

**LUANA CAROLINE DE ALMEIDA BREGALANTE**

Análise da hidrólise e atividade antimicrobiana do Poli Metil Vinil Éter/Ácido Maleico (PVM/MA) em diferentes temperaturas

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Soares Santiago  
Coorientador: Prof. Dr. Mauricio Ventura Mazzi

Araraquara-SP  
2024

B833a Bregalante, Luana Caroline de Almeida  
Análise da hidrólise e atividade antimicrobiana do Poli Metil  
Vinil Éter/Ácido Maleico (PVM/MA) em diferentes temperaturas  
/ Luana Caroline de Almeida Bregalante. -- Araraquara, 2024  
68 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista  
(UNESP), Instituto de Química, Araraquara  
Orientadora: Patricia Soares Santiago  
Coorientador: Mauricio Ventura Mazzi

1. Copolímeros. 2. Anti-infecciosos. 3. Candida albicans. 4.  
Staphylococcus aureus. 5. Streptococcus mutans. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da  
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara. Dados  
fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

### **IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA**

Esta pesquisa sobre a hidrólise do copolímero PVM/MA em diferentes temperaturas revela avanços significativos na biotecnologia, especialmente no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Os resultados indicam que o PVM/MA hidrolisado pode ser otimizado para maximizar sua eficácia contra patógenos como *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, promovendo inovação em tratamentos médicos e aplicações industriais sustentáveis.

### **POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH**

This research on the hydrolysis of the PVM/MA copolymer at different temperatures reveals significant advances in biotechnology, especially in the development of new antimicrobial agents. The results indicate that hydrolyzed PVM/MA can be optimized to maximize its effectiveness against pathogens such as *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*, promoting innovation in medical treatments and sustainable industrial applications.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Análise da hidrólise e atividade antimicrobiana do Poli Metil Vinil Éter/Ácido Maleico (PVM/MA) em diferentes temperaturas"

**AUTORA: LUANA CAROLINE DE ALMEIDA BREGALANTE**

**ORIENTADORA: PATRICIA SOARES SANTIAGO**


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. PATRICIA SOARES SANTIAGO (Participação Virtual)  
Departamento de Agronomia e Recursos Naturais / Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira - UNESP - Registro

Profa. Dra. LUCIANA PEREIRA SILVA (Participação Virtual)  
Departamento de Enfermagem / Fundação Educacional do Município de Assis (FEMA)

Prof. Dr. FRANCISCO ADRIANO DE OLIVEIRA CARVALHO (Participação Virtual)  
Instituto de Ciências Exatas - UNIFESSPA - Marabá

Araraquara, 31 de julho de 2024

Documento assinado digitalmente  
 PATRICIA SOARES SANTIAGO  
Data: 15/08/2024 10:21:46-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

## DADOS CURRICULARES

### IDENTIFICAÇÃO

**Nome:** Luana Caroline de Almeida Bregalante

**Nome em citações bibliográficas:** BREGALANTE, L. C. A.

### FORMAÇÃO ACADÊMICA:

Graduação em Biomedicina. Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, UNIARARAS, Brasil.

### FORMAÇÃO COMPLEMENTAR:

#### 2022 - 2022

Curso de comunicação e escrita científica ACS PUBLICATIONS. (Carga horária: 4h). American Chemical Society, Estados Unidos.

#### 2022 - 2022

Vivência em anatomia patológica e citologia oncológica. (Carga horária: 300h). Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, UNIARARAS, Brasil.

#### 2021 - 2021

Extensão universitária em Grupo de estudos em Hematologia clínica. (Carga horária: 10h). Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, UNIARARAS, Brasil.

#### 2019 - 2019

Extensão universitária em UTILIZAÇÃO DE ALLIUM CEPA COMO BIOINDICADOR DE TOXICIDADE GENÉTICA. (Carga horária: 12h). Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, UNIARARAS, Brasil.

#### 2019 - 2019

Extensão universitária em V CURSO DE TREINAMENTO EM MASSA DE RESSUCITACAO CARDIOPULMONAR. (Carga horária: 1h). Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, UNIARARAS, Brasil.

#### 2019 - 2019

Curso de Verão em Fisiologia. (Carga horária: 30h). Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, UNIARARAS, Brasil.

**2019 - 2019**

Curso de Manejo de Animais de Laboratório. (Carga horária: 30h). Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, UNIARARAS, Brasil.

**APRESENTAÇÕES DE TRABALHO**

**BREGALANTE, L. C. A.**; SANTIAGO, P. S. Accelerated Stability Study of Vinyl Methyl Ether and Maleic Anhydride and Characterization Antimicrobial. 2023. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

**Eventos**

1. 52a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Molecular Biologia (SBBq). Accelerated Stability Study of Vinyl Methyl Ether and Maleic Anhydride and Characterization Antimicrobial. 2023. (Congresso).
2. III SIMPÓSIO/CURSO DE TOXINOLOGIA BÁSICA & APLICADA (SIM- TOX): Do Envenenamento à Aplicação Biotecnológica e Medicina. 2023. (Simpósio).
3. XII Semana Acadêmica de Biomedicina e Biotecnologia UNIARARAS. 2020. (Congresso).
4. curso de verão em fisiologia (minicurso de quantificação de RNA por técnicas de PCR). Curso de verão em Fisiologia. 2019. (Oficina).
5. XII Congresso científico UNIARARAS. 2019. (Congresso).
6. XIII Feira das Profissões - FHO UNIARARAS. Monitoria. 2019. (Feira).
7. XII Workshop em Biotecnologia UNIARARAS. 2019. (Congresso).
8. Minicurso de Allium cepa como bioindicador de toxicidade. Congresso científico Uniararas. 2017. (Congresso).

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Soares Santiago, por não apenas me receber como aluna de mestrado, mas também por me acolher na troca de orientação e me proporcionar a oportunidade de um recomeço. Agradeço pelos ensinamentos, pelas experiências profissionais adquiridas na área química, pelo respeito e compreensão, e por confiar em meu trabalho e dedicação.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Mauricio Ventura Mazzi, por compartilhar comigo seu conhecimento e experiência na área de microbiologia, por toda a compreensão e dedicação ao meu projeto, e por estar sempre disposto a me ajudar.

Agradeço aos membros do programa de pós-graduação em biotecnologia da UNESP de Araraquara por todo o suporte e por prontamente me auxiliarem durante este curso.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Muito obrigada aos professores, alunos de pós-graduação e técnicos do Instituto de Estudos Avançados do Mar (IEAMAR) da UNESP de Registro, por todo o conhecimento e auxílio proporcionado durante minha estadia no laboratório. O amparo de vocês foi fundamental para o êxito dos testes realizados.

À querida aluna e bolsista de iniciação científica Ana Laura Fachini, que sempre se dedicou aos experimentos e me ajudou de forma excepcional em todas as etapas deste projeto. Agradeço também aos alunos de iniciação científica Ana Beatriz, Gabriela e Luiz, que passaram rapidamente pelo projeto e contribuíram para que ele atingisse seus objetivos de maneira eficiente.

Aos membros Amanda, Jane e Matheus do Laboratório de Formigas Cortadeiras (LAFC) da UNESP de Rio Claro, por me apoiarem nos momentos difíceis que enfrentei durante este mestrado após a fatalidade do incêndio que acometeu meu antigo laboratório de trabalho. Matheus, sempre lembrarei de seu amor, carinho e apoio, que foram fundamentais nessa etapa.

À minha melhor amiga de pós-graduação e bacharel Rafaela Canassa, por me oferecer companhia, acolhimento, empatia e apoio em todos os processos. Sua amizade e presença foram uma fortaleza em minha trajetória neste mestrado.

Em especial, à minha mãe Ilva, por ser minha maior inspiração e porto seguro nesta jornada. Obrigada por sempre segurar minha mão e nunca duvidar do meu potencial como profissional e ser humano. Ao meu pai Márcio, minha irmã Izabella e a Rute, por sempre me alimentarem com otimismo e fé, e por me encorajarem a seguir em frente. À minha querida Vó Rosa, que pôde presenciar minha aprovação no processo seletivo e que, infelizmente, não está entre nós para assistir ao desfecho desta conquista. Vó, obrigada por me incluir nas suas orações e sempre apoiar meus estudos com brilho nos olhos.

E a Deus, por ser a base e dono de todas as coisas, muito obrigada. A fé sempre será a maior motivação para que eu viva todos os dias.

