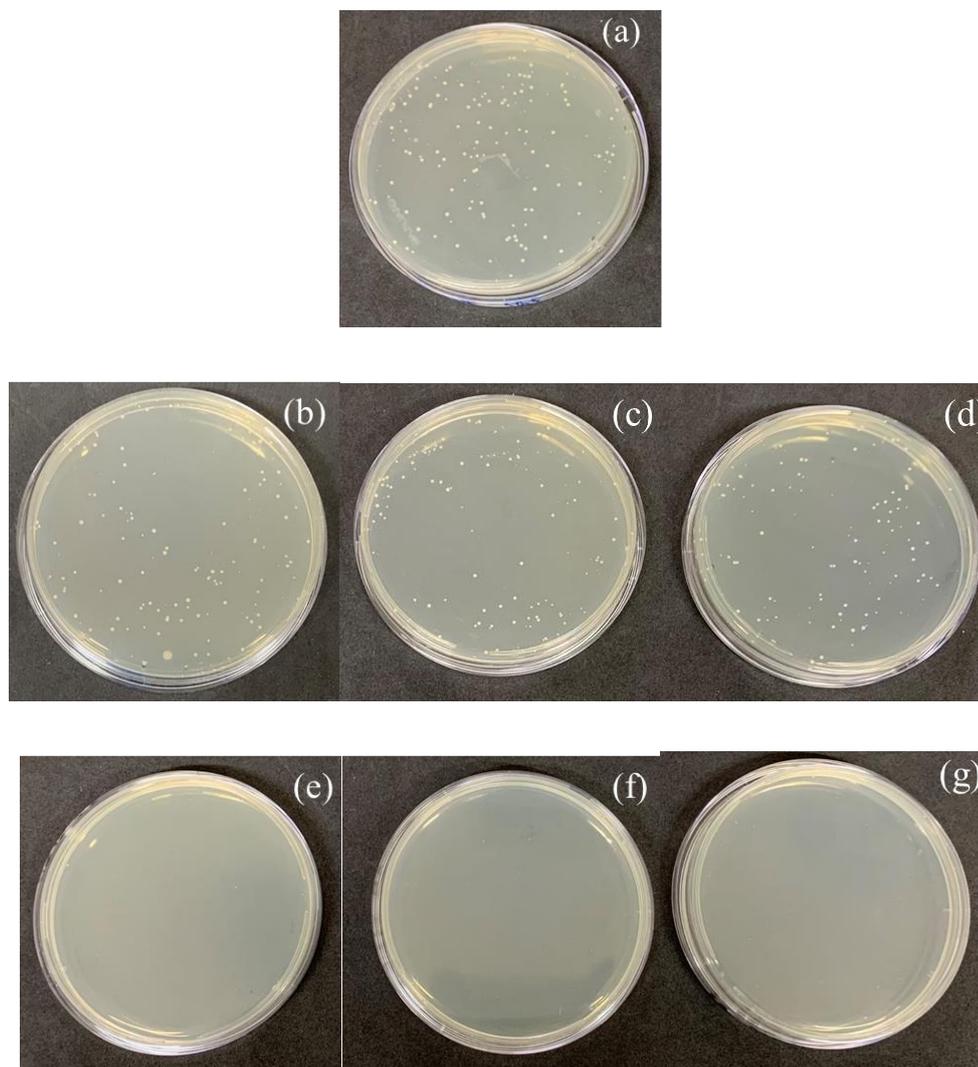
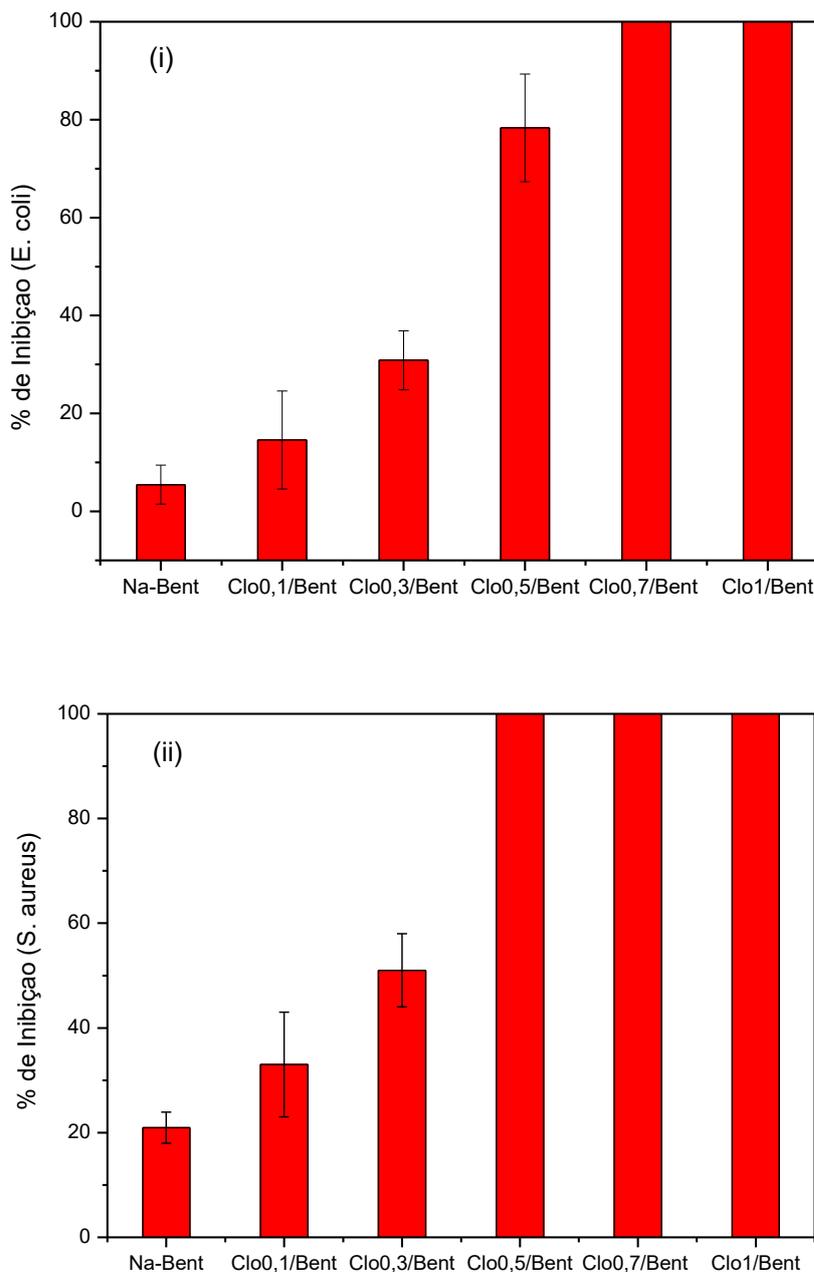


Figura 5-8: Imagens das placas de Petri mostrando as colônias de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) formadas após o contato direto bacteriano, com (a) controle e amostras (b) Na-Bent, (c) Clo0,1/Bent, (d) Clo0,3/Bent, (e) Clo0,5/Bent, (f) Clo0,7/Bent e (g) Clo1/Bent.



Para as amostras contendo clorexidina, os resultados da atividade antibacteriana mostraram significativa ação contra ambas as cepas com o aumento da quantidade incorporada de clorexidina, sendo alcançado 100% de inibição. Por exemplo, contra a *E. coli*, foi observado um aumento da ação antibacteriana com o aumento da concentração de clorexidina, sendo alcançado a máxima inibição, Figura 5-9 (i), a partir da amostra Clo0,7/Bent, que possui 528 mg g⁻¹ de clorexidina incorporada (Tabela 5-1).

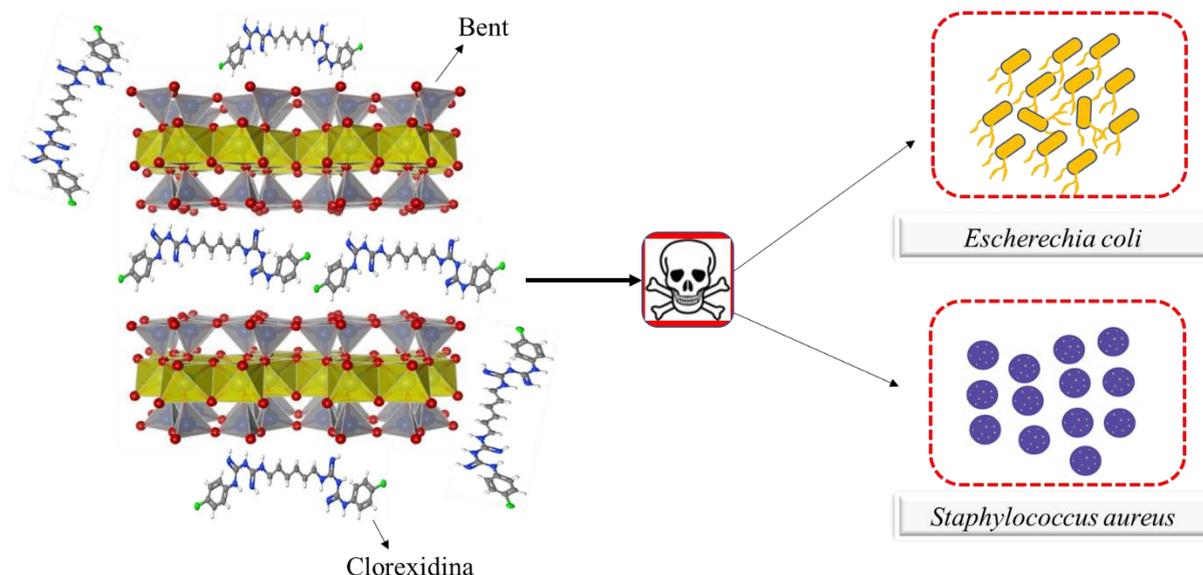
Figura 5-9: Potencial inibitório das amostras (a) Na-Bent e seus híbridos com clorexidina (b) Clo0,1/Bent, (c) Clo0,3/Bent, (d) Clo0,5/Bent, (e) Clo0,7/Bent e (f) Clo1/Bent, contra (i) *E. coli* e (ii) *S. aureus*.



