



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO POLI (ACRILAMIDA-
CO-DIALILDIMETILAMÔNIO)

Thaiany Melo da Silva

MACAÉ

Junho de 2015

Thaiany Melo da Silva

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO POLI (ACRILAMIDA-
CO-DIALILDIMETILAMÔNIO)

Monografia apresentada ao curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé como um dos requisitos para a obtenção do título de farmacêutico.

Orientadora: Prof^a Paula Alvarez Abreu

Co-orientador: Prof. Jorge Amim Júnior

Macaé

Junho de 2015

À minha família, por ter me apoiado e sempre acreditado no meu potencial, fazendo todo o esforço necessário para este fim e principalmente a minha filha, que mesmo não entendendo sobre a vida teve que aprender a lidar com a distância entre nós para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pois sem ele nada seria possível, ele me guiou e me protegeu durante todos esses anos distante de familiares e amigos.

À minha família, que sempre esteve ao meu lado e me proporcionou a realização dessa conquista.

À minha orientadora, pelo carinho, pela compreensão, pelo estímulo à pesquisa, por ter acreditado em mim, me apoiado e me orientado durante todo o desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu co-orientador e técnicos do laboratório, pelo auxílio sempre que necessário e esclarecimentos.

A FUNEMAC, pelo apoio a pesquisa e desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do curso, por todo aprendizado e estímulo.

Aos amigos que a faculdade me trouxe, pelo carinho, apoio e momentos de descontração.

RESUMO

Os fungos e bactérias apresentam grande importância como agentes de diversos tipos de infecções, também são importantes para a indústria alimentícia e farmacêutica, ao contaminarem alimentos e produtos para a saúde, levando a perdas para esses setores industriais e quando não detectados através dos processos de controle de qualidade podem ser responsáveis por alergias e intoxicações. Por isso, tem se buscado novos antifúngicos e antibióticos ou mesmo materiais capazes de inibir o crescimento de microrganismos. Alguns polímeros têm sido pesquisados na busca por atividade contra fungos e bactérias com o objetivo de serem aplicados em tratamento de água, embalagens, processamento de comida e dispositivos médicos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi testar a atividade antimicrobiana do polímero sintético poliacrilamida co-dialildimetilamônio (PAADDA) contra cepas de fungos filamentosos, leveduriformes e bactérias de grande relevância clínica e que podem ser também contaminantes. O polímero sintético foi caracterizado através da determinação de sua espessura, espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR-ATR), propriedade óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV), o que mostrou que o polímero era realmente o PAADDA, amorfo e homogêneo. Os testes da atividade antimicrobiana foram realizados com o polímero na sua forma de filme e na forma líquida a 5% e 10% de água, sendo inseridos em discos de 5 mm e colocados na placa contendo o meio de cultura Ágar Müller Hinton e o inóculo. As placas foram incubadas a 35°C ou 37°C por 48 h e a leitura foi realizada pela observação da formação de um halo de inibição do crescimento do micro-organismo e medida deste halo. Os resultados mostraram que o polímero na forma de filme inibiu o crescimento do fungo *Candida tropicalis* ATCC 28707. A descoberta da atividade antifúngica desse polímero pode trazer novas utilizações para ele, como sua incorporação a materiais nos quais seja importante a inibição do crescimento de micro-organismos.

Lista de figuras

Figura 1 – Exemplos de contaminação por micro-organismos. A) alimento contaminado por fungo; B) medicamento que foi exposto ao ambiente, que pode ter sofrido contaminações por fungos e bactérias.	11
Figura 2 – Estrutura de alguns antifúngicos usados em infecções fúngicas.	13
Figura 3 – Estrutura de alguns antibióticos usados na clínica.	16
Figura 4 – Ilustração de monômero, mero e a formação de um polímero, onde n é o grau de polimerização de um polímero (neste caso, o polietileno).	17
Figura 5 – Representação dos tipos de polímero de acordo com a estrutura química, a) homopolímero b) copolímero	17
Figura 6 – Síntese do PAADDA a partir da acrilamida (AA) e cloreto de dimetildialilamônio (DMDAAC), por meio de copolimerização de radicais livres.	21
Figura 7 – Micrômetro utilizado para as medições.	24
Figura 8 – Espectrofotômetro FTIR-ATR	25
Figura 9 – Espectrofotômetro UV-VIS	26
Figura 10 – Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)	26
Figura 11 – Esquema das sucessivas diluições realizadas para avaliar se o inóculo obedecia a escala de Mc Farland através da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).	28
Figura 12 – Esquema do teste de sensibilidade a micro-organismos usando o método de disco-difusão em ágar.	30
Figura 13 – Espectro de infravermelho do PAADDA.	32
Figura 14 – Espectro de transmitância do filme de PAADDA.	32
Figura 15 – Imagens de MEV da (A) fratura do filme de PAADDA; (B), ampliação e (C) superfície do filme de PAADDA.	33
Figura 16 – Foto do teste de disco-difusão em Agar do PAADDA na cepa de <i>Candida tropicalis</i> .	37
Figura 17 – Testes em que os micro-organismos não foram sensíveis ao polímero – (A) <i>Candida albicans</i> , (B) <i>Rodothorula mucilaginosa</i> (C) <i>Candida Krusei</i> .	37

Lista de tabelas

Tabela 1 – Resultado das medições de espessura do polímero	31
Tabela 2 – Diâmetro do halo nos testes antifúngicos e antimicrobiano do polímero nas cepas avaliadas.	35
Tabela 3 – Teste de disco-difusão em Agar de antifúngicos comerciais na cepa de <i>Candida tropicalis</i> ATCC 28707.	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
1.1 A importância do controle de micro-organismos	09
1.1.1 Contaminação de alimentos e produtos para a saúde por micro-organismos	09
1.1.2 Infecções por fungos e antifúngicos	11
1.1.3 Infecções por bactérias e antibióticos	13
1.2 Polímeros e suas aplicações: uma possível fonte de novos antimicrobianos	16
2 JUSTIFICATIVA	22
3 OBJETIVO	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Testes de caracterização do polímero	24
4.1.1 Determinação da espessura do polímero	24
4.1.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR-ATR)	25
4.1.3 Propriedade óptica	25
4.1.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	26
4.2 Preparo da diluição do polímero	27
4.3 Testes antimicrobianos	27
4.3.1 Cepas de fungos e bactérias utilizados no teste	27
4.3.2 Preparo do inóculo	27
4.3.3 Testes da atividade antimicrobiana do polímero	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Testes de caracterização do polímero	31
5.1.1 Determinação da espessura do filme	31
5.1.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR-ATR)	31
5.1.3 Propriedade óptica	32
5.1.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	33
5.2 Testes antimicrobianos	34
6 CONCLUSÃO	41
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 A importância do controle de micro-organismos

1.1.1 Contaminação de alimentos e produtos para a saúde por micro-organismos

A busca por uma maior qualidade em produtos tanto do ramo alimentício como de cuidados para a saúde tem sido uma constante para o ser humano na atualidade (PERUZZO, COSTA, ABRAHÃO, 2006). A contaminação destes produtos por microrganismos pode ter inúmeras consequências para seus produtores e também para a saúde de quem os utiliza (CUNHA, 2009).

Uma grande preocupação da indústria alimentícia é com a contaminação de alimentos por microrganismos oportunistas (DE CASTRO ALMEIDA et al. 1995). Essa contaminação pode ocorrer na natureza, durante seu cultivo, na manipulação, no seu processamento ou durante um armazenamento incorreto (CUNHA, 2009).

Os fungos também são importantes para a indústria alimentícia por serem grandes contaminantes de frutos, a podridão que esses micro-organismos causam nas frutas representa uma grande perda para o produtor agrícola particularmente no Brasil que é um grande produtor e exportador de frutas (DA SILVEIRA et al. 2005).

A contaminação do alimento durante sua manipulação pode ocorrer através das mãos dos manipuladores, que podem conter bactérias quando estes estão doentes, possuem hábitos anti-higiênicos, manipulam o alimento de forma inadequada ou mesmo quando tem alguma doença assintomática (DE ANDRADE, DA SILVA, BRABES, 2003). Essas bactérias causadoras de infecções podem ser transitórias, que são em geral bactérias gram-negativas que podem ser eliminadas durante uma lavagem adequada das mãos, ou residentes que são na maioria gram-positivas e fazem parte da microbiota da pele, podendo viver em equilíbrio, como saprófitas ou como parasitas. Os estafilococos são exemplos de microrganismos que podem viver dessa forma e dependendo da sua patogenicidade, principalmente a capacidade de produzir enterotoxinas, podem levar a graves problemas de saúde. (DE CASTRO ALMEIDA et al. 1995).

Um alimento contaminado por microrganismos pode sofrer alterações físicas, químicas e organolépticas, propiciando a sua deterioração (CUNHA, 2009).

As indústrias de alimentos passaram a incorporar em sua produção as Boas Práticas de Fabricação (BPF), aumentando o controle da água, do fluxo de pessoas, evitando contaminações cruzadas, controlando a higiene e comportamento dos manipuladores e a higienização das superfícies, por exemplo. Mas, um estudo realizado pela Administração Nacional da Aeronáutica e do Espaço (*National Aeronautics and Space Administration*, NASA) mostrou que apenas as Boas Práticas de Fabricação não são suficientes para garantir que não ocorram contaminações. Desenvolveu-se então o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), que detecta contaminantes físicos, químicos ou biológicos que podem ocorrer durante uma linha de produção (CUNHA, 2009). Os perigos de natureza biológica são as bactérias, fungos, protozoários ou quaisquer outros organismos que liberem toxinas e sejam infecciosos (DE ANDRADE, DA SILVA, BRABES, 2003).

Na fabricação de medicamentos e cosméticos também são necessárias análises microbiológicas de matérias primas e de produtos acabados para que seja garantida a sua segurança e eficácia e atinja o padrão de qualidade (ANDRADE, 2007).

Estudos já demonstraram a presença de diversas bactérias, como *Enterobacter sp*, *Serratia sp* e *Proteus sp* em excipientes farmacêuticos. As formulações de uso tópico merecem atenção por serem alvos de microrganismos e uma matéria-prima que necessita de uma atenção especial também é a água, já que ela é essencial para a sobrevivência e proliferação de contaminantes (ANDRADE, 2007).

Outro grande alvo desses organismos são as plantas medicinais e produtos naturais, que são muito utilizados como adjuvantes ou componentes ativos em formulações (SOUZA-MOREIRA). As farmácias magistrais na sua maioria terceirizam o seu controle de qualidade, que são os ensaios físico-químicos e microbiológicos (ANDRADE, 2007).