## RESUMO

O copolímero poli (éter metil vinílico/ácido maleico) (PVM/MA) é utilizado comercialmente como ingrediente ativo em produtos de higiene oral, farmacêuticos e cosméticos, demonstrando propriedades promissoras antibacterianas, antifúngicas, além da facilidade de manipulação. Embora nossos corpos abriguem micro-organismos benéficos como *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, essenciais para a proteção e equilíbrio do organismo, a sua proliferação descontrolada representa riscos à saúde. Com avanços na biotecnologia, a pesquisa visa desenvolver novos compostos para combater infecções e expandir as opções farmacêuticas. Este estudo investigou possíveis alterações nas propriedades antimicrobianas do copolímero PVM/MA em diferentes temperaturas de hidrólise (25, 40, 50 e 60°C), avaliando seu impacto em culturas de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans*. Testes físico-químicos, como Espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês “Dynamic Light Scattering”), Potencial Zeta e espectrofotometria de absorção óptica foram conduzidos para avaliar a hidrólise do copolímero em relação à temperatura e pH, correlacionando os resultados com ensaios *in vitro*. A atividade antimicrobiana foi avaliada por plaqueamento em meio ágar, contagens de Unidades Formadoras de Colônia (UFC), ensaios com iodeto de propídio e microscopia de fluorescência para determinar a integridade de membrana dos micro-organismos. Os estudos físico-químicos revelaram que o PVM/MA é um sistema polidisperso como mostrado por dados de DLS, onde foram observados a presença de múltiplos picos na distribuição do tamanho das partículas, refletindo em partículas com diferentes tamanhos ou conformações dos copolímeros na solução. Através dos estudos *in vitro* foi observado que a concentração e temperatura de hidrólise mais eficaz foram 480µg/mL e 60°C, respectivamente, para os três micro-organismos testados. O ensaio de integridade de membrana sugeriu que o mecanismo de ação do copolímero pode envolver interações com a membrana do micro-organismo, semelhante à clorexidina, abrindo caminho para estudos promissores na área clínica para o desenvolvimento de novos tratamentos contra agentes patogênicos.

**Palavras-chave:** Copolímero; Atividade antimicrobiana; *Candida albicans*; *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*.

## ABSTRACT

Poly (methyl vinyl ether/maleic acid) copolymer (PVM/MA) is commercially used as an active ingredient in oral hygiene, pharmaceutical and cosmetic products, demonstrating promising antibacterial and antifungal properties, in addition to ease of handling. Although our bodies are home to beneficial microorganisms such as *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*, essential for the protection and balance of the organism, their uncontrolled proliferation poses health risks. With advances in biotechnology, research aims to develop new compounds to fight infections and expand pharmaceutical options. This study investigated possible changes in the antimicrobial properties of the PVM/MA copolymer at different hydrolysis temperatures (25, 40, 50 and 60°C), evaluating their impact on cultures of *C. albicans*, *S. aureus* and *S. mutans*. Physicochemical tests, such as Dynamic Light Scattering (DLS), Zeta Potential and optical absorption spectrophotometry were conducted to evaluate the hydrolysis of the copolymer in relation to temperature and pH, correlating the results with in-house tests. Antimicrobial activity was evaluated by plating on agar medium, Colony Forming Unit (CFU) counts, propidium iodide assays and fluorescence microscopy to determine the membrane integrity of the microorganisms. Physicochemical studies revealed that PVM/MA is a polydisperse system as shown by DLS data, where the presence of multiple peaks in the particle size distribution was observed, reflecting particles with different sizes or conformations of the copolymers in the solution. Through in vitro studies, it was observed that the most effective hydrolysis concentration and temperature were 480µg/mL and 60°C, respectively, for the three microorganisms tested. The membrane integrity assay suggested that the copolymer's mechanism of action may involve interactions with the microorganism's membrane, similar to chlorhexidine, paving the way for promising studies in the clinical area for the development of new treatments against pathogenic agents.

**Keywords:** Copolymer, Antimicrobial activity; *Candida albicans*; *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Coloração de gram. ....	19
<b>Figura 2</b> – Componentes estruturais da parede celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas. ....	20
<b>Figura 3</b> – Composição de membrana fúngica. ....	23
<b>Figura 4</b> – Hidrólise dos agrupamentos anidrido presente no copolímero PVM/MA. ....	28
<b>Figura 5</b> – Fluxograma da metodologia utilizada neste estudo. ....	30
<b>Figura 6</b> – Representação de parte do processo experimental: A) Incubação nos poços da suspensão microbiana juntamente com o tratamento em estudo. B) Resultado do plaqueamento do conteúdo ilustrado em A após 24 horas. ....	32
<b>Figura 7</b> - Análise da influência das diferentes temperaturas de hidrólise do PVM/MA na eficácia de inibição do crescimento do fungo <i>C.albicans</i> em diferentes concentrações e temperatura de hidrólise: (A) 25°C; (B) 40°C; (C) 50°C; (D) 60°C. ....	37
<b>Figura 8</b> – Análise da influência das diferentes temperaturas de hidrólise do PVM/MA na eficácia de inibição do crescimento da bactéria <i>S. aureus</i> em diferentes concentrações e temperatura de hidrólise: (A) 25°C; (B) 40°C; (C) 50°C; (D) 60°C. ....	38
<b>Figura 9</b> – Análise da influência das diferentes temperaturas de hidrólise do PVM/MA na eficácia de inibição do crescimento da bactéria <i>S. mutans</i> em diferentes concentrações e temperatura de hidrólise: (A) 25°C; (B) 40°C; (C) 50°C; (D) 60 °C. ....	39
<b>Figura 10</b> – Imagens de microscopia de fluorescência referente aos estudos de integridade da membrana plasmática de <i>C.albicans</i> , tratadas com PVM/MA em diferentes temperaturas de hidrólise (H), em PBS para controle negativo (CN), fluconazol 10% controle positivo (CP). Coloração com iodeto de propídio (PI,6 µM), aumento 400x. ....	47
<b>Figura 11</b> – Imagens de microscopia de fluorescência referente aos estudos de integridade da membrana plasmática de <i>S.aureus</i> , tratadas com PVM/MA em diferentes temperaturas de hidrólise (H), em PBS para controle negativo (CN), clorexidina 0,12% controle positivo (CP). Coloração com iodeto de propídio (PI,6 µM), aumento 400x. ....	49

**Figura 12** – Imagens de microscopia de fluorescência referente aos estudos de integridade da membrana plasmática de *S.mutans*, tratadas com PVM/MA em diferentes temperaturas de hidrólise (H), em PBS para controle negativo (CN), clorexidina 0,12% controle positivo (CP). Coloração com iodeto de propídio (PI,6  $\mu$ M), aumento 400x. ....51

**Figura 13** – Espectros de absorção ótica do copolímero PVM/MA em diferentes valores de temperatura durante o processo de hidrólise: (A) 25°; (B) 40°C; (C) 50°C; (D) 60°. As amostras foram analisadas a cada duas horas, mantendo as condições de temperatura constantes. ....53

**Figura 14** – Distribuição do tamanho de partículas por análise de número de partículas espalhadoras (A; C; E; G) e por intensidade de espalhamento de partículas espalhadoras (B; D; F; H) em solução tampão acetato-fosfato-borato 30mM nos valores de pH 3; 5; 7; 9 em concentrações de PVM/MA de 480 $\mu$ g/mL (A; B), 240 $\mu$ g (C; D), 120 $\mu$ g (E; F) e 60 $\mu$ g (G; H). ....56

**Figura 15** – Distribuição do tamanho de partículas por análise de intensidade de espalhamento de partículas espalhadoras (A) e por número de partículas espalhadoras (B) em concentração de PVM/MA 480 $\mu$ g/mL na presença de diferentes concentrações de NaCl a 5; 10; 30 e 50mM em tampão acetato fosfato-borato 30 mM pH 7. ....61

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Crescimento fúngico da espécie *C. albicans* representado em UFC em concentrações de 480; 240; 120 e 60µg/mL de PVM/MA hidrolisado em diferentes temperaturas. ....35

**Tabela 2** – Crescimento bacteriano da espécie *S. aureus* representado em UFC em concentrações de 480; 240; 120 e 60µg/mL de PVM/MA hidrolisado em diferentes temperaturas. ....39

**Tabela 3** – Crescimento bacteriano da espécie *S. mutans* representado em UFC em concentrações de 480; 240; 120 e 60µg/mL de PVM/MA hidrolisado em diferentes temperaturas. ....43

**Tabela 4** – Representatividade de espalhamento de luz dinâmico no sistema (%), coeficiente de difusão e índice de polidispersão de populações obtidas por DLS em concentrações de 480; 240; 120 e 60µg/mL de PVM/MA em diferentes valores de pH. Os valores indicados foram obtidos através das análises de intensidade e número de partículas espalhadoras. ....58

**Tabela 5** – Representatividade de espalhamento de luz dinâmico no sistema (%), coeficiente de difusão e índice de polidispersão de populações obtidas por DLS para o PVM/MA 480µg/mL, tampão acetato-fosfato-borato 30 mM pH7, em função da concentração de NaCl. Os valores apresentados foram obtidos por análise de intensidade e número de partículas espalhadoras. ....62

**Tabela 6** – Valores de potencial zeta obtidos por ensaios de hidrólise do PVM/MA 480µg/mL em função de diferentes valores de pH. ....63