No caso do efeito inibitório das amostras contra *S. aureus*, houve também um aumento do efeito antibacteriano das amostras com o acréscimo da quantidade de clorexidina incorporada, que, no entanto, difere do sistema contra a *E. coli*, em que a amostra Clo0,5/Bent, com quantidade de clorexidina incorporada inferior (406 mg g^{-1}), alcançou o valor de inibição em 100%. Tal fato pode estar associado à parede celular das bactérias Gram-negativas que contém uma membrana externa, que entre suas funções, pode servir como “barreira molecular” ocasionando a maior resistência dessas bactérias em relação as Gram-positivas (DIK; FISHER;

MOBASHERY, 2018; RUHAL; KATARIA, 2021). Dessa forma, maiores quantidades de clorexidina seriam necessárias para que ocorra total inibição das cepas de *E. coli* em relação a *S. aureus*, como foi observado nas Figuras 5-7, 5-8 e 5-9. Na Figura 5-10, pode ser observado um resumo ilustrativo da ação antimicrobiana dos híbridos Clo/Bent.

Figura 5-10: Ação antibacteriana dos híbridos clorexidina/Bentonita.



Fonte: Próprio autor.

5.6 Conclusões

Neste trabalho foi investigado a incorporação de digluconato de clorexidina em argila bentonita sódica em diferentes concentrações de digluconato de clorexidina, cujos híbridos foram avaliados como agentes antimicrobianos frente as bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

Os resultados das caracterizações sugeriram a formação de híbridos de intercalação de clorexidina com a montmorillonita. Altos teores da clorexidrina foram incorporados na matriz inorgânica sugerindo uma alta afinidade do fármaco pela montmorillonita possivelmente associada a processo de troca catiônica. Além disso, ligações de hidrogênio podem ter facilitado ainda mais a interação e formação dos híbridos clorexidina/Bent.

A ação antibacteriana dos híbridos formados foi determinada pelo método de contato direto, e em alguns casos foi efetiva para ambas as cepas. A atividade antibacteriana foi diretamente proporcional a quantidade de clorexidina incorporada, sendo observado a total eliminação das bactérias para os híbridos com maiores quantidades de clorexidina.



6.1 Considerações finais

Nesse trabalho, foram sintetizados híbridos à base de biomoléculas e agentes antibacterianos com montmorillonitas e bentonitas. A afinidade dessas moléculas orgânicas com a argila foi comprovada por várias técnicas de caracterização.

No primeiro estudo foi utilizado uma biomolécula importante: o RNA. Os híbridos obtidos à base de RNA com montmorillonitas foram confirmados por diversas técnicas, sendo observado que em pH ácido essa biomolécula penetra na região interlamelar do argilomineral per meio de atração eletrostática de grupos amino protonados em sua estrutura com a superfície negativa da Mt. Nos espectros de ressonância magnética nuclear de ^{31}P e ^{13}C , indicaram respectivamente, a contribuição dos cátions interlamelares e a protonação de bases nitrogenadas, principalmente adenine e citosina, pelo aparecimento de deslocamentos químicos específicos.

No segundo estudo, os híbridos aqui formados foram à base de nerolidol, uma biomolécula com várias bioatividades, com argila bentonita sódica e organomodificada com CTAB. O componente de óleo essencial foi incorporado na superfície interna e externa das argilas. Para as amostras organomodificadas com CTAB, refletiu em uma distância interlamelar em 3,00 nm com a incorporação de nerolidol, indicando formação de estruturas interlamelares heterogêneas. Altos teores de nerolidol foram incorporados nas argilas, no entanto, a baixa atividade antibacteriana desses híbridos sugere lenta liberação de nerolidol do sistema.

Finalmente, os híbridos obtidos foram à base de digluconato de clorexidina e bentonita sódica. A intercalação da clorexidina foi constatada nos resultados de difração de raios X. O alto grau de incorporação de clorexidina refletiu em elevada ação antibacteriana dos sistemas, sendo alcançado em alguns casos, 100% de inibição. Apesar de ainda preliminares, esses resultados podem fornecer um melhor direcionamento na formação desse sistema, considerando as possibilidades e versatilidades desse híbrido formado.

6.2 Perspectivas

Diante dos resultados apresentados, para trabalhos futuros sugere-se:

- ✓ Avaliar a estabilidade térmica dos híbridos à base de nerolidol ou clorexidina com argila bentonita;

- ✓ Investigar a liberação controlada dessas espécies em diferentes meios;
- ✓ Reavaliar a atividade antibacteriana dos híbridos à base de nerolidol/argilas;
- ✓ Realizar ensaios de toxicidade dos híbridos formados;
- ✓ Realizar a incorporação de ambas biomoléculas, nerolidol e clorexidina, em diferentes argilominerais encontrados nos estados da Paraíba e do Piauí, como vermiculita e paligorsquita, respectivamente, visando verificar a influência da superfície na reatividade e liberação controlada frente às biomoléculas.



7 Referências bibliográficas

- ABDOLLAHI, M.; REZAEI, M.; FARZI, G. Influence of chitosan/clay functional bionanocomposite activated with rosemary essential oil on the shelf life of fresh silver carp. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 3, p. 811–818, 2014.
- ACEVEDO-FANI, A. et al. Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 47, p. 168–177, 2015.
- AGARWAL, A. et al. Polymeric multilayers that localize the release of chlorhexidine from biologic wound dressings. **Biomaterials**, v. 33, n. 28, p. 6783–6792, 2012.
- AKOUCHE, M. et al. Phosphoribosyl Pyrophosphate: A Molecular Vestige of the Origin of Life on Minerals. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 56, n. 27, p. 7920–7923, 2017.
- AKRAM, Z. et al. Formulation of pH-sensitive chlorhexidine-loaded/mesoporous silica nanoparticles modified experimental dentin adhesive. **Materials Science and Engineering C**, v. 122, n. December 2020, p. 111894, 2021.
- ALBOOFETILEH, M. et al. Antimicrobial activity of alginate/clay nanocomposite films enriched with essential oils against three common foodborne pathogens. **Food Control**, v. 36, n. 1, p. 1–7, 2014.
- ALBOOFETILEH, M. et al. Morphological, physico-mechanical, and antimicrobial properties of sodium alginate-montmorillonite nanocomposite films incorporated with marjoram essential oil. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 5, p. e13596, maio 2018.
- ALCOLEA PALAFOX, M. et al. Relationships observed in the structure and spectra of uracil and its 5-substituted derivatives. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 75, n. 4, p. 1261–1269, abr. 2010.
- ALEXANDRE, E. M. C. et al. Gelatin-based films reinforced with montmorillonite and activated with nanoemulsion of ginger essential oil for food packaging applications. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 10, p. 87–96, 2016.

- AMBROGI, V. et al. Montmorillonite–chitosan–chlorhexidine composite films with antibiofilm activity and improved cytotoxicity for wound dressing. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 491, p. 265–272, 2017.
- AN, N. et al. Immobilization of enzymes on clay minerals for biocatalysts and biosensors. **Applied Clay Science**, v. 114, p. 283–296, set. 2015.
- ANDRUSHCHENKO, V.; BOUŘ, P. Infrared absorption detection of metal ion-deoxyguanosine monophosphate binding: Experimental and theoretical study. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 1, p. 283–291, 2009.
- AUMEERUDDY-ELALFI, Z. et al. Selected essential oils inhibit key physiological enzymes and possess intracellular and extracellular antimelanogenic properties in vitro. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 1, p. 232–243, 2018.
- AZEREDO, H. M. C. DE. Nanocomposites for food packaging applications. **Food Research International**, v. 42, n. 9, p. 1240–1253, 2009.
- BANYAY, M.; SARKAR, M.; GRÄSLUND, A. A library of IR bands of nucleic acids in solution. **Biophysical Chemistry**, v. 104, n. 2, p. 477–488, jun. 2003.
- BARROS SILVA SOARES DE SOUZA, E. P. et al. Anti-inflammatory effect of nano-encapsulated nerolidol on zymosan-induced arthritis in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 135, n. November 2019, p. 110958, jan. 2020.
- BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of Essential Oils**. 2nd Editio ed. [s.l.] CRC Press, 2016.
- BEALL, G. W. et al. Analysis of oligonucleotide DNA binding and sedimentation properties of montmorillonite clay using ultraviolet light spectroscopy. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 1, p. 105–112, 2009.
- BELLO, M. L. et al. Sodium montmorillonite/amine-containing drugs complexes: New insights on intercalated drugs arrangement into layered carrier material. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–20, 2015.
- BENEDETTI, E. et al. Determination of the relative amount of nucleic acids and proteins in leukemic and normal lymphocytes by means of fourier transform infrared microspectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 51, n. 6, p. 792–797, 1997.