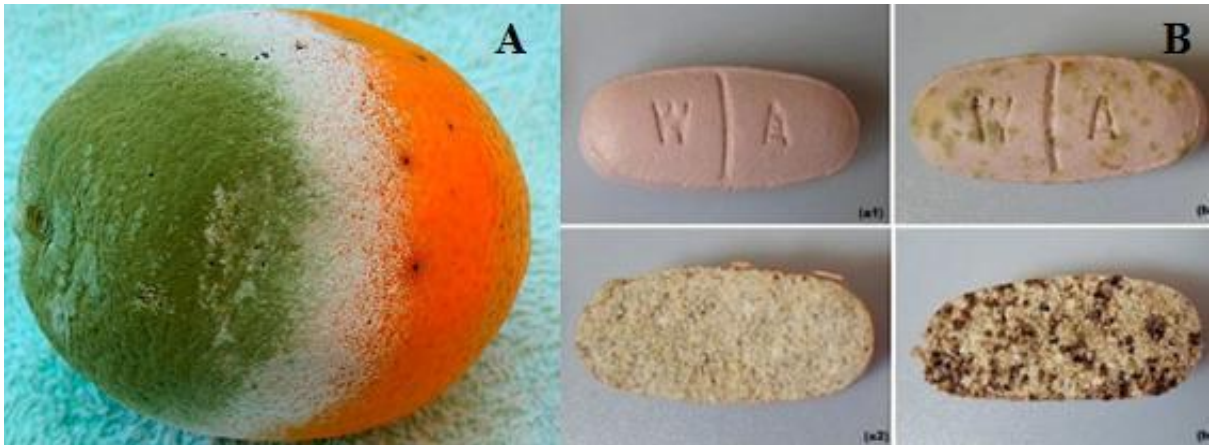


Figura 1 – Exemplos de contaminação por micro-organismos. A) alimento contaminado por fungo, B) medicamento que foi exposto ao ambiente, que pode ter sofrido contaminações por fungos e bactérias.

1.1.2 Infecções por fungos e antifúngicos

Nos últimos anos as infecções fúngicas têm aumentado em frequência e importância. Com o uso de antibióticos, corticóides e imunossupressores ocorreu um aumento das infecções fúngicas sem precedentes em todo o mundo. Embora esses avanços melhorem o prognóstico de muitas doenças, tem levado ao aumento da ocorrência de infecções oportunistas. As infecções fúngicas oportunistas são aquelas causadas por fungos de baixa virulência que, ao encontrar condições favoráveis, como em indivíduos imunodeprimidos, desenvolvem seu poder patogênico, invadindo os tecidos (TRABULSI e ALTHERTUM, 2004). A incidência anual delas tem aumentado de 3 a 20 vezes. Pacientes imunodeprimidos, principalmente os HIV positivos são uma população muito susceptível a esse tipo de infecção, levando a uma alta taxa de mortalidade, principalmente em países subdesenvolvidos (CUENCA-ESTRELLA, et. al 2008).

As infecções fúngicas são de grande relevância no ambiente hospitalar (MENEZES et al, 2009). O gênero *Candida* spp, por exemplo, é responsável por cerca de 80% das infecções fúngicas em ambientes hospitalares, chegando a ser a quarta principal causa de infecções na corrente sanguínea. Espécies de *Candida* fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal de humanos e em mulheres está presente também na microbiota vaginal, e podem se tornar patogênicos por alterações no mecanismo de defesa do hospedeiro (COLOMBO E GUIMARÃES,

2003). Esse gênero é considerado uma das infecções fúngicas mais frequentes (YAPAR, 2014) e também é responsável pela candidose bucal (ALVES et al., 2009).

Outra infecção oportunista importante é a aspergilose pulmonar causada pelo gênero *Aspergillus sp.* Sua gravidade se acentua quando ocorre em pacientes imunodeficientes, principalmente os hospitalizados e acometidos pela Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). O diagnóstico é difícil, devido aos sinais e sintomas não serem específicos da doença e o isolamento do fungo ser raramente demonstrado (AMORIM et. al, 2004).

Atualmente poucas classes de antifúngicos são usados em infecções sistêmicas oportunistas. Na década de 1950 surgiu a anfotericina B, que passou a ser o fármaco de escolha no tratamento de infecções disseminadas. Na década de 1970 o uso dos derivados azólicos teve início na prática clínica causando grande impacto na terapia antifúngica devido ao largo espectro de ação, principalmente pelo uso do cetoconazol com administração por via oral. Em 1990 foram introduzidos os derivados triazólicos (fluconazol e itraconazol) aos imidazólicos. Outros antifúngicos mais novos vêm sendo introduzidos na clínica, como novas formulações de anfotericina B, novos derivados triazólicos como voriconazol e posaconazol e novas classes de antifúngicos buscando-se aumentar seus espectros de ação (MARTINEZ, 2006).

Os azóis são antifúngicos, de largo espectro que atuam sobre leveduras e fungos filamentosos. O principal mecanismo de ação dos derivados azólicos é a inibição da biossíntese do ergosterol, que é importante para a integridade e a manutenção da função da membrana celular dos fungos. O cetoconazol é indicado em uso tópico ou por via oral, tendo amplo potencial terapêutico para o tratamento de infecções micóticas superficiais e sistêmicas (DE OLIVEIRA, 2002). Os derivados azólicos, principalmente os imidazólicos, exercem ação apenas fungistática. Embora mais antifúngicos estejam disponíveis, o fluconazol ainda é considerado o fármaco de escolha para tratar a maioria das infecções por *Candida* (MARTINEZ, 2006).

A anfotericina B é classicamente considerada o fármaco de escolha no tratamento das infecções sistêmicas, embora a taxa global de cura não seja superior a 50%. A recuperação das defesas do hospedeiro representa um dos fatores mais importantes para o sucesso do tratamento das infecções fúngicas. Quando há dúvidas quanto a espécie agente da infecção, se o paciente já vinha recebendo

tratamento com um derivado azólico, ou em infecções por espécies resistentes ao fluconazol, a anfotericina B deve ser usada (NUCCI, 2000).

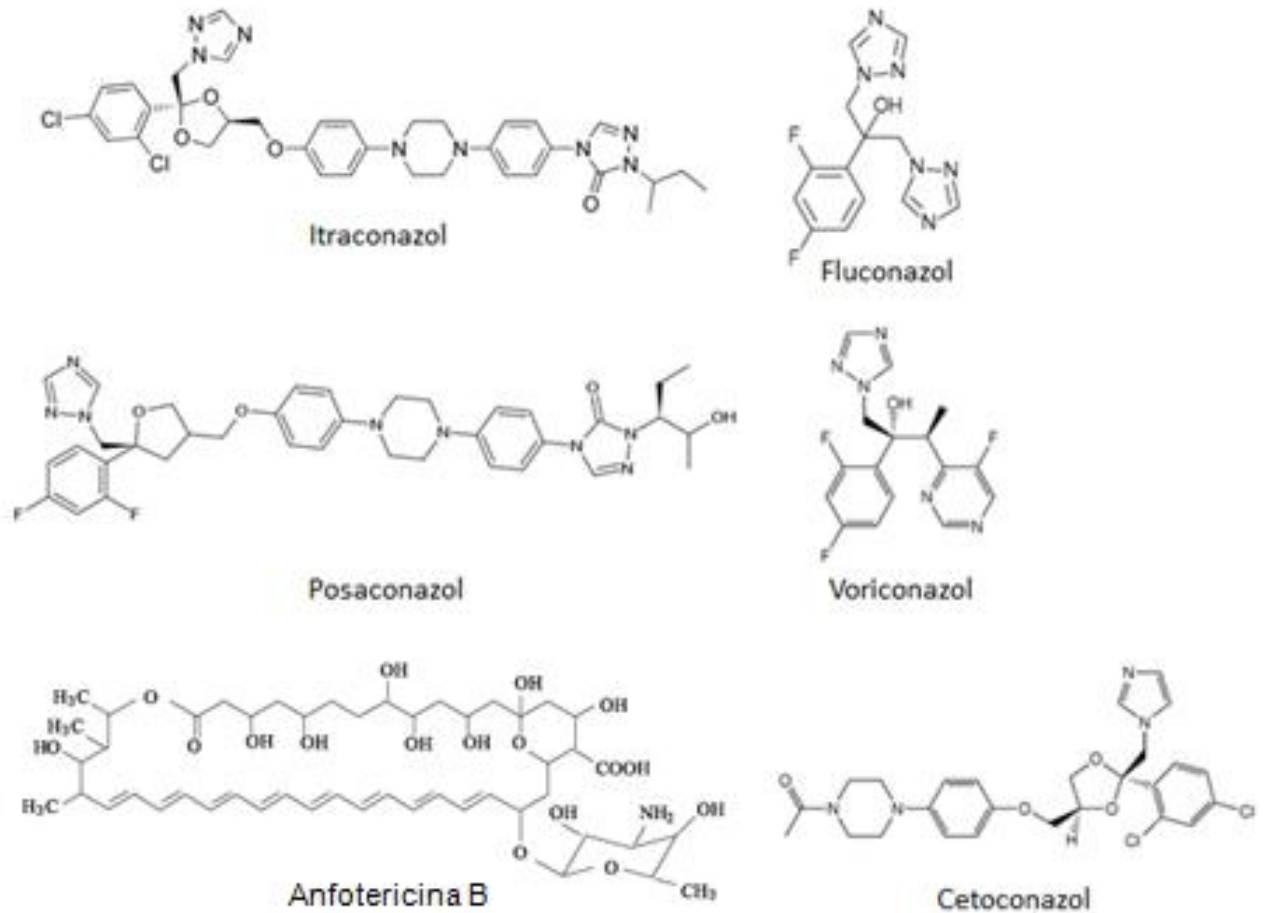


Figura 2 - Estrutura de alguns antifúngicos usados em infecções fúngicas.

1.1.3 Infecções por bactérias e antibióticos

As bactérias são organismos procariontes e unicelulares, que podem ser encontrados em qualquer lugar. Muitas delas estão presentes em mucosas, trato gastrointestinal, no revestimento da pele e fazem parte da microbiota podendo muitas vezes ter ação benéfica ao ser humano por produzir uma linha de defesa contra outros organismos invasores, assim como também prover nutrientes (DE QUEIRÓS SANTOS, 2004). Entretanto, podem ser responsáveis por centenas de doenças, como: inflamações de garganta e ouvido, tuberculose, sífilis, cólera, entre outras. Sua transmissão pode se dar por inalação, ingestão, ferimentos na pele, relações

sexuais e outras. Sua patogenicidade muitas vezes está relacionada a sua capacidade de produzir toxinas (TORTORA, 2012).