**SUMÁRIO**

<b>1.Introdução</b>	<b>15</b>
1.2 Micro-organismos, fármacos e biotecnologia	16
1.2.1 <i>Cândida albicans</i>	21
1.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	23
1.2.3 <i>Streptococcus mutans</i>	23
1.3 Copolímero Poli Metil Vinil Éter/ Ácido Maleico (PVM/MA)	24
<b>2. Objetivos</b>	<b>27</b>
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos Específicos:	28
<b>3. Metodologia</b>	<b>28</b>
3.2 Micro-organismos	29
3.3 Ensaio antimicrobianos	30
3.4 Ensaio de Integridade da Membrana Plasmática	31
3.5 Ensaio de caracterização físico-química	32
3.6 Análise Estatística	33
<b>4. Resultados e discussões</b>	<b>33</b>
4.1 Teste antimicrobiano	33
4.1.1 <i>C. albicans</i> x PVM/MA	33
4.1.2 <i>S. aureus</i> x PVM/MA	37
4.1.3 <i>S. mutans</i> x PVM/MA	40
4.2 Integridade de membrana plasmática	44
4.2.1 <i>C. albicans</i>	44
4.2.2 <i>S. aureus</i>	46
4.2.3 <i>S. mutans</i>	48
4.3 Análise físico-química	50

4.3.1 Análise da hidrólise de PVM/MA através de espectrofotometria_____	51
4.3.2. Estudos por DLS em função da diluição do PVM/MA a 25°C em diferentes valores de pH_____	53
4.3.3 Estudos por DLS da diluição de PVM/MA a 25°C e 480µg/mL com adição de NaCl em pH neutro_____	59
4.3.4 Análise de Potencial Zeta do PVM/MA 480µg/mL em diferentes valores de pH_____	61
<b>5.Conclusão_____</b>	<b>62</b>
<b>6. Referências Bibliográficas _____</b>	<b>64</b>

## 1.Introdução

Não é novidade que, com o passar dos anos, os micro-organismos vêm se destacando pela sua capacidade de resistir a fármacos amplamente utilizados (VENTOLA, 2015). Com isso, combater novas doenças infecciosas torna-se um desafio crescente para a comunidade científica (BOWEN, 2018; BAKER, 2016). Uma das principais contribuições da biotecnologia é a capacidade de identificar novos compostos antimicrobianos com técnicas inovadoras que aumentam significativamente as chances de descobrir novos agentes terapêuticos (OSMAKOVA *et al.*, 2017).

A biotecnologia desempenha um papel crucial na identificação e desenvolvimento de novos antimicrobianos, oferecendo ferramentas avançadas para superar a resistência antimicrobiana crescente. Com técnicas como a engenharia genética, biologia sintética e a edição de genes CRISPR-Cas9, pesquisadores conseguem identificar novos alvos terapêuticos e desenvolver compostos antimicrobianos inovadores (LI *et al.*, 2019; WRIGHT, 2019). Além disso, a biotecnologia permite a produção de peptídeos antimicrobianos e bacteriófagos modificados, que são promissores para tratar infecções resistentes (MOOKHERJEE *et al.*, 2020).

Desenvolver formulações estáveis de antimicrobianos é essencial para garantir sua eficácia, segurança e vida útil. A estabilidade das formulações antimicrobianas pode ser aumentada por meio de diversas estratégias, incluindo o uso de excipientes estabilizantes, encapsulamento em nanopartículas e a modificação química dos compostos antimicrobianos (KAMARUZZAMAN, 2019). Segundo Zhang *et al.* (2020), o encapsulamento de antimicrobianos em nanopartículas poliméricas pode proteger o composto ativo da degradação e melhorar sua biodisponibilidade.

Além disso, Liu *et al.* (2021) destacam que a adição de antioxidantes nas formulações pode prevenir a oxidação e a decomposição dos antimicrobianos, prolongando sua vida útil. Essas abordagens são fundamentais para assegurar que os antimicrobianos mantenham sua atividade terapêutica ao longo do tempo e sejam seguros para uso clínico (RAVIKUMAR *et al.*, 2019).

Técnicas físico-químicas são capazes de demonstrar a estabilidade de uma partícula, o que é importante para garantir que os medicamentos

permaneçam eficazes durante o armazenamento e transporte, e que possam ser administrados de forma segura aos pacientes (HUEMER, 2020).

## 1.2 Micro-organismos, fármacos e biotecnologia

Os micro-organismos, que incluem bactérias, fungos, vírus e protozoários, são organismos microscópicos que desempenham papéis vitais no ecossistema e na saúde humana (BOWEN, 2018). No que diz respeito às bactérias, a microbiota intestinal é essencial para a digestão de nutrientes, a regulação do sistema imunológico e a proteção contra patógenos. Estudos mostram que uma microbiota intestinal saudável pode influenciar positivamente o metabolismo e reduzir a incidência de doenças como diabetes tipo 2, obesidade e doenças inflamatórias intestinais (SCHELER *et al.*, 2018; STIRLING *et al.*, 2022).

Nesse contexto, os fungos também oferecem benefícios significativos à saúde humana. Certos fungos, como os cogumelos comestíveis, são ricos em nutrientes essenciais, incluindo vitaminas B, C e D, fibras, e minerais como potássio, fósforo e cálcio. Além de serem uma fonte importante de proteínas, muitos cogumelos possuem propriedades medicinais, como efeitos antioxidantes, antidiabéticos e até mesmo anticancerígenos (HALLEN-ADAMS *et al.*, 2017). O shitake, por exemplo, tem propriedades antivirais e pode ajudar a reduzir o colesterol sérico (FURFARO *et al.*, 2024).

Embora muitos micro-organismos sejam benéficos a população, em alguns casos, eles podem apresentar riscos à saúde quando proliferados no indivíduo de forma desigual devido a fatores internos e externos, como imunidade, temperatura, exposição a locais contaminados, entre outros (BAKER, 2016). Exemplos de micro-organismos que podem causar problemas incluem o fungo *Candida albicans*, e as bactérias *Staphylococcus aureus* e o *Streptococcus mutans* (LEMOS *et al.*, 2019).

Para combater essas infecções oportunistas, os fármacos antimicrobianos têm sido desenvolvidos e utilizados amplamente, proporcionando uma das maiores conquistas da medicina moderna e fundamental na redução da mortalidade e morbidade associadas a doenças infecciosas. Entre os exemplos amplamente utilizados, a penicilina é um dos primeiros antibióticos descobertos, eficaz contra uma variedade de bactérias, revolucionando o tratamento de

infecções bacterianas. O ciprofloxacino, um antibiótico de amplo espectro da classe das fluoroquinolonas, é usado no tratamento de diversas infecções bacterianas, incluindo as do trato urinário e respiratório (MUNITA & ARIAS, 2016). A vancomicina é utilizada principalmente para tratar infecções graves causadas por bactérias resistentes a outros antibióticos, como o *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) (LIU *et al.*, 2020). A azitromicina, um antibiótico macrolídeo, trata infecções bacterianas como pneumonia, bronquite e algumas infecções sexualmente transmissíveis (FLETCHER-LARTEY *et al.*, 2021). O metronidazol é eficaz contra infecções causadas por bactérias anaeróbicas e protozoários, frequentemente usado para tratar infecções intra-abdominais e vaginites bacterianas (LÖFMARK *et al.*, 2020).

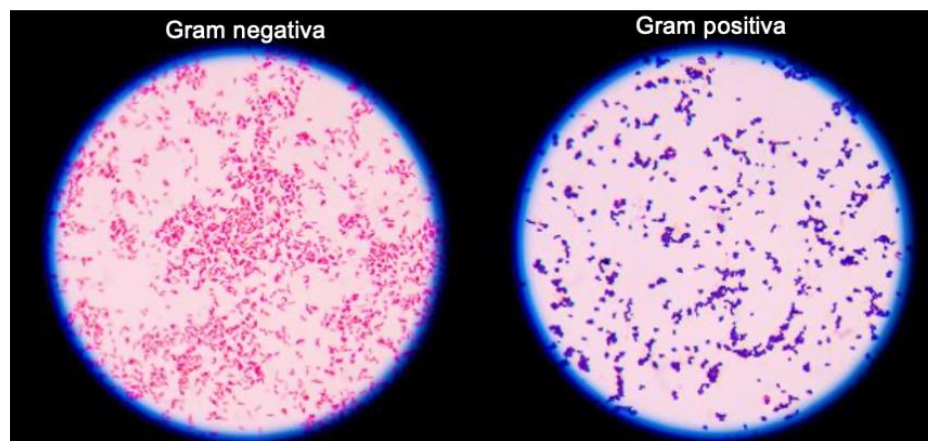
No entanto, o uso extensivo e, muitas vezes, inadequado desses medicamentos tem levado ao surgimento e disseminação da resistência antimicrobiana (VENTOLA, 2015). Esse fenômeno ocorre quando microorganismos sofrem mutações ou adquirem genes de resistência, tornando-se insensíveis aos tratamentos existentes e, como resultado, infecções comuns podem se tornar difíceis de tratar, representando uma ameaça crescente à saúde pública global (MICHAEL *et al.*, 2014).