- BENETOLI, L. O. D. B. et al. Adsorption of nucleic acid bases on clays: An investigation using Langmuir and Freundlich isotherms and FT-IR spectroscopy. **Monatshefte fur Chemie**, v. 139, n. 7, p. 753–761, 2008.
- BERGAYA, F.; JABER, M.; LAMBERT, J. Clays and Clay Minerals. In: **Rubber-Clay Nanocomposites**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011. p. 1–44.
- BERGAYA, F.; LAGALY, G. General Introduction: Clays, Clay Minerals, and Clay Science. In: 2. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2013. v. 97p. 1–19.
- BERNARDOS, A. et al. The efficacy of essential oil components loaded into montmorillonite against *Aspergillus niger* and *Staphylococcus aureus*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 34, n. 3, p. 151–162, 2019.
- BHAVANIRAMYA, S. et al. Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 49–55, jun. 2019.
- BIANCHI, A. E. et al. ODTMA⁺ and HDTMA⁺ organo-montmorillonites characterization: New insight by WAXS, SAXS and surface charge. **Applied Clay Science**, v. 83–84, p. 280–285, 2013.
- BILIA, A. R. et al. Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1–14, 2014.
- BIZOVSKÁ, V.; JANKOVIČ, L.; MADEJOVÁ, J. Montmorillonite modified with unconventional surfactants from the series of octylammonium-based cations: Structural characterization and hydration properties. **Applied Clay Science**, v. 158, n. March, p. 102–112, 2018.
- BLACK, C. B.; HUANG, H. W.; COWAN, J. A. Biological coordination chemistry of magnesium, sodium, and potassium ions. Protein and nucleotide binding sites. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 135–136, n. C, p. 165–202, 1994.
- BORGES, R. S. et al. *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 229, n. April 2018, p. 29–45, jan. 2019.

- BRITO, D. F. et al. Organophilic bentonites obtained by microwave heating as adsorbents for anionic dyes. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 6, p. 7080–7090, dez. 2018.
- BROOKES, Z. L. S. et al. Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review. **Journal of Dentistry**, v. 103, n. July, 2020.
- CADARS, S. et al. New insights into the molecular structures, compositions, and cation distributions in synthetic and natural montmorillonite clays. **Chemistry of Materials**, v. 24, n. 22, p. 4376–4389, 2012.
- CADE-MENUN, B. J. Characterizing phosphorus in environmental and agricultural samples by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Talanta**, v. 66, n. 2 SPEC. ISS., p. 359–371, 2005.
- CAI, P. et al. Soil colloids-bound plasmid DNA: Effect on transformation of E. coli and resistance to DNase I degradation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 5, p. 1007–1013, 2007.
- CAI, P.; HUANG, Q.; ZHANG, X. Microcalorimetric studies of the effects of MgCl₂ concentrations and pH on the adsorption of DNA on montmorillonite, kaolinite and goethite. **Applied Clay Science**, v. 32, n. 1–2, p. 147–152, 2006.
- CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v. 54, p. 111–119, 2015.
- CAMPOS-REQUENA, V. H. et al. The synergistic antimicrobial effect of carvacrol and thymol in clay/polymer nanocomposite films over strawberry gray mold. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 390–396, 2015a.
- CAMPOS-REQUENA, V. H. et al. Polymer/clay nanocomposite films as active packaging material: Modeling of antimicrobial release. **European Polymer Journal**, v. 71, p. 461–475, 2015b.
- CAMPOS-REQUENA, V. H. et al. Short- and long-term loss of carvacrol from polymer/clay nanocomposite film - a chemometric approach. **Polymer International**, v. 65, n. 5, p. 483–490, maio 2016.

CAMPOS-REQUENA, V. H. et al. Thermoplastic starch/clay nanocomposites loaded with essential oil constituents as packaging for strawberries – In vivo antimicrobial synergy over *Botrytis cinerea*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 129, p. 29–36, jul. 2017.

CAMPOS-REQUENA, V. H. et al. Release of essential oil constituent from thermoplastic starch/layered silicate bionanocomposite film as a potential active packaging material. **European Polymer Journal**, v. 109, n. December 2017, p. 64–71, dez. 2018.

CARNEIRO, C. E. A. et al. Adsorption of Adenine, Cytosine, Thymine, and Uracil on Sulfide-Modified Montmorillonite: FT-IR, Mössbauer and EPR Spectroscopy and X-Ray Diffractometry Studies. **Origins of Life and Evolution of Biospheres**, v. 41, n. 5, p. 453–468, 30 out. 2011.

CARRASCOZA MAYÉN, J. F. et al. Prebiotic Soup Components Trapped in Montmorillonite Nanoclay Form New Molecules: Car-Parrinello Ab Initio Simulations. **Life**, v. 9, n. 2, p. 46, 4 jun. 2019.

CARVALHO, S. G. et al. Advances and challenges in nanocarriers and nanomedicines for veterinary application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 580, n. January, 2020.

CASES, J. M. et al. Mechanism of adsorption and desorption of water vapor by homoionic montmorillonite. 3. The Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} and Ba^{2+} exchanged forms. **Clays and Clay Minerals**, v. 45, n. 1, p. 8–22., 1997.

CAVALCANTE, M. S. et al. Organophilization of a Brazilian Mg-montmorillonite without prior sodium activation. **Clay Minerals**, v. 51, n. 1, p. 39–54, 2 mar. 2016.

CAVALCANTI, G. R. S. et al. Inorganic-organic hybrid pigments based on carminic acid and clay minerals. **Dyes and Pigments**, v. 190, n. December 2020, 2021.

CERISUELO, J. P. et al. Modifications induced by the addition of a nanoclay in the functional and active properties of an EVOH film containing carvacrol for food packaging. **Journal of Membrane Science**, v. 423–424, p. 247–256, 2012.

CHAN, W.-K. et al. Nerolidol: A Sesquiterpene Alcohol with Multi-Faceted Pharmacological and Biological Activities. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 529, 28 abr. 2016.

CHANG, C. JER et al. Solid-State Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Study of Ribonucleosides and Ribonucleic Acid. **Journal of Organic Chemistry**, v. 47, n. 27, p. 5318–5321, 1982.

- CHANG, P. H.; JIANG, W. T.; LI, Z. Mechanism of tyramine adsorption on Ca-montmorillonite. **Science of the Total Environment**, v. 642, p. 198–207, 2018.
- CIEPLIK, F. et al. Resistance toward chlorhexidine in oral bacteria-is there cause for concern? **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAR, 2019.
- DAIRI, N. et al. Cellulose acetate/AgNPs-organoclay and/or thymol nano-biocomposite films with combined antimicrobial/antioxidant properties for active food packaging use. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 508–523, 2019.
- DARDER, M.; COLILLA, M.; RUIZ-HITZKY, E. Biopolymer–Clay Nanocomposites Based on Chitosan Intercalated in Montmorillonite. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 20, p. 3774–3780, out. 2003.
- DE MENEZES, L. R. et al. The use of clays for chlorhexidine controlled release as a new perspective for longer durability of dentin adhesion. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 2019.
- DE OLIVEIRA, L. H. et al. When RNA meets montmorillonite: Influence of the pH and divalent cations. **Applied Clay Science**, v. 214, n. July, p. 106234, nov. 2021.
- DE OLIVEIRA, L. H. et al. Montmorillonite with essential oils as antimicrobial agents, packaging, repellents, and insecticides: an overview. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 209, p. 112186, jan. 2022.
- DHIFI, W. et al. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. **Medicines**, v. 3, n. 4, p. 25, 2016.
- DIK, D. A.; FISHER, J. F.; MOBASHERY, S. Cell-Wall Recycling of the Gram-Negative Bacteria and the Nexus to Antibiotic Resistance. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 12, p. 5952–5984, 2018.
- DIMA, C.; DIMA, S. Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 29–35, out. 2015.
- DONATO, R. et al. Antifungal activity of different essential oils against *Malassezia* pathogenic species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 249, n. October 2019, p. 112376, 2020.

- DOS SANTOS, A. et al. Enhanced removal of p-nitrophenol from aqueous media by montmorillonite clay modified with a cationic surfactant. **Journal of Hazardous Materials**, v. 355, n. February, p. 136–144, 2018.
- DUGUID, J. et al. Raman spectroscopy of DNA-metal complexes. I. Interactions and conformational effects of the divalent cations: Mg, Ca, Sr, Ba, Mn, Co, Ni, Cu, Pd, and Cd. **Biophysical Journal**, v. 65, n. 5, p. 1916–1928, 1993.
- DUPONT, N. et al. Solid state structures of the complexes between the antiseptic chlorhexidine and three anionic derivatives of calixarene. **CrystEngComm**, v. 10, n. 8, p. 975–977, 2008.
- ECHAGUE, C. G.; HAIR, P. S.; CUNNION, K. M. A comparison of antibacterial activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and gram-negative organisms for antimicrobial compounds in a unique composite wound dressing. **Advances in skin & wound care**, v. 23, n. 9, p. 406–413, 2010.
- EDER, A. H.; RODE, B. M. Influence of alkali- and alkaline-earth-metal cations on the “salt-induced peptide formation” reaction. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, n. 7, p. 1125–1130, 1994.
- EL MIZ, M. et al. Characterization and Adsorption Study of Thymol on Pillared Bentonite. **Open Journal of Physical Chemistry**, v. 04, n. 03, p. 98–116, 2014^a.
- ERASTOVA, V. et al. Mineral surface chemistry control for origin of prebiotic peptides. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2017.
- ERTEM, G. et al. Bridging the prebiotic and RNA worlds: Prebiotic RNA synthesis on clay. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 17, n. SUPPL. 1, p. 207–210, 2000.
- ERTEM, G.; FERRIS, J. P. Synthesis of RNA oligomers on heterogeneous templates. **Nature**, 1996.
- ERTEM, G.; FERRIS, J. P. Template-Directed Synthesis Using the Heterogeneous Templates Produced by Montmorillonite Catalysis. A Possible Bridge Between the Prebiotic and RNA Worlds. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 31, p. 7197–7201, ago. 1997.
- ESCAMILLA-ROA, E. et al. A DFT study of the adsorption of glycine in the interlayer space of montmorillonite. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 19, n. 23, p. 14961–14971, 2017.