A alta taxa de proliferação, invasão e mutação em bactérias causadoras de infecções, tem se tornado um grande problema de saúde pública, principalmente em decorrência dos altos índices de resistência bacteriana aos antibióticos utilizados em todo mundo, tendo como consequência mortes e altos custos para os sistemas de saúde (DE QUEIRÓS SANTOS, 2004).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são capazes de provocar infecções, abscessos, supurações e sepse, podendo levar à morte (BASTOS et al., 2013). Pacientes imunocomprometidos, vítimas de graves queimaduras e aqueles que se encontram em Unidades de Terapia Intensiva estão extremamente susceptíveis a infecções e é nessas unidades em que se encontram facilmente a persistência de resistência bacteriana a alguns antibióticos (MILLAN et al, 2012).

Bactérias são causas de infecções corriqueiras, como exemplo a família *Enterobacteriaceae*, em que a *Escherichia coli*, *Klebsiella spp* e *Salmonella entérica* são responsáveis por infecções do trato urinário, pneumonias e gastroenterites, respectivamente (GASTALHO, SILVA, RAMOS, 2014). *Staphylococcus aureus* é um dos maiores causadores de infecções hospitalares, principalmente por estar presente normalmente na nasofaringe de diversos indivíduos, em especial quando esses indivíduos que são portadores saudáveis se encontram em ambientes hospitalares (BASTOS et al., 2013). Essa bactéria também pode causar a endocardite bacteriana, através do uso de cateter venoso central e chega a acometer 16% dos pacientes que fazem uso desse material e se encontram com uma infecção por *S. aureus*, podendo chegar a 70% de mortalidade entre esses pacientes (BUB et al., 2012).

Um estudo demonstrou que a sepse é uma importante causa de mortes em Unidades de Terapia Intensiva, e se dá pela presença do agente patogênico na corrente sanguínea, mais frequentemente bactérias, se o sistema imunológico não consegue combater a infecção ela pode se tornar generalizada, atingindo outros órgãos e tecidos. Em resposta à infecção ocorre variação da temperatura corporal, pressão arterial, frequência cardíaca podendo causar um choque séptico (SANTOS et al., 2015).

Quando ocorrem infecções bacterianas o tratamento pode se dar através de cirurgias, imunoterapia passiva e uso de antimicrobianos. Os antimicrobianos representaram uma grande descoberta na medicina e levaram à diminuição da mortalidade por infecções, mas, com o passar do tempo, as linhagens bacterianas patogênicas sofreram variabilidade, que possibilitou uma capacidade invasiva maior, as tornando também mais resistentes aos antibióticos. A resistência bacteriana se tornou uma preocupação mundial e motivo de diversos estudos que buscam novos antimicrobianos, o que não é uma tarefa fácil (DE OLIVEIRA, MUNARETTO, 2013). A resistência bacteriana pode ser influenciada por fatores como o uso inapropriado do antimicrobiano, por exemplo (DE OLIVEIRA, MUNARETTO, 2013), sendo o teste de sensibilidade importante por proporcionar uma antibioticoterapia mais eficiente e adequada (BASTOS et al., 2013).

Os antibióticos constituem uma das classes de medicamentos mais prescritos. Eles atuam de diferentes formas, através da inibição da síntese de proteínas e enzimas, impedimento da formação de membranas, interferência no transporte de membrana, dentre outros (HARAGUCHI, 2000). Os primeiros antibióticos descobertos eram produzidos por micro-organismos, mas com o passar dos anos outras classes de antibióticos foram sendo sintetizadas em laboratório através de modificações estruturais. Um grande marco para a medicina foi a descoberta da Penicilina, através do isolamento de extratos de *Penicillium* em 1928, por Fleming. Com a descoberta de novos antibióticos as infecções foram reduzindo consideravelmente, algumas foram até mesmo erradicadas, como a febre reumática (FERREIRA, 2008).

Uma das classes de antibióticos mais utilizados atualmente são as cefalosporinas, sendo agentes de escolha para diversos tipos de infecção, elas diferem das penicilinas estruturalmente, as duas classes possuem um anel beta-lactâmico, porém as penicilinas são fusionadas a um anel de cinco membros, enquanto as cefalosporinas por um anel de seis membros. Seu mecanismo de ação é o mesmo dos outros antibióticos beta-lactâmicos, inibindo a síntese do peptidoglicano, responsável pela formação da membrana bacteriana, levando esta à morte. Alguns exemplos de cefalosporinas são cefazolina, cefalotina, cefalexina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima (MELLA, SERGIO et al., 2001).

A classe dos aminoglicosídeos, como a gentamicina, amicacina e neomicina possuem sua ação através da ligação à subunidade 30S ribossomal, ocasionando assim, a leitura incorreta do RNA mensageiro e consequentemente inibindo a síntese proteica. Outra classe que possui ação parecida, diferenciando-se apenas pela unidade ribossomal a que se liga, sendo esta a 50S, impedindo as reações de transpeptidação e translocação, são os macrolídeos, que contam com alguns representantes como a eritromicina, claritromicina e azitromicina (HARDMAN, LIMBIRD, 2006).

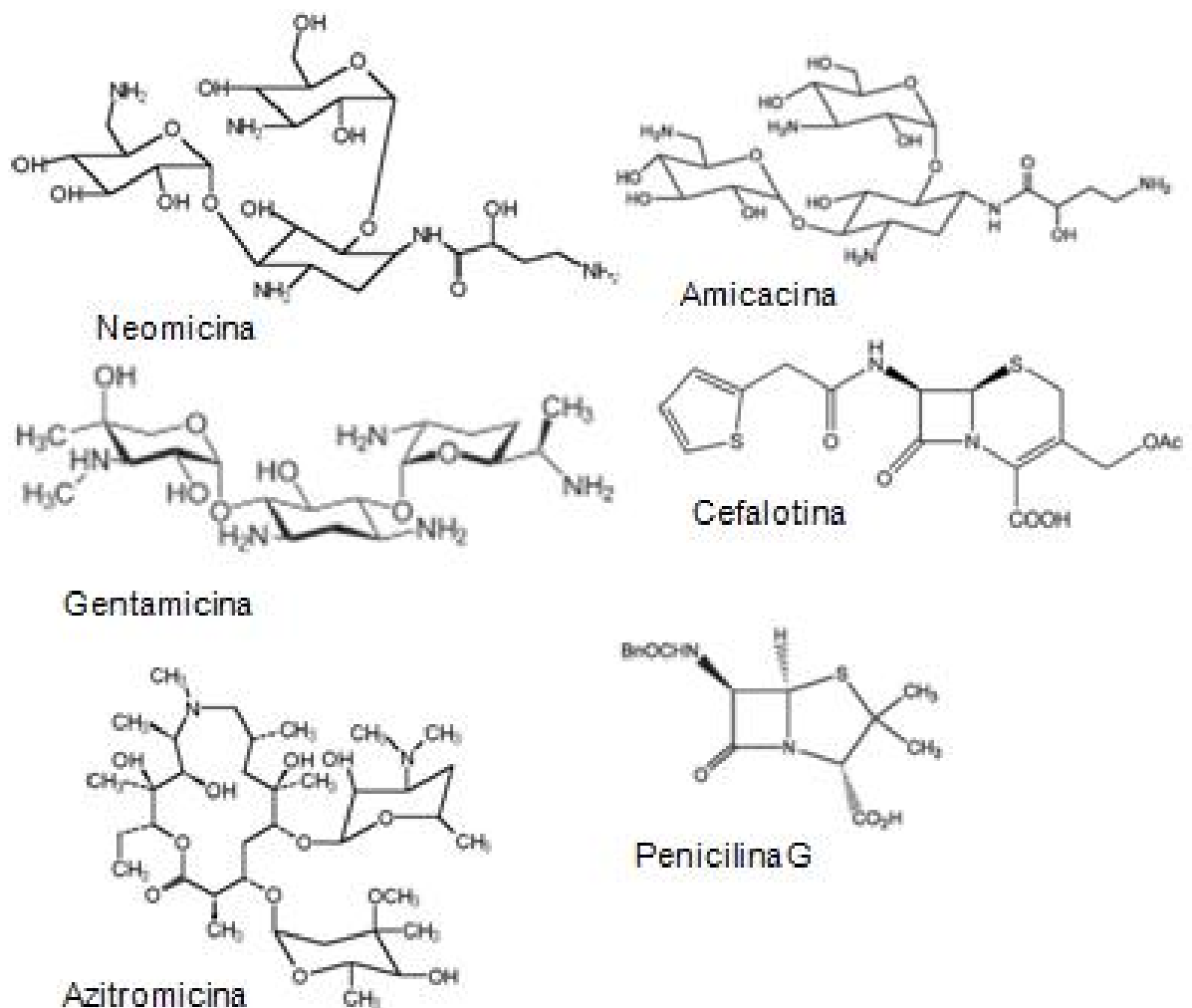


Figura 3 – Estrutura de alguns antibióticos usados na clínica.

1.2 Polímeros e suas aplicações: Uma possível fonte de novos antimicrobianos

Polímeros são macromoléculas formadas por unidades químicas que se repetem ao longo de sua cadeia, denominados meros, que estão conectados através de ligações covalentes. Os polímeros são preparados pela reação química (polimerização) entre moléculas de baixo peso molecular, chamadas monômeros. A quantidade de monômeros que formam o polímero dependerá do seu grau de polimerização (n) (WILEY, 2004) (Figura 4).

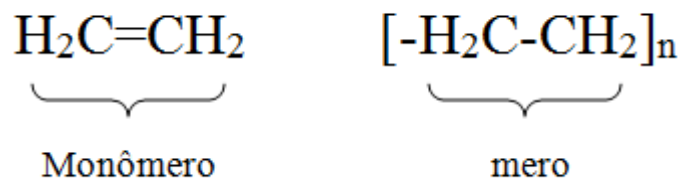


Figura 4 – Ilustração de monômero, mero e a formação de um polímero, onde n é o grau de polimerização de um polímero (neste caso, o polietileno).

Em relação a estrutura química dos polímeros, estes podem ser divididos em homopolímeros quando a cadeia polimérica é formada somente por uma unidade repetitiva, e copolímero quando a macromolécula contém mais de um tipo de unidade repetitiva na cadeia (Figura 5) (WILEY, 2004).