Para combater o problema da resistência antimicrobiana, é crucial entender os mecanismos de ação dos antibióticos e a anatomia dos microorganismos. Quando se trata de bactérias, elas podem ser classificadas como gram-positivas ou gram-negativas com base nas características de suas paredes celulares, que determinam sua reação à coloração de gram (técnica de coloração utilizada para classificar bactérias com base na estrutura de suas paredes celulares, distinguindo as gram-positivas em roxas e gram-negativas em rosas/vermelhas – Figura 1) (VENTOLA, 2015; LI *et al.*, 2019).

As bactérias gram-positivas possuem uma parede celular espessa com várias camadas de peptidoglicano, retendo o corante cristal violeta e aparecendo roxas ou azuis sob o microscópio. Em contraste, as bactérias gram-negativas têm uma parede celular mais complexa, com uma fina camada de peptidoglicano entre duas membranas, e não retêm o corante cristal violeta, aparecendo rosa ou vermelho devido ao contra-corante safranina. A estrutura da parede celular influencia significativamente a resistência a antibióticos e a patogenicidade dessas bactérias (KIZALOGLU *et al.*, 2019).

A diferença estrutural entre as paredes celulares das bactérias gram-positivas e gram-negativas tem implicações significativas na sua resistência a antibióticos e na forma como causam doenças. As bactérias Gram-positivas, com sua espessa camada de peptidoglicano, são geralmente mais resistentes à lise osmótica, enquanto as gram-negativas, com sua membrana externa, têm maior resistência a muitos antibióticos e detergentes (MEGRAN *et al.*, 2020). Esta classificação não só ajuda na identificação e tratamento das infecções bacterianas, mas também orienta a pesquisa científica e o desenvolvimento de novos antimicrobianos (KOULENTI *et al.*, 2018).

**Figura 1** – Coloração de gram.



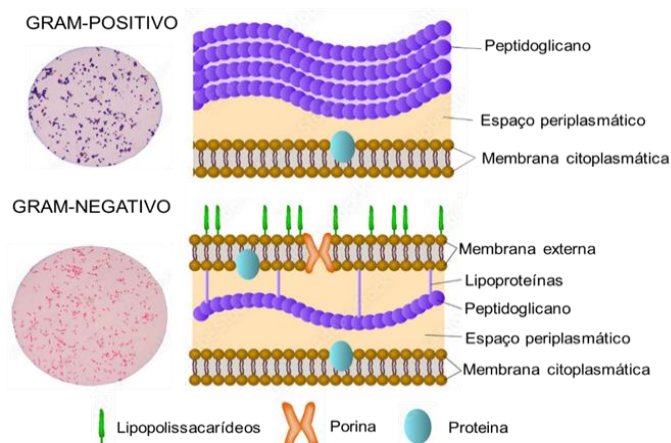
Fonte: MADIGAN (2018).

Nas bactérias gram-positivas, a grande parte dos antibióticos inibem a síntese de peptidoglicano, gerando o enfraquecimento da parede celular e consequentemente levando à lise osmótica da bactéria (VAN BOECKEL *et al.*, 2014). Por outro lado, bactérias gram-negativas têm uma camada de peptidoglicano muito mais fina localizada entre duas membranas celulares, a interna e a externa (Figura 2).

A membrana externa contém lipopolissacarídeos que impedem a penetração de muitos antibióticos, tornando essas bactérias naturalmente mais resistentes, assim como já foi mencionado. Antibióticos como as polimixinas se ligam aos lipopolissacarídeos e fosfolípídios na membrana externa, alterando sua permeabilidade e permitindo a passagem de compostos que causam então a morte celular (CAO *et al.*, 2021). Compreender essas diferenças permite o desenvolvimento de fármacos específicos que podem atravessar essas barreiras

ou inibir funções essenciais para a sobrevivência das bactérias, melhorando a eficácia dos tratamentos.

**Figura 2** - Componentes estruturais da parede celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas.



Fonte: Images/iStockphoto.

O *S. aureus* por exemplo, é um patógeno bacteriano que causa uma ampla gama de infecções, desde infecções de pele e tecidos moles até pneumonia, endocardite e septicemia (CHEUNG *et al.*, 2021; KWIECINSKI, 2020). A resistência aos antibióticos é uma preocupação crescente, tornando as infecções por esta bactéria mais difíceis de tratar e controlando a necessidade urgente de novas abordagens terapêuticas e preventivas. Pesquisas focadas em entender os mecanismos de resistência, virulência e transmissão de *S. aureus* são fundamentais para combater a ameaça crescente das infecções resistentes aos antibióticos (ASENJO *et al.*, 2021).

Já o *S. mutans* é um dos principais agentes etiológicos da cárie dentária, uma das doenças infecciosas mais comuns no mundo. A cárie dentária não só afeta a qualidade de vida das pessoas, causando dor e desconforto, mas também está associada a outras condições de saúde, como doenças cardiovasculares (DONLAN *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2021). Compreender a biologia deste micro-organismo, incluindo seus mecanismos de formação de biofilme e produção de ácidos, é vital para desenvolver métodos eficazes de prevenção e tratamento da cárie dentária. Além disso, a pesquisa contínua sobre *S. mutans* pode levar a melhores estratégias de saúde pública e educação para

reduzir a incidência de cárie dentária em populações vulneráveis (MARTINEZ *et al.*, 2020).

Estudar micro-organismos é crucial devido ao seu impacto significativo na saúde humana, meio ambiente e economia. Do ponto de vista da saúde, avaliar a resistência antimicrobiana através da compreensão dos micro-organismos pode ajudar a entender os mecanismos de resistência, desenvolver novos antibióticos ou terapias alternativas, desenvolver novas vacinas para doenças infecciosas emergentes e reemergentes, dentre outros objetivos. Por isso estudar as bactérias, mas também fungos também são de grande relevância para a ciência.

A *C. albicans* por exemplo, é um fungo oportunista responsável por infecções em humanos, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, como pacientes com HIV/AIDS, diabéticos e aqueles submetidos a tratamentos de quimioterapia. As infecções podem variar de superficiais, como candidíase oral e vaginal, até infecções sistêmicas graves que podem ser fatais (HIBBERT & HELDER, 2021; WANG, 2015). Com o aumento da resistência antifúngica, compreender os mecanismos de patogenicidade e resistência é essencial para desenvolver novos tratamentos e estratégias de prevenção (CALDERONE, 2002).

Neste contexto a presente dissertação de mestrado aborda o estudo de três micro-organismos cruciais para a saúde humana: *S. aureus*, *S. mutans*, e *C. albicans*. Estudar esses patógenos é de extrema importância para prevenir doenças, desenvolver novos tratamentos e estratégias de prevenção, além de enfrentar os desafios crescentes da resistência antimicrobiana (BROWN *et al.*, 2020). A pesquisa contínua nessas áreas pode levar a avanços significativos na medicina e na qualidade de vida das pessoas globalmente, como destacado em estudos recentes (FURFARO *et al.*, 2024)

A biotecnologia surge como uma poderosa aliada na busca por soluções inovadoras para enfrentar a resistência antimicrobiana, e um aspecto crucial no desenvolvimento de novos compostos é a formulação de partículas estáveis. A estabilidade de um fármaco depende de diversos fatores, incluindo a temperatura durante a fabricação e o armazenamento (ASENJO *et al.*, 2021). Estudar a temperatura ideal para confecção de novas partículas é essencial para se garantir que esses medicamentos mantenham suas propriedades

terapêuticas, pois a temperatura inadequada pode levar à degradação do composto ativo reduzindo sua eficácia e segurança (NIJMOH *et al.*, 2022). Portanto, a otimização das condições ambientais é um passo fundamental na produção de antimicrobianos de alta qualidade.

Por exemplo, Da Silva *et al.* (2019) realizaram uma revisão abrangente dos mecanismos de ação e resistência a agentes antifúngicos. Eles destacaram que variações na temperatura e no pH do meio de cultura podem ter um impacto significativo na eficácia dos tratamentos antifúngicos. Em um dos estudos revisados, foi observado que a temperatura ótima para a atividade antifúngica de certos compostos era de 37°C, enquanto temperaturas mais baixas ou mais altas resultavam em uma redução significativa na eficácia.

Além disso, o pH do meio de cultura foi identificado como um fator crítico; um pH ligeiramente ácido (em torno de 5,5) aumentou a sensibilidade dos fungos aos tratamentos, enquanto um pH neutro ou alcalino diminuiu a eficácia. Esses achados sugerem que o controle rigoroso das condições ambientais pode potencialmente superar a resistência microbiana, melhorando assim os resultados terapêuticos e a produção de antimicrobianos de alta qualidade.