- FALLEH, H. et al. Essential Oils: A Promising Eco-Friendly Food Preservative. **Food Chemistry**, v. 330, n. January, p. 127268, 2020.
- FERNÁNDEZ, M. A. et al. Organo-montmorillonite with biogenic compounds to be applied in antifungal coatings. **Applied Clay Science**, v. 184, n. November 2019, p. 105369, 2020.
- FERRAGE, E. et al. Hydration properties and interlayer organization of water and ions in synthetic na-smectite with tetrahedral layer charge. Part 1. Results from X-ray diffraction profile modeling. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 10, p. 4515–4526, 2010.
- FERREIRA, M. O. G. et al. Chitosan Hydrogel in combination with Nerolidol for healing wounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p. 409–418, 2016.
- FERRIS, J. P. et al. Synthesis of long prebiotic oligomers on mineral surfaces. **Nature**, 1996.
- FERRIS, J. P. Prebiotic synthesis on minerals: Bridging the prebiotic and RNA worlds. **Biological Bulletin**, v. 196, n. 3, p. 311–314, 1999.
- FERRIS, J. P. Montmorillonite-catalysed formation of RNA oligomers: The possible role of catalysis in the origins of life. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1474, p. 1777–1786, 2006.
- FEUILLIE, C. et al. Adsorption of nucleotides onto Fe-Mg-Al rich swelling clays. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 120, p. 97–108, 2013.
- FEUILLIE, C.; SVERJENSKY, D. A.; HAZEN, R. M. Attachment of ribonucleotides on α -alumina as a function of pH, ionic strength, and surface loading. **Langmuir**, v. 31, n. 1, p. 240–248, 2015.
- FIORILLO, L. Chlorhexidine gel use in the oral district: A systematic review. **Gels**, v. 5, n. 2, p. 1–16, 2019.
- FONG, N.; POOLE-WARREN, L. A.; SIMMONS, A. Development of sustained-release antibacterial urinary biomaterials through using an antimicrobial as an organic modifier in polyurethane nanocomposites. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 101 B, n. 2, p. 310–319, 2013.
- FONG, N.; SIMMONS, A.; POOLE-WARREN, L. A. Antibacterial polyurethane nanocomposites using chlorhexidine diacetate as an organic modifier. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 7, p. 2554–2561, 2010.

- FONSECA, C. G. et al. Na⁺ as a probe to structural investigation of dehydrated smectites using NMR spectra calculated by DFT. **Applied Clay Science**, v. 126, p. 132–140, 2016.
- FORNARO, T. et al. Infrared spectral investigations of UV irradiated nucleobases adsorbed on mineral surfaces. **Icarus**, v. 226, n. 1, p. 1068–1085, 2013.
- FORNARO, T. et al. UV irradiation of biomarkers adsorbed on minerals under Martian-like conditions: Hints for life detection on Mars. **Icarus**, v. 313, p. 38–60, 2018a.
- FORNARO, T. et al. Binding of Nucleic Acid Components to the Serpentine-Hosted Hydrothermal Mineral Brucite. **Astrobiology**, v. 18, n. 8, p. 989–1007, 2018b.
- FRANÇA, D. B. et al. Polymeric bionanocomposites based on montmorillonite - Materials in continuous interest. **Química Nova**, v. 43, n. 10, p. 1447–1462, 2020a.
- FRANÇA, D. B. et al. Monitoring diclofenac adsorption by organophilic alkylpyridinium bentonites. **Chemosphere**, v. 242, p. 125109, 2020b.
- FRANCHI, M.; FERRIS, J. P.; GALLORI, E. Cations as mediators of the adsorption of nucleic acids on clay surfaces in prebiotic environments. **Origins of Life and Evolution of the Biosphere**, v. 33, n. 1, p. 1–16, 2003.
- FRANCHI, M.; GALLORI, E. A surface-mediated origin of the RNA world: Biogenic activities of clay-adsorbed RNA molecules. **Gene**, v. 346, p. 205–214, 2005.
- FUJIWARA, T. et al. ¹³C—¹³C and ¹³C—¹⁵N Dipolar Correlation NMR of Uniformly Labeled Organic Solids for the Complete Assignment of Their ¹³C and ¹⁵N Signals: An Application to Adenosine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 45, p. 11351–11352, 1995.
- GARG, N.; SKIBSTED, J. Thermal activation of a pure montmorillonite clay and its reactivity in cementitious systems. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 118, n. 21, p. 11464–11477, 2014.
- GHADIRI, M.; CHRZANOWSKI, W.; ROHANIZADEH, R. Biomedical applications of cationic clay minerals. **RSC Adv.**, v. 5, n. 37, p. 29467–29481, 2015.
- GHASEMI HAMIDABADI, H. et al. Chitosan-Intercalated Montmorillonite/Poly(vinyl alcohol) Nanofibers as a Platform to Guide Neuronlike Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, n. 13, p. 11392–11404, 2017.

- GIANNAKAS, A. et al. A novel method for the preparation of inorganic and organo-modified montmorillonite essential oil hybrids. **Applied Clay Science**, v. 146, n. June, p. 362–370, 2017.
- GIANNAKAS, A. et al. The effect of different preparation methods on the development of chitosan/thyme oil/montmorillonite nanocomposite active packaging films. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 2, p. 1–15, 2020.
- GIANNAKAS, A. Na-Montmorillonite Vs. Organically Modified Montmorillonite as Essential Oil Nanocarriers for Melt-Extruded Low-Density Poly-Ethylene Nanocomposite Active Packaging Films with a Controllable and Long-Life Antioxidant Activity. **Nanomaterials**, v. 10, n. 6, p. 1027, 27 maio 2020.
- GOLUBEVA, O. Y.; PAVLOVA, S. V.; YAKOVLEV, A. V. Adsorption and in vitro release of vitamin B1 by synthetic nanoclays with montmorillonite structure. **Applied Clay Science**, v. 112–113, p. 10–16, 2015.
- GONÇALVES, O. et al. Evaluation of the mutagenicity of sesquiterpenic compounds and their influence on the susceptibility towards antibiotics of two clinically relevant bacterial strains. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 723, n. 1, p. 18–25, 2011.
- GOPINATH, S.; SUGUNAN, S. Enzymes immobilized on montmorillonite K 10: Effect of adsorption and grafting on the surface properties and the enzyme activity. **Applied Clay Science**, v. 35, n. 1–2, p. 67–75, 2007.
- GREAVES, M. P.; WILSON, M. J. The adsorption of nucleic acids by montmorillonite. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 1, n. 4, p. 317–323, 1969.
- GU, Z. et al. Montmorillonite Functionalized with Zwitterionic Surfactant as a Highly Efficient Adsorbent for Herbicides. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 54, n. 18, p. 4947–4955, 2015.
- GUILLERMIN, D. et al. New pigments based on carminic acid and smectites: A molecular investigation. **Dyes and Pigments**, v. 160, n. July 2018, p. 971–982, 2019.
- GUJJARI, A. et al. Factors affecting the association of single- and double-stranded RNAs with montmorillonite nanoclays. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 551–559, 2018.

- GUO, G.; TIAN, H.; WU, Q. Influence of pH on the structure and properties of soy protein/montmorillonite nanocomposite prepared by aqueous solution intercalating. **Applied Clay Science**, v. 171, n. November 2018, p. 14–19, 2019.
- GUPTA, T. T. et al. Mathematical modelling of the effects of plasma treatment on the diffusivity of biofilm. **Applied Sciences**, v. 8, n. 10, 2018.
- HAMMOUDI, N. et al. Preparation of active antimicrobial and antifungal alginate-montmorillonite/lemon essential oil nanocomposite films. **Materials Technology**, v. 35, n. 7, p. 383–394, 6 jun. 2020.
- HAO, J. et al. Transition Metals Enhance the Adsorption of Nucleotides onto Clays: Implications for the Origin of Life. **ACS Earth and Space Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 109–119, 2019.
- HARRISON, S. A.; LANE, N. Life as a guide to prebiotic nucleotide synthesis. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 18–21, 2018.
- HASHIZUME, H. Adsorption of Nucleic Acid Bases, Ribose, and Phosphate by Some Clay Minerals. **Life**, v. 5, n. 1, p. 637–650, 2015.
- HASHIZUME, H.; VAN DER GAAST, S.; THENG, B. K. G. Adsorption of adenine, cytosine, uracil, ribose, and phosphate by Mg-exchanged montmorillonite. **Clay Minerals**, v. 45, n. 4, p. 469–475, 2010.
- HE, H. et al. A novel organoclay with antibacterial activity prepared from montmorillonite and Chlorhexidini Acetas. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 297, n. 1, p. 235–243, maio 2006.
- HE, Y. S. et al. Application of a sensitive liquid chromatography-mass spectrometry method to a pharmacokinetic study of nerolidol in rat plasma. **Analytical Methods**, v. 8, n. 4, p. 785–789, 2016.
- HECKERT BASTOS, L. P. et al. Encapsulation of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil with gelatin and sodium alginate by complex coacervation. **Food Hydrocolloids**, v. 102, n. September 2019, 2020.
- HELLRUP, J. et al. Structure and Mobility of Lactose in Lactose/Sodium Montmorillonite Nanocomposites. **Langmuir**, v. 32, n. 49, p. 13214–13225, 2016.