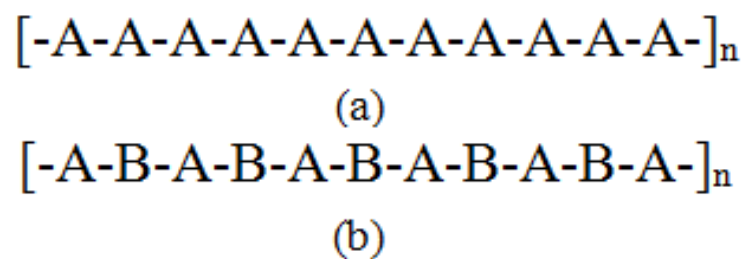


Figura 5 – Representação dos tipos de polímero de acordo com a estrutura química a) homopolímero b) copolímero.

Os polímeros podem ser encontrados na natureza, sendo denominados biopolímeros ou sintetizados em laboratórios (DA SILVA SPINACÉ, DE PAOLI, 2005). A maior parte dos polímeros sintéticos é constituída por cadeias de tamanho não uniforme, sendo assim, suas propriedades dependem de seus componentes, seus pesos moleculares e a sua distribuição. Eles possuem baixa densidade e alta resistência (BRAUMAN, 1991). Como nanopartículas são capazes de produzir

materiais com aplicações nas áreas biológicas, farmacêuticas, físicas e biomédicas. (SONDI, SALOPEK-SONDI, 2004).

Os materiais poliméricos podem ser obtidos por diversos tipos de processos, como polimerização por adição, condensação e em suspensão. A polimerização em suspensão é a técnica mais utilizada no preparo de polímeros, pois o processo é mais fácil de ser controlado e, além disso, os produtos obtidos são mais fáceis de serem separados e possuem baixos níveis de impureza. Este processo é o mais adequado para a produção de polímeros que tem aplicações biotecnológicas e médicas. Resumidamente, este processo de polimerização baseia-se em uma emulsão de água, monômero do polímero desejado, de um surfactante (agente emulsificante) e de um iniciador de reação radicalar. Na mistura, o surfactante a partir de uma determinada concentração, denominada concentração micelar crítica-CMC, forma micelas que dissolvem os monômeros no seu interior hidrofóbico. Após o acréscimo do iniciador na emulsão, este migra para o interior da micela e inicia a reação de polimerização (MACHADO et al, 2007).

Os polímeros plásticos ou termoplásticos estão ganhando bastante espaço no mercado brasileiro, porque além de seu baixo custo de produção apresentam uma ampla faixa de aplicação, podendo ser utilizados, por exemplo, como isolantes térmicos e elétricos, possuem baixa densidade e podem ser facilmente moldados a quente. Alguns exemplos são o politereftalato de etileno (PET), o polietileno (PE) e o policloreto de vinila (PVC). As suas principais aplicações são em descartáveis, embalagens primárias, filmes, na construção civil, em eletrodomésticos, fibras e no setor automotivo (DA SILVA SPINACÉ, DE PAOLI, 2005).

O polímero termoplástico mais utilizado atualmente é o polietileno linear de baixa densidade, que é um polímero flexível, possui fases amorfas e cristalinas e é inerte. Fornece grande capacidade de selagem a quente, possui uma vasta aplicação em embalagens, filmes industriais, fraldas descartáveis e absorventes, lonas, revestimento de fios e cabos, brinquedos, artigos farmacêuticos e hospitalares. (COUTINHO et al., 2003).

Um setor em que os polímeros possuem um grande destaque é o setor farmacêutico, onde eles podem ser utilizados na preparação de medicamento e cosméticos. Seu uso mais antigo está relacionado à função de excipiente de formulações sólidas podendo exercer diversas funções, diluente (como por exemplo,

lactose, amido, manitol e celulose microcristalina), aglutinante (como por exemplo, vinil pirrolidona, derivados de celulose, polissacarídeos e outros) e desintegrantes. O polímero também é o agente emulsionante mais utilizado em cremes, loções e pomadas. Em formulações líquidas são utilizados como estabilizantes e solubilizantes. Medicamentos de uso parenteral utilizam polímeros como solventes, co-solventes e estabilizantes (VILLANOVA et al., 2010).

Na aplicação em cosméticos, os polímeros contendo amônia quaternária são utilizados na fabricação de xampus com boas propriedades, já os de natureza aniônica dão origem a bons condicionadores. Mas o maior destaque que os polímeros vêm trazendo para a indústria farmacêutica é na fabricação de sistemas de liberação controlada de medicamentos, que consistem em prolongar o tempo de liberação do fármaco no organismo e manter sua concentração no plasma, além de muitas vezes controlar seu local de liberação também. Os polímeros utilizados para esse fim são na maioria das vezes biodegradáveis, já que é desejável que após toda a liberação do fármaco estes não estejam mais no organismo. Esses polímeros podem exercer função muco adesiva, após se ligarem a membrana celular ou a camada mucosa; podem ser hidrogéis, que permitem a entrada de água sem se solubilizarem e dessa forma permitem a saída do fármaco e biomiméticos que são aqueles que interagem seletivamente com o microambiente biológico, mimetizando-o; os bioativos interagem com receptores celulares, produzindo respostas biológicas através do seu reconhecimento e por último os terapêuticos, que também se ligam a receptores, mas esses são específicos e ligam-se a patógenos ou células nas quais desenvolvem uma resposta terapêutica (VILLANOVA et al., 2010). Além disso, os polímeros podem ser encontrados também como partículas com morfologia controlada para uso em embolização vascular, como suporte para enzimas ou como cimento ósseo para tratamento de osteoporose e em cirurgias dentárias (MACHADO, et al, 2007).

Além disso, têm sido estudados polímeros que mimetizam peptídeos antimicrobianos produzidos por organismos eucariontes. Estes peptídeos são responsáveis por sua imunidade inata (não específica), sendo a primeira linha de defesa contra micro-organismos. Esta atividade antimicrobiana está relacionada à cadeia lateral desses peptídeos, que são hidrofóbicas e apresentam cátions, que segregam em face oposta de uma folha hélice, os cátions se ligam seletivamente,

através de ligações eletrostáticas a ânions, encontrados em membranas fosfolipídicas bacterianas, os componentes hidrofóbicos dos peptídeos interagem com a cauda hidrofóbica dos fosfolípidos e ocorre a formação de poros na membrana bacteriana que causam desorganização e alteram a permeabilidade da membrana, levando a bactéria a morte. Como a produção desses peptídeos é cara e existem muitos outros fatores que limitam sua produção, os esforços tem sido realizados em produzir polímeros que mimetizem essa atividade antimicrobiana através dessas mesmas características físico-químicas dos peptídeos antimicrobianos (BAUL et al., 2014), (TEW, 2002). Dentre os possíveis agentes antimicrobianos em desenvolvimento, os compostos catiônicos têm sido apontados como possíveis candidatos, isso se deve a presença de cargas positivas em sua superfície, como a maioria dos polímeros estudados com ação antimicrobiana, em geral possuem uma amônia quaternária em sua estrutura (MUNOZ-BONILLA, FERNANDEZ-GARCIA, 2012).

A investigação de materiais antibacterianos também tem sido intensa, a incorporação de íons prata e prata metálicos mostra efeitos sobre as bactérias, o mecanismo pelo qual essa inibição de crescimento ocorre não é bem esclarecido, acredita-se que os metais pesados reagem com as proteínas pelos grupos tiol (SH), levando a inativação desses organismos. Comprovou-se através de estudos que o crescimento da bactéria Gram-positiva *S. aureus* e da Gram-negativa *E. coli* foram inibidas por nanopartícula de prata (Ag-PN), na qual foi adicionada o polímero poli-(N-vinil- 2-pirrolidona) (PVP) (CHO, 2005). Outra modificação que pode ser feita nos sistemas que possuem polímeros é a sua preparação adicionando frações em micrômetros de compostos inorgânicos, como carbonato de cálcio e talco, que são capazes de melhorar propriedades mecânicas dos polímeros (TJONG, 2006).

Os polímeros podem ser utilizados isoladamente ou incorporados a formulações. Outra vantagem é que alguns deles apresentam uma baixa toxicidade para células humanas, assim, sua utilização pode ser ainda mais ampla (CARMONA-RIBEIRO, CARRASCO, 2013).

O desenvolvimento de superfícies antimicrobianas, que impeçam a formação de biofilmes de micro-organismos é uma maneira de controlar ou inibir as infecções. Superfícies constituídas por polímeros antimicrobianos podem possuir essas

características. O primeiro polímero utilizado como desinfetante comercial foi o poli (hexametileno cloridrato biguanidinium) (SIEDENBIEDEL, TILLER, 2012). Estudos já descreveram a preparação de superfícies que matam as bactérias em contacto por ligação covalente a polímeros de piridínio, o Poli (4- vinilpiridina) (P4VP) combinado com diferentes brometos de alquilo (de propilo para hexadecil) foi capaz de matar *Staphylococcus epidermidis*, *P. aeruginosa* e bactéria *Escherichia coli* resistentes a fármacos (MUNOZ-BONILLA, FERNANDEZ-GARCIA, 2012).

O poli(acrilamida-co-dialildimetilamônio) - PAADDA é um copolímero solúvel em água, produzido por reação de copolimerização de radicais livres entre a acrilamida (AA) e o cloreto de dialildimetilamônio (DMAAC), como mostra a figura 6. O PAADDA é um polímero muito utilizado na preparação de membranas de troca de ânions, devido a presença da amônia quaternária (ZHOUAT et al, 2013) na sua estrutura química. Contudo, não existe na literatura trabalhos relatando a aplicação de filme do PAADDA como um material antimicrobiano, visto que é bem descrito que o grupo dialildimetilamônio apresenta esta atividade (CARMONA-RIBEIRO, CARRASCO, 2013).

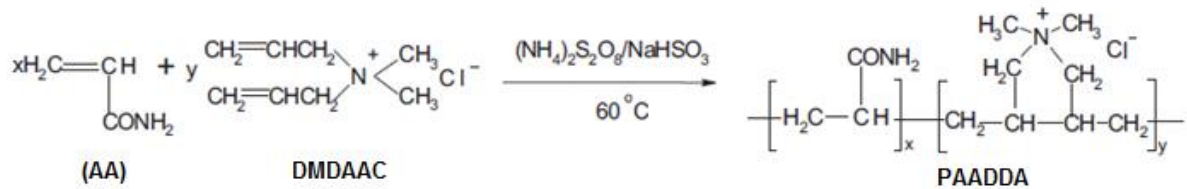


Figura 6 – Síntese do PAADDA a partir da acrilamida (AA) e cloreto de dimetildialilamônio (DMAAC), por meio de copolimerização de radicais livres.