### 1.2.1 *Cândida albicans*

A *C. albicans* é um fungo da microbiota humana saudável, colonizando assintomaticamente vários nichos no corpo, incluindo o sistema reprodutor feminino, a cavidade oral e a pele, além disso, é o fator etiológico mais frequente de infecções fúngicas oportunistas humanas (NONAKA *et al.*, 2008; LUBIAN *et al.*, 2010). A forma mais comum de infecção por *Cândida* ocorre quando o fungo se desloca de seu nicho normal para outros tecidos. Suas manifestações clínicas podem envolver tecidos mucocutâneos, cutâneos e sistêmicos, como infecções na cavidade oral, vaginal e candidíase cutânea que afeta áreas úmidas do corpo, incluindo as regiões das mamas, axilas e virilhas (MUNITA, 2016).

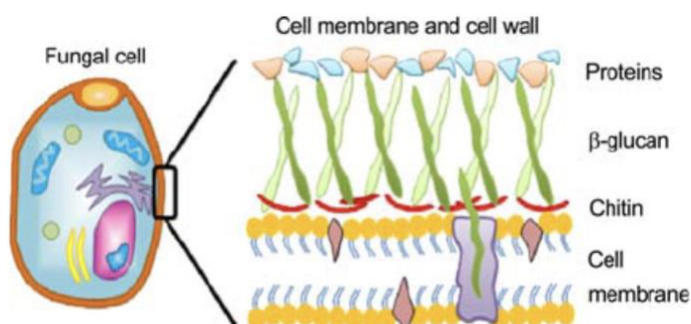
A estrutura de *C. albicans* contribui significativamente para sua patogenicidade, se trata de um organismo dimórfico capaz de alternar entre formas de levedura unicelular e formas filamentosas multicelulares, como hifas e pseudohifas (GOW *et al.*, 2017). A forma de levedura é geralmente associada à colonização e crescimento em ambientes favoráveis, enquanto as formas

filamentosas estão frequentemente associadas à invasão de tecidos e à virulência (BROWN *et al.*, 2012).

A parede celular de *C. albicans* é uma característica estrutural crucial, composta por uma matriz complexa de glucanos, quitina e proteínas ligadas glicoproteínas como demonstrado na figura 3 (WANG *et al.*, (2015).

Essa parede celular não apenas fornece integridade estrutural e proteção contra o ambiente externo, mas também desempenha um papel fundamental na interação com o sistema imunológico do hospedeiro (GOW *et al.*, 2017). As proteínas da superfície da parede celular, conhecidas como adesinas, permitem que o fungo se fixe às células do hospedeiro e aos dispositivos médicos (bisturis, agulhas etc.) facilitando a colonização e a formação de biofilmes, que são comunidades microbianas altamente resistentes a tratamentos antifúngicos (HOF, 2017).

**Figura 3** – Composição de membrana fúngica.



Fonte: WANG *et al.*, (2015).

Algumas cepas de *C. albicans* são uma preocupação significativa na área de saúde devido à dificuldade de tratamento e ao risco aumentado de mortalidade em infecções sistêmicas. Essa resistência pode ser adquirida por meio de mutações genéticas ou pela formação de biofilmes que protegem o fungo dos tratamentos convencionais (PERLIN, 2015). Os principais antifúngicos usados no tratamento de infecções por Cândida incluem os azóis, as equinocandinas e os polienos, mas a resistência a esses medicamentos tem sido relatada com frequência crescente (POULAIN *et al.*, 2015). Por exemplo, cepas resistentes ao fluconazol, um dos antifúngicos mais comumente utilizados, têm sido amplamente documentadas e representa uma preocupação clínica significativa (DA SILVA *et al.*, 2019).

### 1.2.2 *Staphylococcus aureus*

O *S. aureus* é uma bactéria gram-positiva (contém uma espessa camada de peptidoglicano) e é um dos principais patógenos humanos, capaz de causar desde infecções superficiais leves até infecções graves e com risco de vida. Esta bactéria tem a capacidade de crescer em superfícies vivas ou inertes, formando biofilmes, como por exemplo na mucosa oral. O biofilme é uma comunidade compactada de células circundadas por uma matriz celular, desempenhando um papel importante na resistência a antibióticos, o que representa uma ameaça pública global (KLEINSCHIMDT *et al.*, 2015).

As doenças provocadas pelo *S. aureus* podem resultar da invasão direta dos tecidos, localizando-se em um ou múltiplos sítios, causando manifestações como foliculite (infecção dos folículos pilosos), carbúnculo (infecção profunda da pele e tecido subcutâneo), antraz (infecção cutânea), furúnculos localizados, hordéolo (terçol, infecção das glândulas palpebrais), hidradenite (inflamação das glândulas sudoríparas), impetigo (infecção cutânea superficial) e até mesmo infecções sistêmicas mais severas (FLETCHER-LARTEY *et al.*, 2021).

A capacidade do *S. aureus* de formar biofilmes e sua resistência a múltiplos antibióticos complicam o tratamento das infecções. Além disso, a presença de fatores de virulência, como toxinas e enzimas que degradam tecidos, contribui para sua patogenicidade e diversidade de manifestações clínicas (KLEVENS, 2007). A atenção contínua da comunidade científica para entender melhor os mecanismos de resistência e desenvolver novos tratamentos eficazes é crucial para combater estas infecções.

O *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) é notório por sua resistência a quase todos os antibióticos beta-lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos. A resistência do MRSA deve-se à aquisição do gene *mecA*, que altera a proteína de ligação à penicilina (PBP2a), reduzindo a afinidade pelos antibióticos beta-lactâmicos (LÖFMARK *et al.*, 2020). Além disso, foram documentadas resistências a outros antibióticos, como fluoroquinolonas, macrolídeos, lincosamidas e tetraciclina (DA SILVA, *et al.*, 2019).

### 1.2.3 *Streptococcus mutans*

O *S. mutans* também é uma bactéria gram-positiva comumente encontrada na cavidade oral humana, desempenhando um papel crucial na formação de cáries dentárias, sendo um dos principais agentes causadores dessa doença infecciosa (LEMOS *et al.*, 2019; KRZYŚCIAK *et al.*, 2014). Esta bactéria agrupa-se em cadeias ou pares, além de ser anaeróbia facultativa, o que significa que pode sobreviver tanto na presença quanto na ausência de oxigênio. O *S. mutans* também possui a capacidade de metabolizar carboidratos fermentáveis, como a sacarose, produzindo ácido láctico como produto. Este ácido é fundamental para o desenvolvimento da cárie, pois causa a desmineralização do esmalte dentário ao se acumular no biofilme dental (MIRANDA *et al.*, 2007).

Além das cáries, o *S. mutans* também está associado a outras doenças sistêmicas, como a endocardite bacteriana, uma infecção das válvulas cardíacas (DAVIES, 2010). A bactéria pode entrar na corrente sanguínea através de lesões na mucosa oral, alcançando o coração e causando inflamação e danos às válvulas cardíacas. Sua capacidade de adaptação rápida a mudanças ambientais dentro da placa dentária contribui significativamente para seu papel patogênico (LAI; NGUYEN; HAO, 2022). A produção de substâncias extracelulares, como o polissacarídeo, facilita a aderência da bactéria à superfície dentária e a formação de biofilmes resistentes ao ambiente hostil da cavidade oral (OSMAKOVA *et al.*, 2017; SANTOS, 2014).

Para combater esta patogenicidade, avanços biotecnológicos têm levado ao desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas que visam minimizar os danos à saúde (NGEUYEN, 2022). No entanto, a capacidade de adaptação e modificação constante desses micro-organismos pressiona a ciência a estudar e desenvolver continuamente novos compostos (VEHAPI *et al.* 2023). Em resumo, *S. mutans* é uma bactéria com significativa importância clínica, não apenas por seu papel na cárie dentária, mas também por suas implicações em outras doenças sistêmicas (MIRANDA *et al.*, 2007). A pesquisa contínua sobre suas características e os métodos para combatê-la é vital para melhorar a saúde bucal e geral da população.

### 1.3 Copolímero Poli Metil Vinil Éter/ Ácido Maleico (PVM/MA)

O uso de copolímeros na biotecnologia tem se tornado cada vez mais importante devido às suas propriedades únicas e versatilidade, permitindo avanços significativos em diversas áreas da ciência e tecnologia (MENDES *et al.*, 2005). Os copolímeros são feitos a partir de polímeros com dois ou mais monômeros diferentes, o que lhes confere uma ampla gama de propriedades físicas, químicas e mecânicas que podem ser ajustadas conforme necessário para aplicações específicas (ANTUNES, 2014; RASULI *et al.*, 2008).

Uma das principais aplicações dos copolímeros na biotecnologia é no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos, podendo ser projetados para liberar medicamentos de forma controlada e sustentada, melhorando a eficácia terapêutica e reduzindo efeitos colaterais (SARTORI, 2021).