- HEWITT, M. G. et al. In Vitro Topical Delivery of Chlorhexidine to the Cornea: Enhancement Using Drug-Loaded Contact Lenses and β -Cyclodextrin Complexation, and the Importance of Simulating Tear Irrigation. **Molecular Pharmaceutics**, v. 17, n. 4, p. 1428–1441, 2020.
- HIGGS, P. G.; LEHMAN, N. The RNA World: Molecular cooperation at the origins of life. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 1, p. 7–17, 2015.
- HOLEŠOVÁ, S. et al. Antibacterial activity of organomontmorillonites and organovermiculites prepared using chlorhexidine diacetate. **Applied Clay Science**, v. 83–84, p. 17–23, 2013.
- HOLEŠOVÁ, S. et al. Antibacterial efficiency of vermiculite/chlorhexidine nanocomposites and results of the in vivo test of harmlessness of vermiculite. **Materials Science and Engineering C**, v. 42, p. 466–473, 2014.
- HSIAO, Y. W.; HEDSTRÖM, M. Swelling Pressure in Systems with Na-Montmorillonite and Neutral Surfaces: A Molecular Dynamics Study. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 121, n. 47, p. 26414–26423, 2017.
- HUANG, P. et al. Determining the Mechanism and Efficiency of Industrial Dye Adsorption through Facile Structural Control of Organo-montmorillonite Adsorbents. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, n. 31, p. 26383–26391, 2017.
- HUANG, W.; FERRIS, J. P. One-step, regioselective synthesis of up to 50-mers of RNA oligomers by montmorillonite catalysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 27, p. 8914–8919, 2006.
- IAMAREERAT, B. et al. Reinforced cassava starch based edible film incorporated with essential oil and sodium bentonite nanoclay as food packaging material. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 5, p. 1953–1959, 5 maio 2018.
- INOUE, Y. et al. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. **FEMS Microbiology Letters**, v. 237, n. 2, p. 325–331, 2004.
- ISAH, M. et al. Preparation and characterization of chlorhexidine modified zinc-kaolinite and its antibacterial activity against bacteria isolated from water vending machine. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 2, p. 103545, 2020.
- IZAWA, M. R. M. et al. Composition and evolution of the early oceans: Evidence from the Tagish Lake meteorite. **Earth and Planetary Science Letters**, v. 298, n. 3–4, p. 443–449, 2010.

- JABER, M. et al. Selectivities in Adsorption and Peptidic Condensation in the (Arginine and Glutamic Acid)/Montmorillonite Clay System. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 118, n. 44, p. 25447–25455, 6 nov. 2014.
- JABER, M.; MIEHÉ-BRENDLÉ, J. Synthesis, characterization and applications of 2:1 phyllosilicates and organophyllosilicates: Contribution of fluoride to study the octahedral sheet. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 107, n. 1–2, p. 121–127, 2008.
- JACQUEMOT, P. et al. The degradation of organic compounds impacts the crystallization of clay minerals and vice versa. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–6, 2019.
- JAHED, E. et al. Physicochemical properties of Carum copticum essential oil loaded chitosan films containing organic nanoreinforcements. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 325–338, 2017.
- JAMES CLEAVES, H. et al. Mineral-organic interfacial processes: Potential roles in the origins of life. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 16, p. 5502–5525, 2012.
- JELAVIĆ, S. et al. Prebiotic RNA polymerisation: energetics of nucleotide adsorption and polymerisation on clay mineral surfaces. **Chemical Communications**, v. 53, n. 94, p. 12700–12703, 2017.
- JOHNSTON, C. T. et al. Interaction of biological molecules with clay minerals: A combined spectroscopic and sorption study of lysozyme on saponite. **Langmuir**, v. 28, n. 1, p. 611–619, 2012.
- JOU, S. K.; MALEK, N. A. N. N. Characterization and antibacterial activity of chlorhexidine loaded silver-kaolinite. **Applied Clay Science**, v. 127–128, p. 1–9, 2016.
- JU, J. et al. Application of essential oil as a sustained release preparation in food packaging. **Trends in Food Science and Technology**, v. 92, n. 1800, p. 22–32, 2019a.
- JU, J. et al. The inhibitory effect of plant essential oils on foodborne pathogenic bacteria in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 20, p. 3281–3292, 2019b.
- JU, J. et al. Application of starch microcapsules containing essential oil in food preservation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 17, p. 2825–2836, 2020a.

- JU, J. et al. Synergistic interactions of plant essential oils with antimicrobial agents: a new antimicrobial therapy. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–12, 2020b.
- JUGREET, B. S. et al. Chemistry, bioactivities, mode of action and industrial applications of essential oils. **Trends in Food Science & Technology**, v. 101, n. September 2019, p. 89–105, jul. 2020.
- KADDOUR, H. et al. Nonenzymatic RNA Oligomerization at the Mineral-Water Interface: An Insight into the Adsorption-Polymerization Relationship. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 122, n. 51, p. 29386–29397, 2018.
- KAMPF, G. Antibiotic resistance can be enhanced in gram-positive species by some biocidal agents used for disinfection. **Antibiotics**, v. 8, n. 1, 2019.
- KAR, S. et al. Curcumin ameliorates the targeted delivery of methotrexate intercalated montmorillonite clay to cancer cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 135, n. May, p. 91–102, 2019.
- KAWAMURA, K.; FERRIS, J. P. Clay catalysis of oligonucleotide formation: Kinetics of the reaction of the 5'-phosphorimidazolides of nucleotides with the non-basic heterocycles uracil and hypoxanthine. **Origins of Life and Evolution of the Biosphere**, v. 29, n. 6, p. 563–591, 1999.
- KHATOON, N.; CHU, M. Q.; ZHOU, C. H. Nanoclay-based drug delivery systems and their therapeutic potentials. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 8, n. 33, p. 7335–7351, 2020.
- KIM, D. H.; SON, J. S.; KWON, T. Y. Antimicrobial effect of chlorhexidine-releasing porous hydroxyapatite scaffold incorporated with human serum albumin nanoparticles. **Materials Letters**, v. 266, p. 127479, 2020.
- KINNINMONTH, M. A. et al. Investigation into the suitability of layered silicates as adsorption media for essential oils using FTIR and GC-MS. **Applied Clay Science**, v. 83–84, p. 415–425, 2013.
- KOMADEL, P. Acid activated clays: Materials in continuous demand. **Applied Clay Science**, v. 131, p. 84–99, out. 2016.
- KOMADEL, P.; MADEJOVÁ, J. **Acid activation of clay minerals**. 2. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2013. v. 5

- KUHN, D. et al. Antibiofilm activity of the essential oil of *Campomanesia aurea* O. Berg against microorganisms causing food borne diseases. **Lwt**, v. 108, n. March, p. 247–252, 2019.
- KUMAR, A.; KUMAR, V. Biotemplated Inorganic Nanostructures: Supramolecular Directed Nanosystems of Semiconductor(s)/Metal(s) Mediated by Nucleic Acids and Their Properties. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 14, p. 7044–7078, 2014.
- KUMAR, A.; SINGH, B. Zn²⁺-induced folding of RNA to produce honeycomb-like RNA-mediated fluorescing Zn²⁺/PbSe nanostructures. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 117, n. 10, p. 5386–5396, 2013.
- KUMARI, B. et al. Processing of abasic site damaged lesions by APE1 enzyme on DNA adsorbed over normal and organomodified clay. **Chemosphere**, v. 112, p. 503–510, 2014.
- LAILACH, G. E.; THOMPSON, T. D.; BRINDLEY, G. W. Absorption of pyrimidines, purines, and nucleosides by Li-, Na-, Mg-, and Ca-montmorillonite (Clay-organic studies XII). **Clays and Clay Minerals**, v. 16, n. 4, p. 285–293, 1968.
- LAPPER, R. D.; MANTSCH, H. H.; SMITH, I. C. P. A Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Study of the Conformations of 3',5'-Cyclic Nucleotides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 95, n. 9, p. 2878–2880, 1973.
- LAWLESS, J. G. et al. pH profile of the adsorption of nucleotides onto montmorillonite - I. selected homoionic clays. **Origins of Life and Evolution of the Biosphere**, v. 15, n. 2, p. 77–88, 1985.
- LAZCANO, A. Prebiotic Evolution and Self-Assembly of Nucleic Acids. **ACS Nano**, 2018.
- LEONARSKI, F.; D'ASCENZO, L.; AUFFINGER, P. Mg²⁺ ions: Do they bind to nucleobase nitrogens? **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 2, p. 987–1004, 2017.
- LEPOITEVIN, M. et al. BSA and lysozyme adsorption on homoionic montmorillonite: Influence of the interlayer cation. **Applied Clay Science**, v. 95, p. 396–402, 2014.
- LIN-VIEN, D. et al. The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules. [s.l.] Elsevier, 1991. v. 29
- LIU, J. et al. Stability of Na-montmorillonite suspension in the presence of different cations and valences. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 38, n. 7, p. 1035–1040, 2017.