2 JUSTIFICATIVA

Os micro-organismos, como fungos e bactérias, são contaminantes de diversos produtos, incluindo alimentos e artigos para saúde. Além das contaminações podem levar a diversas doenças com consequências graves à saúde, sendo as doenças infecciosas um problema de saúde pública mundial (GURGEL, CARVALHO, 2008). O crescente número de micro-organismos multirresistentes e o aumento de infecções invasivas e de pacientes com condições predisponentes para o desenvolvimento das mesmas faz com que a busca e desenvolvimento de novos antimicrobianos e materiais que possam inibir o crescimento desses organismos seja cada vez mais necessária, o que tem propiciado um aumento de estudos relacionados à ação antimicrobiana e esforços de milhares de pesquisadores (BAUL et. al,2014).

Os polímeros antimicrobianos representam interesse tanto para a indústria quanto para a pesquisa dentro da área acadêmica, já que estudos mostram que eles podem ser utilizados como matrizes na produção de medicamentos, aprisionando moléculas ativas para que sejam liberadas mais tardiamente, evitando que possam sofrer ações do patógeno, que diminuem a ação do medicamento, sendo uma vantagem para tratar infecções com organismos multirresistentes a antibióticos (MUÑOZ-BONILLA, 2012). Além disso, polímeros superficiais com atividade antimicrobiana podem evitar a disseminação das infecções por impedirem a formação de filmes de micro-organismos, o que é extremamente importante em ambientes hospitalares (SIEDENBIEDEL, 2012).

3 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é investigar a atividade antimicrobiana do polímero cloreto de poliacrilamida co-dialildimetilamônio (PAADDA) na forma de filme e diluído em água.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Testes de caracterização do polímero

O polímero utilizado no teste foi o cloreto de poliacrilamida co-dialildimetilamônio (PAADDA) adquirido da Sigma-Aldrich em solução aquosa 10%, com a seguinte porcentagem dos blocos acrilamida (AA) e dialildimetilamônio (DMDAA): 55% de AA e 45% de DMDAA. O filme do polímero PAADDA foi obtido pela técnica de evaporação do solvente (*Casting*). Para isto, misturou-se 10 g da solução a 10% m/m de PAADDA com 10 mL de água destilada. Após 30 minutos de agitação a 200 rpm, a solução foi despejada em um prato plástico de polietileno com tamanho de 7,5 cm x 7,5 cm e deixado em estufa com temperatura controlada de 50 °C por no mínimo 3 dias. Depois de pronto, o filme foi cortado em discos com diâmetro de 1,5 cm.

4.1.1 Determinação da espessura do filme

A espessura do filme do polímero PAADDA foi medida utilizando-se um micrômetro externo digital de superfícies plana da marca Digimess, de 0 a 25 mm, com resolução de 0,001 mm (Figura 7). Foram feitas cinco medidas em diferentes pontos do filme.



Figura 7- Micrômetro utilizado para as medições.

4.1.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR-ATR)

O espectro de infravermelho do filme de PAADDA foi obtido em um espectrofotômetro IRAffinity-1 da Shimadzu utilizando 40 scans, disponível no laboratório de físico-química do campus UFRJ-Macaé. O espectro foi registrado na região entre $4000-700\text{cm}^{-1}$, com uma resolução de 4cm^{-1} , empregando-se a técnica de reflectância total atenuada (*attenuated total reflectance, ATR*), como mostra a figura 8.



Figura 8 –Espectrofotômetro FTIR-ATR .

4.1.3 Propriedade óptica do filme

O espectro de transmitância do filme de PAADDA foi obtido em um espectrofotômetro UV-Vis da Shimadzu (UV-2600) sobre lâminas de quartzo na região entre 200 e 800nm (Figura 9). Disponível no laboratório de físico-química do campus UFRJ-Macaé.



Figura 9 – Espectrofotômetro UV-VIS

4.1.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens de microscopia da superfície e da fratura do filme de PAADDA foram obtidas em um microscópio *Field Emission Scanning Electrons Microscope* da *Jeol*, modelo JSM 7401F (Figura 10), disponível na central analítica do Instituto de Química da USP.



Figura 10 – Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

4.2 Preparo da diluição do polímero

A diluição de 5% foi preparada a partir da solução do polímero a 10% sendo retirado com uma micropipeta automática, 1 mL da solução inicial (10%) e misturada a 1ml de água destilada estéril em um Eppendorf.

4.3 Testes antimicrobianos

4.3.1 Cepas de fungos e bactérias utilizadas nos testes

Para teste da atividade antifúngica foram utilizadas as cepas dos fungos: *Aspergillus terreus* (ATCC 08113), *Aspergillus flavus* (ATCC 16883), *Candida albicans* (ATCC 14053), *Candida tropicalis* (ATCC 28707), *Candida krusei* (ATCC 34135), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida parapsilosis* (ATCC 90018) e *Rhodotorula mucilaginosa* (ATCC 64684).

Para teste da atividade antibacteriana foram utilizadas as cepas das bactérias: *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

4.3.2 Preparo do inóculo

Inicialmente foi necessário verificar a turbidez do inóculo, que deve ser de 1 a 5×10^6 unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/ml) no caso de fungos e 1 a 2×10^8 UFC/mL no caso de bactéria que equivale a escala de Mc Farland 0,5. Para verificar a absorvância, visando a padronização nos testes foi utilizado o colorímetro de bancada e foi realizada a contagem de colônias para conferir a concentração do inóculo.

Para preparo do inóculo de levedura utilizou-se colônias de leveduras de 24 h de crescimento a 35° C em meio de cultura ágar batata dextrose e com uma alça bacteriológica, pegou-se algumas colônias colocando em solução salina (NaCl 0,85%), em seguida foi feita agitação no vórtex e ajustou-se a turbidez óptica para a absorvância de 0,2 no comprimento de onda de 530 nm.

Para preparo do inóculo de fungo filamentoso utilizou-se colônias com sete dias de crescimento a 35° C em meio de cultura Ágar batata dextrose. Foi adicionado 1 mL de solução salina (NaCl 0,85%) ao tubo de ensaio contendo o fungo, em seguida com auxílio de uma pipeta moveu-se delicadamente a colônia para que os conídios se desprendessem. A suspensão de conídios resultantes foi transferida para um tubo de ensaio estéril e após 3 e 5 minutos de descanso foi transferida para outro tubo de ensaio estéril. A suspensão foi homogeneizada em um vórtex durante 15 segundos e ajustou-se a turbidez óptica para a absorbância de 0,15 no comprimento de onda de 530 nm.

Para o preparo do inóculo das bactérias foram utilizadas colônias de 24 h de crescimento em ágar nutriente. Foi utilizada uma alça bacteriológica, sendo feita a retirada de uma pequena quantidade da cultura e transferida para um tubo de ensaio contendo uma solução salina a 0,85%, obtendo-se uma solução com densidade óptica de 0,5 a 530 nm.

A partir destes inóculos preparados foi feita a contagem de colônias para verificar se os inóculos tinham 1 a 5 x 10⁶ unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL) no caso de fungos e 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL no caso de bactéria, o que é equivalente a 0,5 na escala de Mc Farland (Conforme figura 11).

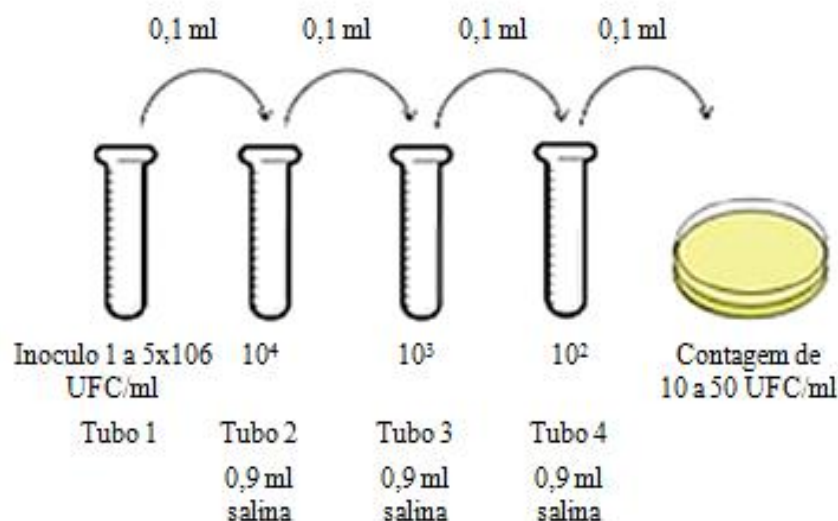


Figura 11 – Esquema das sucessivas diluições realizadas para avaliar se o inóculo obedecia a escala de Mc Farland através da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

4.3.3 Teste da atividade antimicrobiana do polímero

Os testes das atividades antifúngica e antibacteriana foram realizados utilizando o filme do polímero com 1,5 cm de diâmetro e suas diluições a 5% e 10% em água.

Em discos estéreis adicionou-se 5 µL da solução a 0,05 mg/mL do polímero e 5 µL da solução a 0,10 mg/mL e deixou-os secar dentro de uma placa de Petri estéril. Já o filme foi colocado por 20 minutos sobre a ação de raios UV em cabine de fluxo laminar.

A partir dos inóculos preparados, mergulhou-se um swab de algodão estéril na suspensão ajustada. Girou-se o swab várias vezes e apertou-o firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido para retirar qualquer excesso de inóculo no swab. Inoculou-se esfregando o swab em toda superfície seca da placa de ágar Mueller-Hinton e repetiu-se o procedimento esfregando outras duas vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Foram colocados os discos estéreis impregnados com as diluições e o filme do polímero nas placas contendo meio de cultura Agar Muller Hinton. As placas foram colocadas invertidas em estufa, no caso dos fungos a 35°C e das bactérias a 37°C.

Foi realizado também o teste de disco-difusão em ágar usando a concentração de 5 mg/mL de três antifúngicos já comercializados, o clotrimazol, cetoconazol e fluconazol, que foram solubilizados em Dimetilsulfóxido (DMSO). As cepas testadas foram *Candida albicans* ATCC 14053, *C. tropicalis* ATCC 28707, *C. krusei* ATCC 34135, *C. glabrata* ATCC 9030, *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 64684, *Aspergillus flavus* ATCC 16883 e *A. terreus* ATCC 08113 e após a aplicação do inóculo do micro-organismo nas placas contendo Ágar Müller Hinton foram inseridos os discos com 2 microlitros do antifúngico solubilizado e incubados a 35°C por 24 e 48 h. A leitura foi realizada pela medida do diâmetro do halo de inibição quando presente, seus resultados foram avaliados e comparados aos resultados obtidos com o polímero (Figura 12).