Além disso, os copolímeros são essenciais na engenharia de tecidos e medicina regenerativa. Eles são usados para criar scaffolds (andaimes) que fornecem suporte estrutural para o crescimento celular e a formação de novos tecidos (BONARTSEV *et al.*, 2022). As propriedades mecânicas e a biocompatibilidade destes materiais podem ser ajustadas para imitar as características do tecido natural, promovendo a regeneração de tecidos como ossos, cartilagens e pele (DAVIES, 2007).

Além dessas aplicações, os copolímeros têm ganhado destaque devido às suas propriedades antimicrobianas, o que amplia ainda mais suas aplicações em diversas áreas da saúde e ciências biológicas (WANG *et al.*, 2013). A investigação destas propriedades antimicrobianas nos copolímeros é crucial para combater infecções, prevenir a contaminação e promover a esterilidade em ambientes médicos e laboratoriais, pois são amplamente utilizados em dispositivos médicos como cateteres, implantes e curativos, onde a prevenção de infecções é de suma importância (ZHAO *et al.*, 2021).

Na engenharia de tecidos e medicina regenerativa, os scaffolds feitos de copolímeros antimicrobianos não só suportam o crescimento celular e a regeneração tecidual, mas também protegem contra infecções que podem comprometer a integridade do tecido em formação (LIU *et al.*, 2022). Estes copolímeros antimicrobianos também são usados para revestir superfícies de equipamentos médicos e hospitalares, criando uma barreira que inibe o

crescimento de micro-organismos, reduzindo o risco de infecções nosocomiais (infecções adquiridas em ambiente hospitalar) (GANASSIN, *et al.*, 2018).

Adicionalmente, esses compostos também podem ser usados na embalagem de alimentos e produtos farmacêuticos para prolongar a vida útil e prevenir a contaminação. As embalagens feitas com esses materiais ajudam a manter a esterilidade e a qualidade dos produtos, proporcionando uma camada adicional de proteção contra micro-organismos patogênicos (MURRAY *et al.*, 2011).

O copolímero utilizado neste estudo foi o PVM/MA (Poli metil vinil éter/ácido maleico), um copolímero que se origina a partir de uma reação entre éter metil-vinílico e anidrido maleico e tem sido frequentemente utilizado em uma variedade de aplicações devido a suas propriedades anfífilas. Portanto, o PVM/MA possui regiões hidrofílicas (que interagem bem com a água) devido aos grupos anidrido maleico e regiões hidrofóbicas (que não interagem bem com a água) devido aos grupos metil vinil éter (YAKIAMA, *et al.*, 1995; YONCHEVA, LIZARRAGA, & IRACHE, 2005). Essa estrutura anfífila confere ao PVM/MA uma série de propriedades úteis em várias aplicações, algumas delas incluem (LEÓN-RODRIGUES., *et al.*, 2010; ARIAS-DURÁN, 2022):

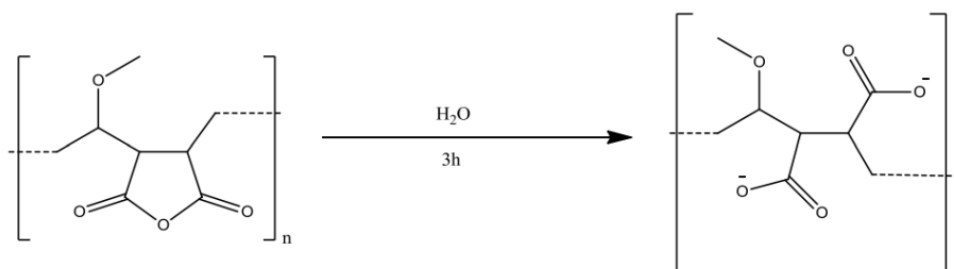
- Agente de Ligação e Encapsulamento: Em aplicações biomédicas e farmacêuticas, o PVM/MA é usado como um agente de ligação para encapsular substâncias ativas, como fármacos, para entrega controlada.
- Estabilizante de Emulsões: usado para estabilizar emulsões em formulações cosméticas e farmacêuticas.
- Reagente em Síntese Orgânica: O copolímero também é usado como reagente em síntese orgânica para introduzir grupos funcionais específicos em moléculas.

O copolímero estudado em sua forma original é inicialmente hidrofóbico devido à presença de grupos anidridos simétricos, que reduzem a sua polaridade. No entanto, em poucas horas de exposição à água, ele se torna hidrofílico devido ao processo de hidrólise (Figura 4) (LAI *et al.*, 2018).

A eficácia antimicrobiana de um copolímero está intrinsecamente ligada à sua composição química e às suas propriedades (PANAGAKOS *et al.*, 2005). Em alguns casos, esses podem mimetizar a estrutura e as propriedades de peptídeos antimicrobianos naturais, o que lhes confere a capacidade de interagir

com as membranas celulares de micro-organismos e desestabilizá-los (LAI *et al.*, 2022).

**Figura 4** – Hidrólise dos agrupamentos anidrido presente no copolímero PVM/MA.



Fonte: LAI *et al.*, (2022).

Apesar da eficácia bem estabelecida desse copolímero, ainda há uma lacuna de conhecimento em relação aos efeitos que a hidrólise do PVM/MA em diferentes temperaturas pode causar nas células e micro-organismos. Essa informação é fundamental em diversas áreas, incluindo química, farmacologia e engenharia biomédica, pois a temperatura de hidrólise é um fator crítico que influencia as propriedades e aplicações desse composto. É possível que os subprodutos gerados durante a hidrólise possam ter efeitos inibitórios ou mesmo potencializadores (VANDENPLAS, 2017).

Até o momento, a literatura científica carece de estudos significativos relacionados à temperatura de manipulação desse copolímero. Portanto, é fundamental uma compreensão mais aprofundada dos efeitos de diferentes condições de processamento do PVM/MA.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste estudo foi investigar os efeitos das diferentes temperaturas de hidrólise do copolímero PVM/MA nas suas propriedades antifúngicas e antibacterianas contra as cepas de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans*. Além disso, objetivou-se avaliar a estabilidade polimérica do PVM/MA em diferentes condições do meio, visando seu potencial uso em formulações e aplicações biotecnológicas.

## 2.2 Objetivos Específicos:

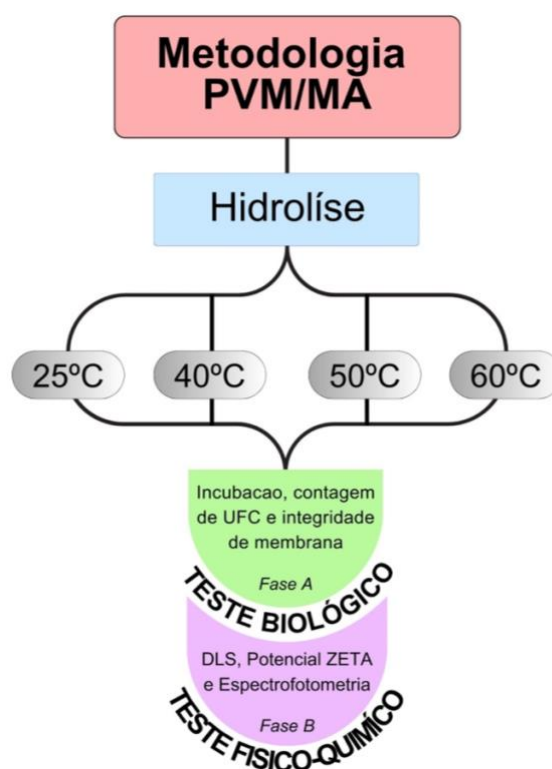
- a) Estudar a hidrólise do copolímero PVM/MA em temperaturas de 25°C, 40°C, 50°C e 60°C.
- b) Analisar o crescimento microbiológico através do plaqueamento e quantificação das UFC dos três micro-organismos citados acima, levando em consideração a temperatura de hidrólise do PVM/MA.
- c) Avaliar a integridade da membrana dos micro-organismos expostos ao copolímero.
- e) Determinar o tamanho das partículas do PVM/MA em diferentes valores de pH, presença e ausência de NaCl e determinar o potencial zeta do copolímero.

## 3. Metodologia

Este estudo foi realizado em duas fases distintas como representado no fluxograma da figura 5. Na Fase A, conduziram-se testes biológicos que incluíram a incubação do microrganismo alvo com concentrações de PVM/MA hidrolisado em diferentes temperaturas, além de ensaios para avaliação da integridade da membrana plasmática utilizando microscopia de fluorescência, sendo esta fase realizada no laboratório de microbiologia da Fundação Hermínio Ometto, em Araras-SP.

Na Fase B, procedeu-se à caracterização físico-química do copolímero, realizando ensaios de espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês “Dynamic Light Scattering”), potencial zeta e espectrofotometria de absorção ótica, esta etapa foi conduzida no Instituto de Estudos Avançados do Mar (IEAMAR), localizado na FCAVR/UNESP, na cidade de Registro-SP.