- LIU, T.; LIU, L. Fabrication and characterization of chitosan nanoemulsions loading thymol or thyme essential oil for the preservation of refrigerated pork. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 1509–1515, 2020.
- LOBATO-AGUILAR, H. et al. Synthesis, characterization and chlorhexidine release from either montmorillonite or palygorskite modified organoclays for antibacterial applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 46, n. April, p. 452–460, 2018.
- LOBATO-AGUILAR, H. A. et al. Antibacterial properties and release kinetics of chlorhexidine diacetate from montmorillonite and palygorskite clays. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 34, n. 8, p. 1052–1058, 2020.
- LUIZ DE OLIVEIRA, J.; RAMOS CAMPOS, E. V.; FRACETO, L. F. Recent Developments and Challenges for Nanoscale Formulation of Botanical Pesticides for Use in Sustainable Agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 34, p. 8898–8913, 2018.
- LUO, D. et al. Novel Formulation of Chlorhexidine Spheres and Sustained Release with Multilayered Encapsulation. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 20, p. 12652–12660, 2016.
- M. DOMINGUES, P.; SANTOS, L. Essential oil of pennyroyal (*Mentha pulegium*): Composition and applications as alternatives to pesticides—New tendencies. **Industrial Crops and Products**, v. 139, n. July, p. 111534, nov. 2019.
- MADEJOVÁ, J.; GATES, W. P.; PETIT, S. **IR Spectra of Clay Minerals**. [s.l.] Elsevier, 2017. v. 8
- MADERIA, M.; HORTON, T. E.; DEROSE, V. J. Metal Interactions with a GAAA RNA Tetraloop Characterized by ³¹P NMR and Phosphorothioate Substitutions †. **Biochemistry**, v. 39, n. 28, p. 8193–8200, jul. 2000.
- MAGENNIS, E. P. et al. Engineering serendipity: High-throughput discovery of materials that resist bacterial attachment. **Acta Biomaterialia**, v. 34, p. 84–92, 2016.
- MANZANO, I.; ZYDNEY, A. L. Quantitative study of RNA transmission through ultrafiltration membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 544, n. September, p. 272–277, 2017.
- MARSH, A. et al. Alkali activation behaviour of un-calcined montmorillonite and illite clay minerals. **Applied Clay Science**, v. 166, n. September, p. 250–261, 2018.

- MARTIN, R. B. Nucleoside Sites for Transition Metal Ion Binding. **Accounts of Chemical Research**, v. 18, n. 2, p. 32–38, fev. 1985.
- MARTY, R. et al. Structural characterization of cationic lipid-tRNA complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 15, p. 5197–5207, 2009.
- MENG, N. et al. Controlled release and antibacterial activity chlorhexidine acetate (CA) intercalated in montmorillonite. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 382, n. 1–2, p. 45–49, 2009a.
- MENG, N. et al. Synthesis and antimicrobial activities of polymer/montmorillonite-chlorhexidine acetate nanocomposite films. **Applied Clay Science**, v. 42, n. 3–4, p. 667–670, 2009b.
- MIGNON, P. et al. Nucleobase Stacking at Clay Edges, a Favorable Interaction for RNA/DNA Oligomerization. **ACS Earth and Space Chemistry**, v. 3, n. 6, p. 1023–1033, 2019.
- MIGNON, P. et al. Adsorption of nucleotides on clay surfaces: Effects of mineral composition, pH and solution salts. **Applied Clay Science**, v. 190, n. November 2019, p. 1–8, 2020.
- MIGNON, P.; SODUPE, M. Theoretical study of the adsorption of DNA bases on the acidic external surface of montmorillonite. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, n. 2, p. 945–954, 2012.
- MIGNON, P.; UGLIENGO, P.; SODUPE, M. Theoretical study of the adsorption of RNA/DNA bases on the external surfaces of Na⁺-montmorillonite. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 31, p. 13741–13749, 2009.
- MOMMA, K.; IZUMI, F. VESTA 3 for three-dimensional visualization of crystal, volumetric and morphology data. **Journal of Applied Crystallography**, v. 44, n. 6, p. 1272–1276, 1 dez. 2011.
- MOORE, D. M.; REYNOLDS, R. C. X-Ray Diffraction and the Identification and Analysis of Clay Minerals. New York: Oxford University Press, 1997.
- MOUSA, M. et al. Clay nanoparticles for regenerative medicine and biomaterial design: A review of clay bioactivity. **Biomaterials**, v. 159, p. 204–214, 2018.
- NAGY, K. et al. Intercalation of lecithins for preparation of layered nanohybrid materials and adsorption of limonene. **Applied Clay Science**, v. 72, p. 155–162, 2013.

- NAKHLI, A. et al. Non-linear analysis in estimating model parameters for thymol adsorption onto hydroxyiron-clays. **Journal of Molecular Liquids**, v. 244, p. 201–210, 2017.
- NAKHLI, A. et al. Modeling of essential oils adsorption onto clays towards a better understanding of their interactions. **Journal of Molecular Liquids**, v. 249, p. 132–143, 2018.
- NDAGI, U. et al. Antibiotic resistance: bioinformatics-based understanding as a functional strategy for drug design. **RSC Advances**, v. 10, n. 31, p. 18451–18468, 2020.
- NDOMO, A. F. et al. Insecticidal effects of the powdery formulation based on clay and essential oil from the leaves of *Clausena anisata* (Willd.) J. D. Hook ex. Benth. (Rutaceae) against *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Pest Science**, v. 81, n. 4, p. 227–234, 2008.
- NGOUANA W., B. F.; KALINICHEV, A. G. Structural Arrangements of Isomorphic Substitutions in Smectites: Molecular Simulation of the Swelling Properties, Interlayer Structure, and Dynamics of Hydrated Cs–Montmorillonite Revisited with New Clay Models. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 118, n. 24, p. 12758–12773, 19 jun. 2014.
- NGUEMTCHOUIN, M. G. M. et al. *Ocimum gratissimum* essential oil and modified montmorillonite clay, a means of controlling insect pests in stored products. **Journal of Stored Products Research**, v. 52, p. 57–62, jan. 2013.
- NGUEMTCHOUIN, M. G. M. et al. Characterization of inorganic and organic clay modified materials: An approach for adsorption of an insecticidal terpenic compound. **Applied Clay Science**, v. 104, p. 110–118, 2015.
- ONNAINTY, R. et al. Targeted chitosan-based bionanocomposites for controlled oral mucosal delivery of chlorhexidine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 509, n. 1–2, p. 408–418, 2016.
- OWEN, L.; LAIRD, K. Synchronous application of antibiotics and essential oils: dual mechanisms of action as a potential solution to antibiotic resistance. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 414–435, 2018.
- PAL, S. et al. Synthesis of highly antibacterial nanocrystalline trivalent silver polydiguanide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 44, p. 16147–16155, 2009.
- PARK, M. J. et al. Effect of citral, eugenol, nerolidol and α -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. **Fitoterapia**, 2009.

- PAZOURKOVÁ, L. et al. Study of the structure and antimicrobial activity of Ca-deficient ceramics on chlorhexidine nanoclay substrate. **Materials**, v. 12, n. 18, p. 1–14, 2019.
- PECINI, E. M.; AVENA, M. J. Measuring the isoelectric point of the edges of clay mineral particles: The case of montmorillonite. **Langmuir**, v. 29, n. 48, p. 14926–14934, 2013.
- PEDREIRA-SEGADE, U. et al. Adsorption of nucleotides onto ferromagnesian phyllosilicates: Significance for the origin of life. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 176, p. 81–95, 2016.
- PEDREIRA-SEGADE, U. et al. How do Nucleotides Adsorb Onto Clays? **Life**, v. 8, n. 4, p. 59, 2018.
- PEDREIRA-SEGADE, U.; MICHOT, L. J.; DANIEL, I. Effects of salinity on the adsorption of nucleotides onto phyllosilicates. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, n. 3, p. 1938–1952, 2018.
- PENTRÁK, M. et al. Alteration of fine fraction of bentonite from Kopernica (Slovakia) under acid treatment: A combined XRD, FTIR, MAS NMR and AES study. **Applied Clay Science**, v. 163, n. April, p. 204–213, out. 2018.
- PERARO, G. R. et al. Aminofunctionalized LAPONITE® as a versatile hybrid material for chlorhexidine digluconate incorporation: Cytotoxicity and antimicrobial activities. **Applied Clay Science**, v. 195, n. June 2019, p. 105733, 2020.
- PIRES, J.; JUŹKÓW, J.; PINTO, M. L. Amino acid modified montmorillonite clays as sustainable materials for carbon dioxide adsorption and separation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 544, n. November 2017, p. 105–110, 2018.
- PIRES, J. R. A.; DE SOUZA, V. G. L.; FERNANDO, A. L. Chitosan/montmorillonite bionanocomposites incorporated with rosemary and ginger essential oil as packaging for fresh poultry meat. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 17, n. June, p. 142–149, set. 2018.
- POLA, C. C. et al. Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fungi. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 9, p. 69–78, 2016.
- PRAMANIK, S. et al. Montmorillonite immobilized *Curcuma aromatica*/*Zanthoxylum limonella* oil nanoconjugate as a green antibacterial and biocompatible material with mosquito repellent attributes. **Applied Clay Science**, v. 109–110, p. 33–38, jun. 2015.

- PRIYADARSHI, R. et al. Chitosan films incorporated with Apricot (*Prunus armeniaca*) kernel essential oil as active food packaging material. **Food Hydrocolloids**, v. 85, n. March, p. 158–166, 2018.
- PUPE, C. G. et al. Preparation and evaluation of antimicrobial activity of nanosystems for the control of oral pathogens *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 2581–2590, 2011.
- PYLE, A. M. Metal ions in the structure and function of RNA. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 7, n. 7–8, p. 679–690, 2002.
- QUEIROZ, V. M. et al. Corn starch films as a long-term drug delivery system for chlorhexidine gluconate. **Materials Science and Engineering C**, v. 112, n. March, p. 110852, 2020.
- QUINTERO, R. I. et al. Preparation and Characterization of Cellulose Acetate Butyrate/Organoclay Nanocomposites Produced by Extrusion. **Packaging Technology and Science**, v. 27, n. 6, p. 495–507, jun. 2014.
- RAPHAEL IKAN. Natural products—A laboratory guide. 2nd Editio ed. [s.l.] Academic Press, 1991. v. 20
- REINHOLDT, M. et al. Fluorine Route Synthesis of Montmorillonites Containing Mg or Zn and Characterization by XRD, Thermal Analysis, MAS NMR, and EXAFS Spectroscopy. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2001, n. 11, p. 2831–2841, 2001.
- REINHOLDT, M. et al. Synthesis and characterization of montmorillonite-type phyllosilicates in a fluoride medium. **Clay Minerals**, v. 40, n. 2, p. 177–190, 2005.
- RHIM, J. W.; PARK, H. M.; HA, C. S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 10–11, p. 1629–1652, 2013.
- RODRIGUES, F. et al. Confinement and Time Immemorial: Prebiotic Synthesis of Nucleotides on a Porous Mineral Nanoreactor. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 10, n. 15, p. 4192–4196, 19 ago. 2019.
- ROJAS, A. et al. Assessment of kinetic release of thymol from LDPE nanocomposites obtained by supercritical impregnation: Effect of depressurization rate and nanoclay content. **European Polymer Journal**, v. 93, n. May, p. 294–306, 2017.