Foi observado o crescimento das cepas e a formação de halo de inibição após 48 horas. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

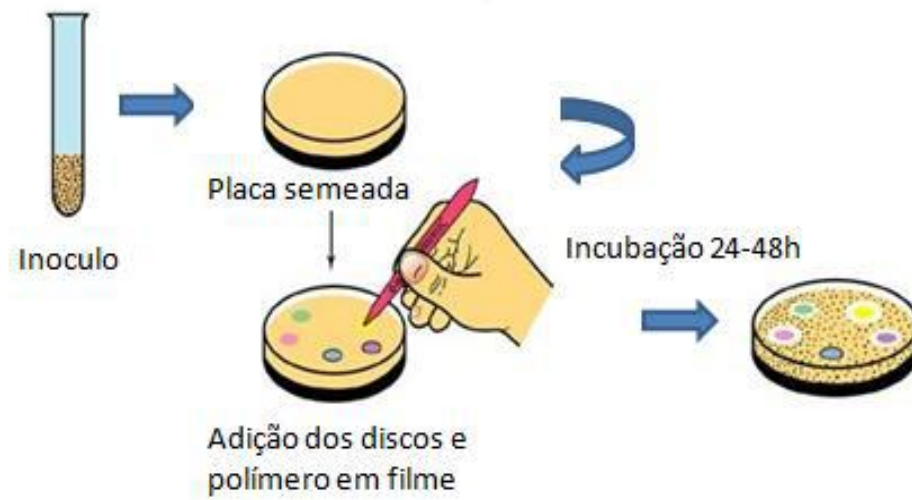


Figura 12 - Esquema do teste de sensibilidade a micro-organismos usando o método de Disco-difusão em ágar.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Testes de caracterização do polímero

5.1.1 Determinação da espessura do polímero

Foram realizadas as medições de espessura do filme do polímero sendo obtida uma espessura média de $306 \pm 13 \mu\text{m}$.

Tabela 1 – Resultado das medições de espessura do polímero.

Medida	Espessura (μm)
1	290
2	320
3	310
4	315
5	295
Média	306

5.1.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR-ATR)

A partir da espectroscopia vibracional na região do infravermelho, como mostra figura 13, foi possível identificar os principais modos vibracionais do polímero PAADDA. As bandas em: 3355cm^{-1} e 3187cm^{-1} são atribuídas aos modos vibracionais antissimétricos e simétricos do grupo N-H, 2938cm^{-1} ao grupo C-H e as bandas em 1653cm^{-1} e 1452cm^{-1} correspondem aos grupos C=O e C-N, respectivamente.

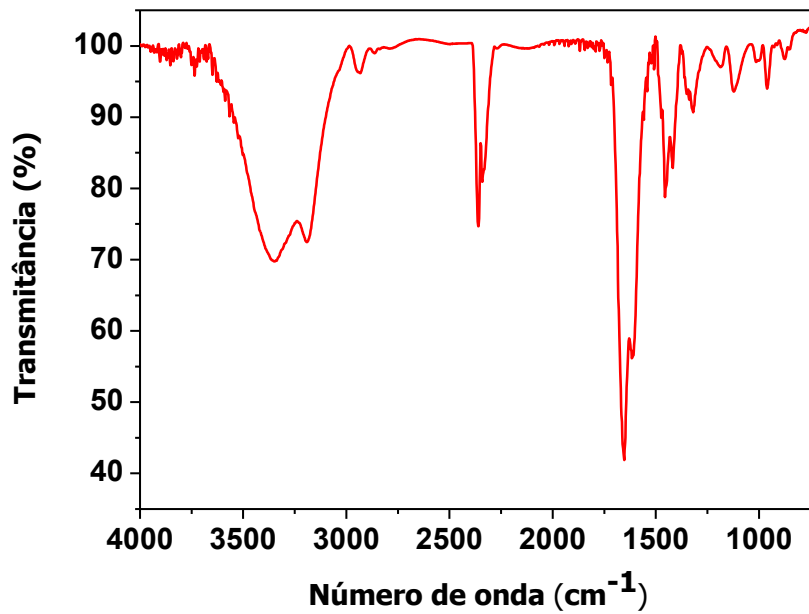


Figura 13 - Espectro de infravermelho do PAADDA.

5.1.3 Propriedade óptica do filme

A Figura 14 mostra o espectro de transmitância do filme de PAADDA sobre quartzo entre 200 e 800nm. Foi possível observar que o filme de PAADDA é um material transparente na região do visível (400 a 800nm), pois permitiu a passagem de 90% da radiação incidente. Este resultado mostrou que o PAADDA é um polímero amorfo, ou seja, não apresenta significativa cristalização das cadeias poliméricas no estado sólido (filme).

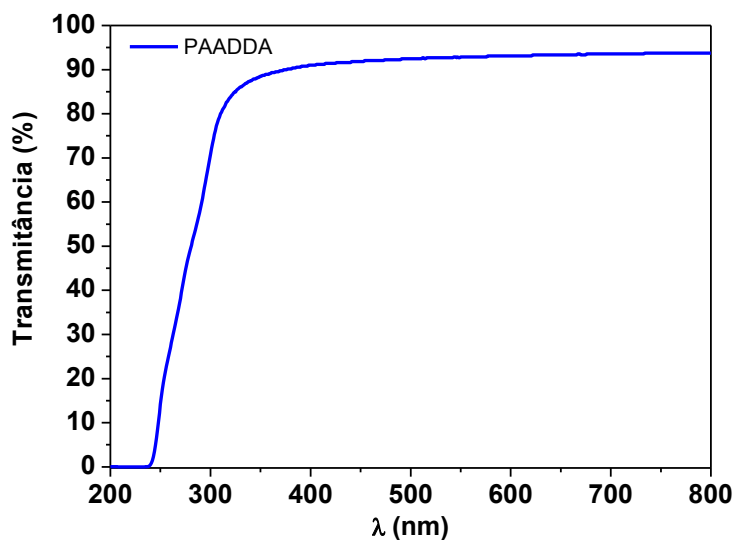


Figura 14 - Espectro de transmitância do filme de PAADDA.

5.1.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura 15 mostra as imagens de microscopia do filme de PAADDA. Como pode ser observado na fratura do filme de PAADDA, Figura (A) e (B), o filme é bem homogêneo. A figura (C), mostra que a superfície do filme do polímero contém pequenas partículas que provavelmente são de sais inorgânicos oriundos da água destilada utilizada no preparo do filme. Além disso, a superfície do filme não possui poros ou agregados, indicando que a superfície não é rugosa.

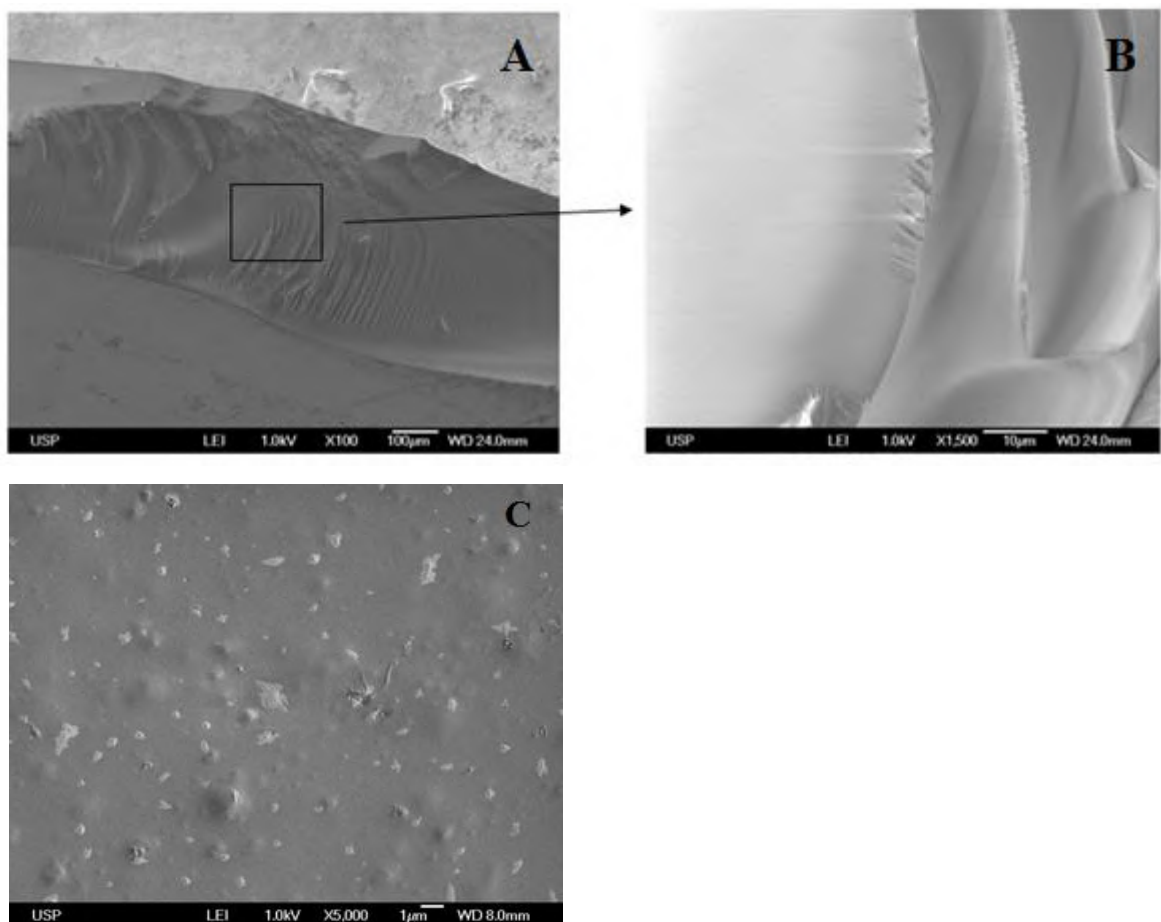


Figura 15 – Imagens de MEV da (A) fratura do filme de PAADDA; (B), ampliação e da (C) superfície do PAADDA.

5.2 Testes antimicrobianos

Com as diluições de 5%, 10% e o filme do polímero foram realizados os testes da atividade antifúngica nas cepas *Aspergillus terreus* (ATCC 08113), *Aspergillus flavus* (ATCC 16883), *Candida albicans* (ATCC 14053), *Candida tropicalis* (ATCC 28707), *Candida krusei* (ATCC 34135), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida parapsilosis* (ATCC 90018) e *Rhodotorula mucilaginosa* (ATCC 64684) e da atividade antibacteriana nas cepas *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) com o polímero nas diluições de 5% e 10%. O polímero na forma de filme só foi testada a atividade antibacteriana nas cepas de *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P).