**Figura 5** – Fluxograma da metodologia utilizada neste estudo.



Fonte: elaborado pela autora.

### 3.1 PVM/MA

O copolímero PVM/MA foi adquirido da empresa Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha, com fórmula molecular de  $(C_4H_2O_3 \cdot C_3H_6O)_n$  na forma de pó, pureza de 98%, e foi armazenado em temperatura ambiente. Uma solução estoque de PVM/MA foi preparada pesando-se 15 mg do copolímero e solubilizando-o em 1mL de água ultrapura (Milli-Q) estéril em temperatura de 25°C, sob uma capela de fluxo laminar. A solução foi submetida a leve agitação por 5 minutos, resultando em uma solução turva. Essa solução foi colocada em um banho-maria seco, nas temperaturas alvo de 25°C, 40°C, 50°C e 60°C sendo os ensaios realizados em dias independentes para cada temperatura. Após 24 horas obteve-se uma solução translúcida do copolímero completamente diluído.

### 3.2 Micro-organismos

Para realizar os ensaios *in vitro* de atividade antimicrobiana foram utilizadas as cepas bacterianas de *S. aureus* ATCC 25923 (FHO, Microbiologia),

*S. mutans* ATCC 25175 (FAT – CCT, Campinas) isolada da carie humana, ambas gram-positivas, e a cepa de *C. Albicans* ATCC 27853 (FHO, Microbiologia). O meio ágar utilizado para cultivo de *S. aureus* foi Baird Parker Ágar (Sigma-Aldrich), para *S. mutans*, Ágar Mitis Salivarius (Difco), e para *C.albicans*, Ágar Cetrimide (Acumedia) enriquecido com 1% de glicerol.

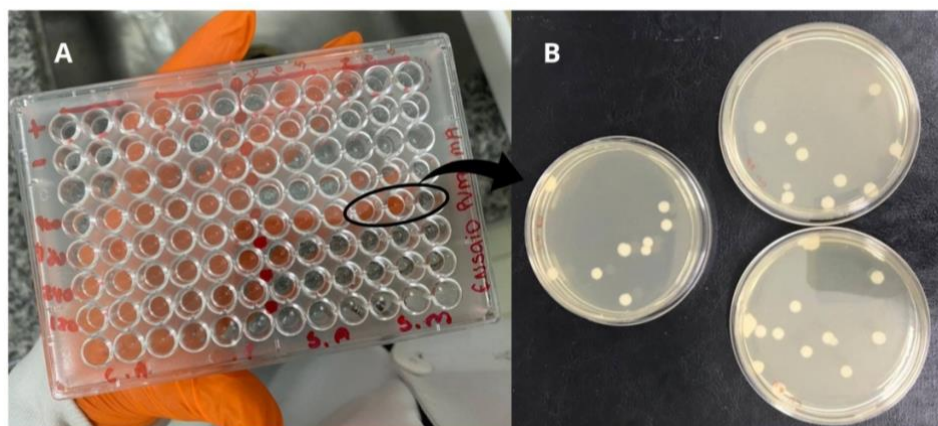
### 3.3 Ensaio antimicrobianos

A análise da atividade antimicrobiana do PVM/MA foi realizada por meio de bioensaios *in vitro* pelo método de microdiluição em placa, segundo padronização da CLSI (2015), com modificações. As bactérias, *S. aureus*, *S. mutans* e o fungo *C.albicans* foram previamente plaqueadas em meio ágar específico e mantidas em estufa por 18-24hs, a partir desta cultura estabeleceu-se uma solução suspensa de células de acordo com a escala 0,5 de McFarland (que representa  $1,5 \times 10^7$  UFC/mL) com posterior diluição seriada em Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS), estéril de pH 7,4, para atingir a concentração de  $1,5 \times 10^3$  UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia).

O bioensaio foi montado em microplaca de 96 poços. Cada poço foi inoculado com 100µL da suspensão bacteriana e 100µL do tratamento 2x mais concentrado (960, 480, 240 e 120µg/mL), totalizando 200µL por poço, sendo então testadas as concentrações de interesse de 480, 240, 120 e 60µg/mL de PVM/MA, que se seguem. Tais concentrações foram selecionadas por um teste de concentração inibitória mínima (MIC) já previamente realizado e padronizado por SANTOS, 2022. Após a aplicação nos poços, a placa foi incubada a 37° C, por 30 minutos e posteriormente o conteúdo de cada poço foi inoculado em placas com meio ágar específico.

As placas foram cultivadas por 24 horas a 37°C. Após este período, foi realizada a contagem das UFC, com a média sendo obtida a partir da contagem das triplicatas. De controle foram utilizados, H<sub>2</sub>O Mili-Q estéril como controle negativo (CN), para as bactérias foi utilizado clorexidina 0,12% como controle positivo (CP) e para *C.albicans* o CP utilizado foi o antifúngico fluconazol a 10%. Os ensaios foram realizados em triplicata, com experimentos independentes em dias diferentes. Figura 6 apresenta um exemplo desses experimentos.

**Figura 6** – Representação de parte do processo experimental: A) Incubação nos poços da suspensão microbiana juntamente com o tratamento em estudo. B) Resultado do plaqueamento do conteúdo ilustrado em A após 24 horas.



Fonte: própria.

### 3.4 Ensaio de Integridade da Membrana Plasmática

A integridade da membrana plasmática foi avaliada conforme descrito por Suchodolski e colaboradores (2017). Resumidamente, as células dos microorganismos foram colhidas por centrifugação (10 min, 956 × g) na fase estacionária e lavadas duas vezes com PBS, seguido por 1 h de incubação, com a concentração de PVM/MA com melhor desempenho antimicrobiano e com clorexidina 0,12% (CLX) para as bactérias e fluconazol 10% (FCZ) para o fungo. Após incubação, as células foram então lavadas duas vezes com PBS, ressuspensas em 150 µL de iodeto de propídio PI (6,0 µM) e incubadas durante 5 min. Após a incubação, as células tratadas foram lavadas novamente com PBS, por duas vezes.

Os pellets foram ressuspensos em 200 µL de PBS e 4 µL das amostras foi utilizado para montar lâminas que foram visualizados em microscópio óptico LEICA® DM-2000 acoplado com uma câmera LEICA® DFC-280 e software LAS® versão 3.3.0 (Leica Microsystem, Wetzlar, Alemanha). As imagens foram capturadas com aumento de 400x, no campo claro e campo escuro (fluorescência), sob parâmetros de microscopia padronizados. Cada imagem foi analisada de forma independente para a área total (20 mm<sup>2</sup>) de campo escuro / campo claro e os resultados expressos pela porcentagem de células coradas.

A porcentagem de morte celular foi avaliada medindo a razão de área das regiões fluorescentes para as regiões escuras (uma máscara do campo claro foi subtraída da imagem fluorescente para isolar os objetos em análise). O controle de morte celular (CP) consistiu em células tratadas com CLX e FCZ, enquanto o controle de viabilidade celular (CN) consistiu em células tratadas com PBS.

### 3.5 Ensaio de caracterização físico-química

Para a determinação do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta do PVM/MA, utilizou-se o Zetasizer Advance Pro da Malvern, modelo S4700 versão 1.27. O processo de hidrólise do copolímero ocorreu conforme descrito no item 3.1. Para os testes de DLS e potencial zeta a temperatura de hidrólise foi realizada a 25°C nas concentrações de 480, 240, 120 e 60ug/mL, em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM em diferentes valores de pH (3, 5, 7 e 9), além de análises realizadas em H<sub>2</sub>O ultra pura (água milli Q).

Em seguida, as amostras foram preparadas filtrando-se 1 mL de PVM/MA diretamente em uma cubeta com um filtro de 0,44 µm. Cada experimento foi repetido cinco vezes para obter valores médios do tamanho das partículas, PDI e potencial zeta. Os valores de diâmetro hidrodinâmico das partículas do copolímero foram determinados utilizando a equação de Stokes-Einstein (Equação 1). O potencial zeta foi observado usando a conversão da função de frequência e intensidade de espalhamento.

**Equação 1**– Equação de Stokes-Einstein. Onde,  $k_B$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura absoluta,  $\eta$  é a viscosidade do solvente,  $d$  é o diâmetro hidrodinâmico calculado das nanopartículas e  $D$  é o coeficiente de difusão.

$$d_i = \frac{k_B T}{3\pi\eta D}$$

O potencial zeta, representado pela letra grega zeta ( $\zeta$ ), é uma medida da carga elétrica superficial de partículas dispersas em um meio líquido. Essa carga surge da dissociação de grupos ionizáveis na superfície da partícula, proporcionando uma "nuvem" de íons com carga oposta à da partícula. O  $\zeta$  influencia diversas propriedades das partículas, como estabilidade, agregação e interação com outras moléculas. Partículas com  $\zeta$  altos,  $\geq |30|$ , (positivos ou

negativos) tendem a se repelir, impedindo a agregação e promovendo a estabilidade da suspensão. Já partículas com  $\zeta$  baixos são mais propensas à agregação, podendo levar à sedimentação ou formação de géis.