- ROSE, F. L.; SWAIN, G. Bisdiguamides having antibacterial activity. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, n. 4422, p. 4414–4417, 1956.
- ROSE, M. A. et al. Chlorhexidine allergy in the perioperative setting: a narrative review. **British Journal of Anaesthesia**, v. 123, n. 1, p. e95–e103, 2019.
- ROSENDO, F. R. G. V. et al. Antimicrobial efficacy of building material based on ZnO/palygorskite against Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Applied Clay Science**, v. 188, n. February, p. 105499, 2020.
- ROUTH, P.; GARAI, A.; NANDI, A. K. Optical and electronic properties of polyaniline sulfonic acid-ribonucleic acid-gold nanobiocomposites. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 30, p. 13670–13682, 2011.
- RUHAL, R.; KATARIA, R. Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. **Microbiological Research**, v. 251, n. July, p. 126829, 2021.
- RUIZ-MIRAZO, K.; BRIONES, C.; DE LA ESCOSURA, A. Prebiotic systems chemistry: New perspectives for the origins of life. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 1, p. 285–366, 2014.
- SAH, A. K.; DEWANGAN, M.; SURESH, P. K. Potential of chitosan-based carrier for periodontal drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 178, n. February, p. 185–198, 2019.
- SAHA, K.; BUTOLA, B. S.; JOSHI, M. Synthesis and characterization of chlorhexidine acetate drug-montmorillonite intercalates for antibacterial applications. **Applied Clay Science**, v. 101, p. 477–483, 2014.
- SAITO, A. Y. et al. Antimalarial activity of the terpene nerolidol. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 6, p. 641–646, 2016.
- SAKA, E. E.; GÜLER, C. The effects of electrolyte concentration, ion species and pH on the zeta potential and electrokinetic charge density of montmorillonite. **Clay Minerals**, v. 41, n. 4, p. 853–861, 2006.
- SANJAY, G.; SUGUNAN, S. Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10. **Food Chemistry**, v. 94, n. 4, p. 573–579, 2006.

- SANTOS, A. J. et al. Clay/PVP nanocomposites enriched with *Syzygium aromaticum* essential oil as a safe formulation against *Aedes aegypti* larvae. **Applied Clay Science**, v. 185, n. September 2019, p. 105394, 2020.
- SCAFFARO, R. et al. Tunable release of Chlorhexidine from Polycaprolactone-based filaments containing graphene nanoplatelets. **European Polymer Journal**, v. 110, n. October 2018, p. 221–232, 2019.
- SCHMIDT, M. P.; MARTÍNEZ, C. E. Kinetic and Conformational Insights of Protein Adsorption onto Montmorillonite Revealed Using in Situ ATR-FTIR/2D-COS. **Langmuir**, v. 32, n. 31, p. 7719–7729, 2016.
- SCHNETZER, F. et al. Impact of Intrinsic Structural Properties on the Hydration of 2:1 Layer Silicates. **ACS Earth and Space Chemistry**, v. 1, n. 10, p. 608–620, 2017.
- SCHOONHEYDT, R. A.; JOHNSTON, C. T.; BERGAYA, F. Clay minerals and their surfaces. **Developments in Clay Science**, v. 9, p. 1–21, 2018.
- SHEMESH, R. et al. Antibacterial and antifungal LDPE films for active packaging. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 26, n. 1, p. 110–116, 2015a.
- SHEMESH, R. et al. LDPE/clay/carvacrol nanocomposites with prolonged antimicrobial activity. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 2, p. 1–8, 2015b.
- SHENG, X. et al. Metal cation saturation on montmorillonites facilitates the adsorption of DNA via cation bridging. **Chemosphere**, v. 235, p. 670–678, 2019.
- SHOJAEE-ALIABADI, S. et al. Characterization of nanobiocomposite kappa-carrageenan film with *Zataria multiflora* essential oil and nanoclay. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 282–289, 2014.
- SILVA, L. N. et al. Plant Natural Products Targeting Bacterial Virulence Factors. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 16, p. 9162–9236, 2016.
- SILVA, M. P. et al. Antiparasitic activity of nerolidol in a mouse model of schistosomiasis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 3, p. 467–472, 2017.
- SILVA, M. P. N. et al. Antischistosomal activity of the terpene nerolidol. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 3793–3803, 2014.

SOUZA, V. et al. Shelf Life Assessment of Fresh Poultry Meat Packaged in Novel Bionanocomposite of Chitosan/Montmorillonite Incorporated with Ginger Essential Oil. **Coatings**, v. 8, n. 5, p. 177, 5 maio 2018.

SOUZA, V. G. L. et al. Activity of chitosan-montmorillonite bionanocomposites incorporated with rosemary essential oil: From in vitro assays to application in fresh poultry meat. **Food Hydrocolloids**, v. 89, n. October 2018, p. 241–252, 2019a.

SOUZA, V. G. L. et al. Physical and morphological characterization of chitosan/montmorillonite films incorporated with ginger essential oil. **Coatings**, v. 9, n. 11, p. 1–20, 2019b.

SOUZA, V. G. L. et al. In vitro bioactivity of novel chitosan bionanocomposites incorporated with different essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 140, n. March, p. 111563, 2019c.

ŠPONER, J. et al. RNA Structural Dynamics As Captured by Molecular Simulations: A Comprehensive Overview. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 8, p. 4177–4338, 25 abr. 2018.

ŠPONER, J. E. et al. Prebiotic synthesis of nucleic acids and their building blocks at the atomic level – merging models and mechanisms from advanced computations and experiments. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 30, p. 20047–20066, 2016.

STROH, A. et al. Influence of a phytosphingosine-containing chlorhexidine shampoo on superficial bacterial counts and bacterial adherence to canine keratinocytes. **Veterinary Microbiology**, v. 141, n. 1–2, p. 190–193, 2010.

SUKHODUB, L. F. et al. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-alginate nanostructured composites for the controlled drug release. **Materials Chemistry and Physics**, v. 217, n. June, p. 228–234, 2018.

SUN, B. et al. Study on montmorillonite-chlorhexidine acetate-terbinafine hydrochloride intercalation composites as drug release systems. **RSC Advances**, v. 8, n. 38, p. 21369–21377, 2018.

SWADLING, J. B.; COVENEY, P. V.; CHRISTOPHER GREENWELL, H. Stability of free and mineral-protected nucleic acids: Implications for the RNA world. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 83, p. 360–378, 2012.

- TABARY, N. et al. A chlorhexidine-loaded biodegradable cellulosic device for periodontal pockets treatment. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 1, p. 318–329, 2014.
- TAJEDDINE, L. et al. Hydration-dehydration behavior and thermodynamics of MX-80 montmorillonite studied using thermal analysis. **Thermochemica Acta**, v. 604, p. 83–93, 2015.
- TARIQ, S. et al. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 134, n. March, p. 103580, set. 2019.
- TEICH-MCGOLDRICK, S. L. et al. Swelling Properties of Montmorillonite and Beidellite Clay Minerals from Molecular Simulation: Comparison of Temperature, Interlayer Cation, and Charge Location Effects. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 36, p. 20880–20891, 2015.
- THENG, B. K. G. Clay-polymer interactions: **Clay and Clays minerals**, v. 30, n. 1, p. 1–10., 1982.
- THENG, B. K. G. Nucleic Acids Nucleic acids. v. 4, p. 319–337, 2012.
- TORIN, R. F. DA S. et al. Effect of clay and clay/essential oil in packaging films. **Polymer Composites**, v. 39, n. 11, p. 4034–4040, 2018.
- TORNUK, F. et al. LLDPE based food packaging incorporated with nanoclays grafted with bioactive compounds to extend shelf life of some meat products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 540–546, dez. 2015.
- TRIGUEIRO, P. et al. Going through the wine fining: Intimate dialogue between organics and clays. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 166, p. 79–88, jun. 2018a.
- TRIGUEIRO, P. et al. When anthraquinone dyes meet pillared montmorillonite: Stability or fading upon exposure to light? **Dyes and Pigments**, v. 159, n. June, p. 384–394, dez. 2018b.
- TRIPATHI, M. et al. Oxovanadium complex as potential nucleic acid binder. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 85–90, 2017.
- TSUBOI, M. Application of Infrared Spectroscopy to Structure Studies of Nucleic Acids. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 3, n. 1, p. 45–90, 1970.

TUNÇ, S.; DUMAN, O. Preparation of active antimicrobial methyl cellulose/carvacrol/montmorillonite nanocomposite films and investigation of carvacrol release. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 465–472, mar. 2011.

TUNÇ, S.; DUMAN, O.; POLAT, T. G. Effects of montmorillonite on properties of methyl cellulose/carvacrol based active antimicrobial nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 259–268, 2016.

TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of essential oils: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 40–53, 2013.

VIENNET, J. C. et al. Influence of the nature of the gas phase on the degradation of RNA during fossilization processes. **Applied Clay Science**, v. 191, n. April, p. 105616, 2020.

VILLAFANE-BARAJAS, S. A. et al. Salinity Effects on the Adsorption of Nucleic Acid Compounds on Na-Montmorillonite: a Prebiotic Chemistry Experiment. **Origins of Life and Evolution of Biospheres**, v. 48, n. 2, p. 181–200, 2018.

VILLEGAS, C. et al. PLA/organoclay bionanocomposites impregnated with thymol and cinnamaldehyde by supercritical impregnation for active and sustainable food packaging. **Composites Part B: Engineering**, v. 176, n. December 2018, p. 107336, 2019.

VISWANATHAN, K. et al. Chlorhexidine-calcium phosphate nanoparticles - Polymer mixer based wound healing cream and their applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 67, p. 516–521, 2016.

VOLIĆ, M. et al. Alginate/soy protein system for essential oil encapsulation with intestinal delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 200, n. January, p. 15–24, 2018.

WANG, K. et al. Construction and characterization of a nanostructured biocatalyst consisting of immobilized lipase on aminopropyl-functionalized montmorillonite. **Applied Clay Science**, v. 183, n. November, p. 105329, 2019.

WANG, L.; WANG, A. Adsorption properties of Congo Red from aqueous solution onto surfactant-modified montmorillonite. **Journal of Hazardous Materials**, v. 160, n. 1, p. 173–180, 2008.

WIŚNIEWSKA, M.; FIJAŁKOWSKA, G.; SZEWCZUK-KARPISZ, K. The mechanism of anionic polyacrylamide adsorption on the montmorillonite surface in the presence of Cr(VI) ions. **Chemosphere**, v. 211, p. 524–534, nov. 2018.

- WU, L.; LIAO, L.; LV, G. Influence of interlayer cations on organic intercalation of montmorillonite. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 454, p. 1–7, 2015.
- WU, S. C. et al. Natural Products That Target Virulence Factors in Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 48, p. 13195–13211, 2019.
- WU, Y. et al. Long-term and controlled release of chlorhexidine-copper(II) from organically modified montmorillonite (OMMT) nanocomposites. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 2, p. 752–757, 2013.
- WU, Y. et al. Long-term antibacterial protected cotton fabric coating by controlled release of chlorhexidine gluconate from halloysite nanotubes. **RSC Advances**, v. 7, n. 31, p. 18917–18925, 2017.
- XIE, H. et al. Charge-Dependent Regulation in DNA Adsorption on 2D Clay Minerals. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.
- YADAV, M.; KUMAR, R.; KRISHNAMURTHY, R. Chemistry of Abiotic Nucleotide Synthesis. **Chemical Reviews**, 2020.
- YAMADA, M.; FUNAKI, S.; MIKI, S. Formaldehyde interacts with RNA rather than DNA: Accumulation of formaldehyde by the RNA-inorganic hybrid material. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 168–173, 2019.
- YAMAGUCHI, N. et al. Swelling inhibition of liquid crystalline colloidal montmorillonite and beidellite clays by DNA. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.
- YAN, H. et al. Chlorhexidine-encapsulated mesoporous silica-modified dentin adhesive. **Journal of Dentistry**, v. 78, n. August, p. 83–90, 2018.
- YAN, H. et al. Preparation and characterization of octyl phenyl polyoxyethylene ether modified organo-montmorillonite for ibuprofen controlled release. **Applied Clay Science**, v. 189, n. March, p. 105519, 2020a.
- YAN, H. et al. Synthesis and assessment of CTAB and NPE modified organo-montmorillonite for the fabrication of organo-montmorillonite/alginate based hydrophobic pharmaceutical controlled-release formulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 191, n. March, p. 110983, jul. 2020b.

- YANG, D. et al. Synthesis and characterization of antibacterial compounds using montmorillonite and chlorhexidine acetate. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 89, n. 3, p. 847–852, 2007.
- YANG, Y. et al. Adsorption of Lysine on Na-Montmorillonite and Competition with Ca²⁺: A Combined XRD and ATR-FTIR Study. **Langmuir**, v. 32, n. 19, p. 4746–4754, 2016.
- YANG, Y. et al. A novel multifunctional adsorbent synthesized by modifying acidified organo-montmorillonite with iron hydroxides. **Applied Clay Science**, v. 185, n. September 2019, p. 105420, 2020.
- YESILBAS, M.; HOLMBOE, M.; BOILY, J. F. Cohesive vibrational and structural depiction of intercalated water in montmorillonite. **ACS Earth and Space Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 38–47, 2018.
- YU, W. H. et al. Adsorption of proteins and nucleic acids on clay minerals and their interactions: A review. **Applied Clay Science**, v. 80–81, p. 443–452, 2013.
- YU, W. H. et al. Clean production of CTAB-montmorillonite: formation mechanism and swelling behavior in xylene. **Applied Clay Science**, v. 97–98, p. 222–234, ago. 2014.
- YU, Z. et al. The alarming antimicrobial resistance in ESKAPEE pathogens: Can essential oils come to the rescue? **Fitoterapia**, v. 140, n. October 2019, p. 104433, 2020.
- YUKSELEN, Y.; ERZIN, Y. Artificial neural networks approach for zeta potential of Montmorillonite in the presence of different cations. **Environmental Geology**, v. 54, n. 5, p. 1059–1066, 2008.
- ZHANG, J. et al. Antibacterial activity, cell toxicity, and mechanical property of ultra-high molecular weight polyethylene/chlorhexidine acetate–montmorillonite nanocomposite. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 33, n. 6, p. 647–659, 2018.

APÊNDICE A

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 209 (2022) 112186



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb

Montmorillonite with essential oils as antimicrobial agents, packaging, repellents, and insecticides: an overview

Luís H. de Oliveira^a, Pollyana Trigueiro^b, João Sammy Nery Souza^c, Marinaldo S. de Carvalho^c, Josy A. Osajima^b, Edson C. da Silva-Filho^b, Maria G. Fonseca^{a,*}

^a LACOM, Laboratory of Fuels and Materials of Paraíba Federal University, 58051-085 João Pessoa, Paraíba, Brazil

^b LIMAV, Interdisciplinary Laboratory of Advanced Materials of Piauí Federal University, 64049-550 Teresina, Piauí, Brazil

^c Chemistry Department of Piauí Federal University, 64049-550 Teresina, Piauí, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Essential oils
Terpenes
Clay minerals
Essential oil/montmorillonite hybrids
Bioactivity

ABSTRACT

Essential oils (EOs) are complex natural mixtures of secondary plant metabolites that function as biocides and therapeutic agents. They are extensively used in bactericidal, virucidal, fungicidal, antiparasitic, insecticidal, pharmaceutical, and cosmetic products. However, certain characteristics, such as the volatility of EOs, hinder their widespread use. To mitigate this limitation, several studies have investigated combinations of EOs with natural materials, including clay minerals. Clay minerals are abundant in nature, biocompatible, and non-toxic to the environment and humans. Clay minerals such as montmorillonite possess available sites where EO molecules can interact. The combination of EOs with clay minerals produces new materials for various applications including antibacterial, antifungal, insecticidal/repellent, and active packaging materials. Therefore, this review focuses on the immobilization of several types of EOs in raw and modified montmorillonites. The applications of the described systems were evaluated and demonstrated the synergism of the properties of the isolated components as a function of different EOs incorporated in the silicate matrix.

APÊNDICE B

Applied Clay Science 214 (2021) 106234



Contents lists available at ScienceDirect

Applied Clay Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/clay

When RNA meets montmorillonite: Influence of the pH and divalent cations

Luís H. de Oliveira^a, Pollyana Trigueiro^b, Baptiste Rigaud^c, Edson C. da Silva-Filho^b,
 Josy A. Osajima^b, Maria G. Fonseca^a, Jean-François Lambert^d, Thomas Georgelin^e,
 Maguy Jaber^{e,*}

^a LACOM, Laboratory of Fuels and Materials, UFPA, 58051-065 João Pessoa, PB, Brazil

^b LIMAV, Interdisciplinary Laboratory of Advanced Materials, UFPA, 64049-550 Teresina, PI, Brazil

^c CNRS, Institut des Matériaux de Paris Centre (FR2452), 4 place Jussieu, 75005 Paris, France

^d Sorbonne Université, LRS (Laboratoire de Réactivité de Surface), UMR 7197, 4 place Jussieu, F-75005 Paris, France

^e Sorbonne Université, LAMS (Laboratoire d'Archéologie Moléculaire et Structurale), UMR 6220, Institut Universitaire de France (IUF), 4 place Jussieu, F-75005 Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Ribonucleic acid
 Clay minerals
 Montmorillonite
 Prebiotic chemistry

ABSTRACT

A key question for the investigation of the origins of life is to understand the interaction between complex organic molecules and minerals. In this general frame, the present study investigated the nature of the interactions at the molecular level between a ribonucleic acid and ion-exchanged montmorillonites. We observed that the formation of RNA/clay mineral complexes was strongly pH-dependent. In a sufficiently acidic medium, the RNA molecules were intercalated in the interlayer space, in a flat-lying conformation, with a large contribution of electrostatic interactions that may be complemented by hydrogen bonds. The secondary structure of the RNA strands was strongly affected. The presence of different cations such as Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, and Sr²⁺ influenced the adsorption of organic molecules. Apparently, metal cations directly took part in the formation of bridges between the negative charges on the mineral surface and the phosphate groups of the biomolecule.