Os inóculos foram semeados no meio de cultura Agar Mueller Hinton e foram inseridos os discos estéreis contendo o polímero diluído ou o filme do polímero diretamente em contato com o meio. Após ficarem em estufa, em temperatura adequada para crescimento no caso dos fungos a 35°C e das bactérias 37°C foi observado se havia halo ao redor dos discos estéreis ou ao redor do filme do polímero em 24 e 48 horas e medido o diâmetro do halo quando existente.

Os resultados dos testes antifúngicos realizados mostraram que o polímero PAADDA na sua forma de filme apresentou inibição do crescimento da cepa *Candida tropicalis*, com um halo de inibição de 39 mm. Não foi observada inibição do crescimento de outros fungos leveduriformes ou filamentosos pelo filme e nem pelo polímero em suas diluições de 5 ou 10% em água. Inclusive foi possível observar uma diferença entre os resultados do teste com o polímero na forma de filme e diluído, já que na diluição de 5 e de 10% não foi capaz de inibir o crescimento de *C. tropicalis*.

Tabela 2 – Diâmetro do halo nos testes antifúngicos e antibacterianos do polímero nas cepas avaliadas.

Cepas testadas	PAADDA 5% (mm)	PAADDA 10% (mm)	PAADDA filme (mm)
<i>Candidada tropicalis</i>	0	0	39
<i>Candida glabrata</i>	0	0	0
<i>Candida krusei</i>	0	0	0
<i>Candida parapsilosis</i>	0	0	0
<i>Candida albicans</i>	0	0	0
<i>Rodothorula mucilaginosa</i>	0	0	0
<i>Aspergillus terreus</i>	0	0	0
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	NT
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	NT

NT – Não testado.

Com relação aos testes antibacterianos não houve atividade antibacteriana do filme do polímero e nem de suas diluições a 5% e 10% contra as cepas de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P. Essas diluições também não inibiram o crescimento das outras cepas de bactérias: *Streptococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, nesses últimos a atividade do polímero na forma de filme não foi testada.

Além disso, foi realizado o teste de disco-difusão em ágar de três antifúngicos comerciais para avaliar o perfil de sensibilidade e resistência desta cepa de *C. tropicalis*, sendo observado que clotrimazol e cetoconazol inibiram o crescimento com um halo de diâmetro 16 e 14 respectivamente e fluconazol não inibiu o crescimento.

Tabela 3 – Teste de disco-difusão em ágar de antifúngicos comerciais na cepa de *Candida tropicalis* ATCC 28707.

Antifúngico	Diâmetro do halo de inibição (mm)
Clotrimazol	16
Cetoconazol	14
Fluconazol	0



Figura 16 - Foto do teste de disco-difusão em ágar do PAADDA na cepa de *Candida tropicalis*.



Figura 17 – Testes em que os micro-organismos não foram sensíveis ao polímero – (A) *Candida albicans*, (B) *Rodothorula mucilaginosa* (C) *Candida Krusei*.

Não se pode afirmar precisamente porque a *Candida tropicalis* foi o único fungo a ser sensível ao polímero PAADDA na forma de filme, e nem o modo de atuação deste polímero e de outros com atividade antimicrobiana está totalmente esclarecido.

O PAADDA é sintetizado a partir da acrilamida e do cloreto de dimetildialilamônio e possui, portanto, um grupo catiônico que pode estar relacionado à sua atividade. Como relatado por Timofeeva (2011) em seus estudos, as membranas bacterianas possuem em geral cargas negativas devido a ácidos e

outros componentes desse seu revestimento, sendo que essas cargas negativas atraem cátions, e se o caráter anfifílico for proporcional, a membrana bacteriana sofre uma perturbação externa, levando-a a lise e podendo causar a morte da bactéria. Sabe-se que como as bactérias gram-negativas possuem uma membrana externa extra a ação nesses organismos fica mais comprometida, sendo para esses organismos necessário uma capacidade maior de penetração.

Em nosso estudo, a baixa atividade do PAADDA apenas contra uma cepa de fungo pode estar relacionada à sua baixa densidade de cargas positivas, já que o PAADDA possui apenas 45% da sua composição na proporção catiônica.

A maioria dos polímeros estudados apresentam cargas positivas em sua estrutura, os grupos contendo amônia quaternária, como o PAADDA, são os mais estudados. Li e Shen (2000) sintetizaram um copolímero de 4-vinilpiridina, estireno e divinilbenzeno (DVB) por polimerização em suspensão, que foi quaternizado com hidrocarbonetos halogenados, obtendo-se uma série de polímeros do tipo de piridínio insolúveis. O quaternizado Poli (4-vinilpiridina) (P4VP) foi testado contra *E. coli* e os resultados foram analisados através das unidades formadoras de colônias (UFC). Os resultados mostraram que a atividade antimicrobiana desses polímeros está relacionada a capacidade de captura de células bacterianas num estado vivo por adsorção ou adesão, sendo um processo parcialmente irreversível, o que é diferente nos polímeros solúveis, capazes de matar bactérias em água. Porém esses polímeros antimicrobianos apresentam baixa biocompatibilidade, limitando a sua aplicação a biomateriais.

Para melhorar a biocompatibilidade e também a eficácia na atividade antibacteriana foi proposta a incorporação de polímeros hidrófilos biocompatíveis através de copolimerização. O N-hexil P4VP sofreu copolimerização com metacrilato hidrófilo biocompatível e 2-hidroxietilo (HEMA) e poli (etileno glicol), éter metil metacrilato (PEGMA monômeros), o que melhorou sua atividade contra uma cepa de *E. coli*.

A hemocompatibilidade dos copolímeros solúveis resultantes foi analisada através da medição da interação com as células vermelhas do sangue em solução, enquanto que os copolímeros insolúveis foram testados quanto a hemólise como filmes. Os resultados mostraram que a adição de PEGMA impede a hemólise. Além disso, os filmes baseados insolúveis, que são aqueles copolimerizados com HEMA,

apresentaram um limite de hemólise em 8-10 mol% de conteúdo 4VP. Esses estudos são importantes para analisar a toxicidade em células humanas, sendo importante que tenha uma baixa toxicidade e boa atividade antimicrobiana.

Sambhy (2008) e colaboradores realizaram estudos sistemáticos sintetizando série de copolímeros anfifílicos de piridínio-metacrilato variando a posição espacial de sua carga positiva e no comprimento da cauda alquila, e avaliaram assim a relação entre a carga positiva e a cauda alquila no polímero (ou seja, a anfifilicidade). Eles descobriram que em polímeros tendo razões de carga/cauda semelhantes aumenta-se a capacidade de ruptura da membrana.

A natureza dos contra-íons também afeta a atividade antimicrobiana e para que isso fosse comprovado foram preparados polímeros bioativos contendo grupos colina e análogos em sua estrutura. A atividade antimicrobiana desses polímeros foi analisada contra *Aspergillus niger*, *Circenelliods mucor* e *Bacillus coagulans*, os polímeros que possuíam o contra-íon OH⁻ foram os que obtiveram melhores valores de MIC, tendo ação contra todos os organismos testados.

DeGrado (2004) e particularmente Tew (2002) forneceram estudos em que relatam que não são necessárias várias unidades de repetição do componente catiônico se a espinha dorsal do polímero tiver um caráter hidrofóbico, já polímeros que possuem um esqueleto hidrofílico necessitam de grupos laterais hidrófobos.

A maioria dos estudos relacionadas à atividade antimicrobiana de polímeros utilizaram em sua metodologia estudos de concentração inibitória mínima (MIC), que é a menor concentração do composto que inibe o crescimento visível de micro-organismos; a concentração bactericida mínima (MBC), a atividade hemolítica (HC) e a concentração inibitória de metade do máximo de micro-organismos (IC50).

Para avaliar se a espessura do polímero influenciava em sua atividade foi testado em nosso trabalho um filme do PAADDA com espessura de 100 micrometros na cepa de *C. tropicalis* ATCC28707 e foi observado que este não foi capaz de inibir o crescimento do fungo. Timofeeva (2009) avaliou se o peso molecular influenciava na atividade biocida contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus* e o fungo *Candida albicans* em testes com poli(dialilmetilamonio trifluoroacetato) (PDAMATFA), com uma diminuição do peso molecular por um fator de -2,5, obteve-se como resultado um aumento da concentração mínima inibitória para as cepas de bactérias, enquanto para a atividade fungicida não houve variação.

Polímeros podem exercer diversas funções, como serem matriz para materiais que aprisionam agentes antimicrobianos, sendo assim, capazes de liberar biocidas, para isso, é necessário avaliar características como hidrofiliabilidade e peso molecular, já que podem influenciar na sua ação. Porém, a difusão de biocidas de baixo peso molecular através de matrizes poliméricas pode causar toxicidade ao ser humano, dessa forma, os polímeros com ação antimicrobiana podem ser uma alternativa, além de apresentarem atividade por um longo prazo (SIEDENBIEDEL, 2012).

Os estudos relacionados à atividade antimicrobiana de polímeros têm crescido em todo o mundo e muito já mostraram polímeros que possuem atividade antimicrobiana podendo ser utilizados de diferentes formas (MUÑOZ-BONILLA, 2012).

6 CONCLUSÃO

Através dos testes de caracterização do polímero foi possível concluir que o polímero recebido da Sigma-Aldrich realmente se tratava do polímero PAADDA e que ele apresentou-se como um polímero transparente e homogêneo.

Neste trabalho foi testado o polímero PAADDA na forma de filme e diluído a 5 e 10% e foi observada atividade contra a *Candida tropicalis* na forma de filme. Essa descoberta pode trazer novas utilizações para ele, como sua incorporação a materiais nos quais seja importante a inibição do crescimento desses micro-organismos. Outros testes podem ser feitos na busca por polímeros com um melhor perfil de atividade e com mais amplo espectro de ação, variando a espessura do polímero para avaliar o efeito dessa alteração em sua atividade, já que foi observado que este é um parâmetro que pode influenciar e a síntese do PAADDA com a uma maior porcentagem de componentes com catiônicos. Além disso, estudos sobre o mecanismo de atuação deste e de outros polímeros com ação antimicrobiana podem ser úteis para auxiliar na busca e desenvolvimento de novos polímeros.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, Pollianna Muniz et al. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica in vitro de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 222-224, 2009.
- ANDRADE, Flávia RO. Análise microbiológica de matérias primas e formulações farmacêuticas magistrais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, 2007.
- BALBANI, Aracy Pereira Silveira; BUTUGAN, Ossamu. Contaminação biológica de alimentos. **Pediatria**, v. 23, n. 4, p. 320-328, 2001.
- BAUL, Upayan; KURODA, Kenichi; VEMPARALA, Satyavani. Interaction of multiple biomimetic antimicrobial polymers with model bacterial membranes. **The Journal of chemical physics**, v. 141, n. 8, p. 084902, 2014.
- BASTOS, Victor Maurílio Pinto et al. Comparação da incidência, da prevalência da colonização, e da resistência de *Staphylococcus aureus* em diferentes populações humanas. **Revista Uniabeu**, v. 6, n. 13, p. 28-40, 2013.
- BRAUMAN, John I.. Polymers. **American Association for the Advancement of Science**, v.251, n. 4996, p. 35-37, 1991.
- BUB, Guilherme Linhares et al. Sepses secundária a endocardite bacteriana em pacientes com cateter venoso central: relato de caso com necropsia. **Revista de Ciências Médicas**, v. 11, n. 3, 2012.
- CARMONA-RIBEIRO, Ana Maria; DE MELO CARRASCO, Letícia Dias. Cationic antimicrobial polymers and their assemblies. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 5, p. 9906-9946, 2013.
- CATARINO, Camilla Ferreira et al. Perfil epidemiológico das infecções primárias de corrente sanguínea em uma unidade de terapia intensiva neonatal. **Rev. pesqui. cuid. fundam.(Online)**, v. 5, n. 1, p. 3229-3237, 2013.
- CHO, Kyung-Hwan et al. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 5, p. 956-960, 2005.
- COLOMBO, Arnaldo Lopes; GUIMARÃES, Thais. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.
- COUTINHO, Fernanda MB; MELLO, Ivana L.; DE SANTA MARIA, L. C. Polietileno: principais tipos, propriedades e aplicações. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2003.
- CUNHA, Michele Almeida da. Métodos de Detecção de Microrganismos Indicadores. **Saúde & Ambiente em Revista**, v. 1, n. 1, 2009.

CUENCA-ESTRELLA M, Rodríguez-Tudela JL, Córdoba, S, Melhem MC, Szeszs MW, Castañeda E, et al. Red Regional de Laboratorios para la Vigilancia de las Infecciones Fúngicas Invasoras y Susceptibilidad a los Antifúngicos. **Rev Panam Salud Publica**. 2008;23(2):129-34.

DA SILVEIRA, Norma Suely Sobral; MICHEREFF, Sami Jorge; DE OLIVEIRA, Sônia Maria Alves. Doenças fúngicas pós-colheita em frutas tropicais: patogênese e controle. 2005.

DA SILVA SPINACÉ, Márcia Aparecida; DE PAOLI, Marco Aurelio. A tecnologia da reciclagem de polímeros. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 65-72, 2005.

DE ANDRADE, Nélio José; DA SILVA, Rosália Maria Moreira; BRABES, Kelly Cristina Silva. Avaliação das condições microbiológicas em unidades de alimentação e nutrição. *Ciênc. agrotec.*, Lavras. V.27, n.3, p.590-596, 2003.

DE AMORIM, Daniela Silva et al. Infecções por *Aspergillus* spp: aspectos gerais. **PULMÃO RJ**, v. 13, n. 2, p. 2, 2004.

DE CASTRO ALMEIDA, Rogeria Comastri et al. Avaliação e controle da qualidade microbiológica de mãos de manipuladores de alimentos. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, n. 4, p. 290-294, 1995.

DE QUEIRÓS SANTOS, Neuza. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto e Contexto Enfermagem**, v. 13, 2004.

DE OLIVEIRA, Karla Renata; MUNARETTO, Paula. Uso racional de antibióticos: responsabilidade de prescritores, usuários e dispensadores. **Revista Contexto & Saúde**, v. 10, n. 18, p. 43-51, 2013.

DE OLIVEIRA NOBRE, Márcia et al. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, 2002.

FERREIRA, Marina Vilela Chagas; PAES, Vítor Ribeiro; LICHTENSTEIN, Arnaldo. Penicilina: oitenta anos. **Revista de Medicina**, v. 87, n. 4, p. 272-276, 2008.

GASTALHO, S.; SILVA, G.; RAMOS, Fernando. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, n. 1, p. 29-45, 2014.

GURGUÍ, Mercedes, CUENCA-ESTRELLA, Manuel. Situación actual de las infecciones fúngicas invasivas. Las nuevas técnicas diagnósticas y los nuevos antifúngicos. **Enferm Infec Microbiol Clin**. 2008;26 Supl 14:1-6.

GURGEL, Thaís C.; CARVALHO, Wânia S. A assistência farmacêutica e o aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 1, p. 118-23, 2008.

HARAGUCHI, Toshio. Antibióticos: classificação geral. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 57, n. 10, 2000.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. Goodman & Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. McGraw Hill, 11^a ed. 2006.

JOHN WILEY & SONS, INC. PHYSICAL CHEMISTRY OF MACROMOLECULES. Basic Principles and Issues. Second Edition. S. F. SUN, St. John's University, Jamaica, New York. A Wiley-Interscience Publication, 2004.

Li G, Shen J. A study of pyridinium-type functional polymers. IV. Behavioral features of the antibacterial activity of insoluble pyridinium-type polymers. *J Appl Polym Sci* 2000;78:676–84.

Liu D, Choi S, Chen B, Doerksen RJ, Clements DJ, Winkler JD, Klein ML, DeGrado WF. Nontoxic membraneactive antimicrobial arylamide oligomers. *Angew Chem Int Ed* 2004;43:1158–62.

MACHADO, F. et al. Programa de engenharia química. Uma revisão sobre os processos de polimerização em suspensão. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, n. 2, p. 166-179, 2007.

MARIANO, Rosa de Lima Ramos et al. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 1, p. 89-111, 2013.

MARTINEZ, Roberto. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 449-460, 2006.

MELLA, SERGIO et al. Propiedades microbiológicas, clasificación y relación estructura-actividad de cefalosporinas e importancia de las cefalosporinas de cuarta generación. **Revista chilena de infectología**, v. 18, n. 1, p. 7-19, 2001.

MELO, Júlio OF et al. 1, 2, 3-triazolic heterocycles: history, preparations, applications and pharmacological activities. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 569-579, 2006.

MENEZES, Everardo Albuquerque; MENDES, Luana Guabiraba; CUNHA, Francisco Afrânio. Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no Estado do Ceará. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 2, p. 354-355, 2009.

MILLAN, Lincoln Saito et al. Infecções de corrente sanguínea por bactérias multirresistentes em UTI de tratamento de queimados: experiência de 4 anos. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 27, n. 3, p. 374-378, 2012.

MUÑOZ-BONILLA, Alexandra; FERNÁNDEZ-GARCÍA, Marta. Polymeric materials with antimicrobial activity. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 2, p. 281-339, 2012.

OLIVEIRA, Daniele Vargas et al. Qualidade da água e identificação de bactérias Gram-negativas isoladas do Arroio Dilúvio, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Evidência-Ciência e Biotecnologia**, v. 12, n. 1, p. 51-62, 2012.

PERUZZO, Angela Maria; COSTA, Francisco Diniz Affonso da; ABRAHÃO, Wanda Moscalewski. Controle microbiológico em valvas cardíacas humanas. **Arq Bras Cardiol**, v. 87, n. 6, p. 778-82, 2006.

RIFKIN, Jeremy. O século da biotecnologia. **Revista CEJ**, v. 6, n. 16, p. 117, 2008.
SANTOS, Alice Veras et al. Perfil epidemiológico da sepse em um hospital de urgência. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, v. 1, n. 1, p. 19-30, 2015.

SERRA, Henrique A. A história dos antibióticos. **Acesso em**, v. 12, 2006.

SIEDENBIEDEL, Felix; TILLER, Joerg C. Antimicrobial polymers in solution and on surfaces: overview and functional principles. **Polymers**, v. 4, n. 1, p. 46-71, 2012.

SOUZA-MOREIRA, Tatiana M.; SALGADO, Hérida RN; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

SONDI, Ivan; SALOPEK-SONDI, Branka. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of colloid and interface science**, v. 275, n. 1, p. 177-182, 2004.

SAMBHY V, Peterson BR, Sen A. Antibacterial and hemolytic activities of pyridinium polymers as a function of the spatial relationship between the positive charge and the pendant alkyl tail. *Angew Chem Int Ed* 2008;47:1250–4.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flavio. Livro Microbiologia, 5^o edição, editora Atheneu Rio, 2008.

TEW, Gregory N. et al. De novo design of biomimetic antimicrobial polymers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 8, p. 5110-5114, 2002.

TIMOFEEVA L, Kleshcheva N. Antimicrobial polymers: mechanism of action, factors of activity, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;89:475–92.

TIMOFEEVA LM, Kleshcheva NA, Moroz AF, Didenko LV. Secondary and tertiary polydiallylammonium salts: novel polymers with high antimicrobial activity. *Biomacromolecules* 2009;10:2976–86.

TJONG, S. C. Structural and mechanical properties of polymer nanocomposites. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 53, n. 3, p. 73-197, 2006.

TEW GN, Liu D, Chen B, Doerksen RJ, Kaplan J, Carroll PJ, Klein ML, Degrado WF. De novo design of biomimetic antimicrobial polymers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:5110–4.

TORTORA , Gerard J. B; FUNKE, Erdell R.; CASE, Christine L.. Microbiologia. Artmed, 10^a Ed., 2012.

VILLANOVA, Janaina CO; ORÉFICE, Rodrigo L.; CUNHA, Armando S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

WALDMAN, Eliseu Alves; SILVA, Luiz Jacinto da; MONTEIRO, Carlos Augusto. Trajetória das doenças infecciosas: da eliminação da poliomielite à reintrodução da cólera. **Informe Epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 3, p. 05-47, 1999.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Ther Clin Risk Manag**, v. 10, p. 95-105, 2014.

ZHOU, Tianchi et al. Poly (ethylene glycol) plasticized poly (vinyl alcohol)/poly (acrylamide-co-diallyldimethylammonium chloride) as alkaline anion-exchange membrane for potential fuel cell applications. **Synthetic Metals**, v. 167, p. 43-50, 2013.

ZHU, J.; LU, J.; ZHOU, Y.; LI, Y.; CHENG, J.; ZHENG, C. Design, synthesis, and antifungal activities in vitro of novel tetrahydroisoquinoline compounds based on the structure of lanosterol 14a-demethylase (CYP51) of fungi. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 5285-5289, 2006.

ZUCCHI, Paola; DEL NERO, Carlos; MALIK, Ana Maria. Gastos em saúde: os fatores que agem na demanda e na oferta dos serviços de saúde. **Saúde e Sociedade**, v. 9, n. 1/2, p. 127-50, 2000.