Para mensurar a hidrólise em vários valores de temperatura, o espectro de absorção ótica foi obtido em diferentes intervalos, durante o período de 24 horas, utilizando-se o espectrofotômetro UV 1800 Shimadzu, associado a um sistema Peltier para manter a solução na temperatura estudada. As leituras de absorbância foram realizadas a cada 2 horas durante o período de 24 horas para cada temperatura (25, 40, 50 e 60°C) em uma faixa de comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 240 a 320 nm. Todos os dados foram tratados utilizando-se o programa OriginPro 8.5 (EUA).

### 3.6 Análise Estatística

Os resultados de microbiologia foram representados como as médias  $\pm$  erro padrão. Diferenças significativas foram avaliadas por análises ANOVA TwoWay ( $p \leq 0,0001$ ) seguidos por pós-teste t Holm-Sidak ( $\alpha = 0,05$ ) usando o software GraphPad Prisma 6.0.

## 4. Resultados e discussões

### Fase A – Testes biológicos

#### 4.1 Teste antimicrobiano

##### 4.1.1 *C. albicans* x PVM/MA

Os testes com a *C.albicans* frente as concentrações de PVM/MA estão representados na Tabela 1 e Figura 7, os resultados obtidos variaram conforme a temperatura de hidrólise e a concentração proposta. O PVM/MA se mostrou capaz de interagir com as membranas celulares e ter aplicações potenciais na inibição do crescimento do fungo, no entanto, sua eficácia pode depender de vários fatores, incluindo a formulação específica, concentração, interações com outros componentes e condições de uso.

**Tabela 1** – Crescimento fúngico da espécie *C. albicans* representado em UFC em concentrações de 480; 240; 120 e 60µg/mL de PVM/MA hidrolisado em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	CN (UFC/mL)	CP (UFC/mL)	480µg (UFC/mL)	240µg (UFC/mL)	120µg (UFC/mL)	60µg (UFC/mL)
25	1087	1	119 *(88%)	232 *(78%)	332 *(69%)	401 *(63%)
40	959	3	113 *(88%)	221 *(77%)	267 *(72%)	420 *(56%)
50	996	2	32 *(96%)	110 *(88%)	263 *(73%)	678 *(31%)
60	1002	1	71 *(92%)	301 *(69%)	598 *(40%)	658 *(34%)

CP – Controle positivo. CN – Controle negativo.

\*Inibição de crescimento microbiológico (%) em relação ao CN

Fonte: elaborado pela autora

De acordos com os dados apresentados, é possível notar que a inibição fúngica com o copolímero é dose dependente, quanto maior sua concentração maior foi sua capacidade de conter o crescimento de colônias. Nos ensaios de hidrólise do PVM/MA hidrolisado a 25°C e sua incubação com o fungo, observou-se que, em comparação ao controle negativo (que não envolveu a adição de compostos e, portanto, houve crescimento fúngico considerável), a concentração de 480µg/mL do copolímero inibiu 88,9% do crescimento de colônias, enquanto as demais concentrações (240µg/mL, 120µg/mL e 60µg/mL) demonstraram inibição de 78,49%, 69,33% e 63%, respectivamente.

Esses dados sugerem que o PVM/MA hidrolisado a esta temperatura tem potencial como agente antifúngico, com a concentração mais alta exibindo a maior eficácia na inibição do crescimento de colônias. Apesar disso, todas as concentrações testadas mostraram atividade inibitória contra os fungos em comparação com o controle negativo. O controle positivo, que consiste em um antifúngico já testado e aplicado no mercado, não apresentou crescimento, como era esperado

A hidrólise realizada a 40°C apresentou um comportamento semelhante à temperatura anterior, sendo que a concentração mais elevada se mostrou mais eficaz, inibindo 88,1% do crescimento fúngico a 480µg/mL. Em comparação, houve uma redução de 77,03% a 240µg/mL, 72,11% a 120µg/mL e 56,16% na concentração mais baixa. Essas observações indicam que a hidrólise do

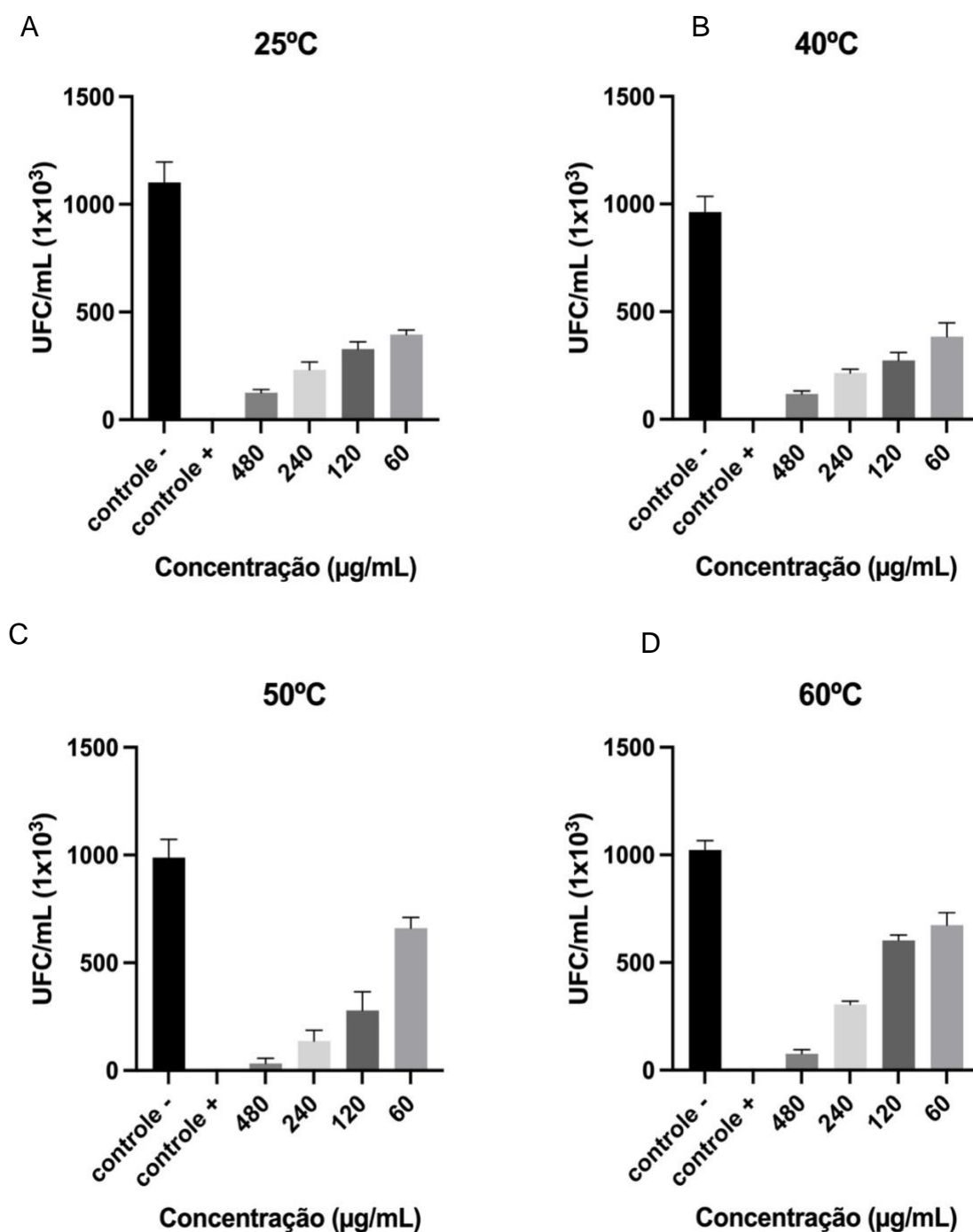
PVM/MA a 40°C ainda preserva sua capacidade de inibir o crescimento de fungos, com a concentração mais elevada demonstrando maior eficácia. Além disso, é interessante notar que a menor concentração exibiu resultados promissores, mostrando-se comparável ou até ligeiramente superior em desempenho quando comparada à temperatura de 25°C.

Assim como em todas as temperaturas, no controle positivo, não há crescimento fúngico devido à presença do fármaco. No entanto, quando se trata de temperaturas de hidrólise mais elevadas, o PVM demonstrou eficácia mais próxima do controle positivo do que em temperaturas mais baixas, especialmente nas concentrações mais elevadas (480 e 240µg/mL). A hidrólise submetida a 50°C demonstrou que a concentração de 480µg/mL inibe 96,39% do crescimento, e 240µg/mL 88,75%, o que representa uma diminuição significativa em comparação com o controle negativo.

Por outro lado, a concentração de 120µg/mL manteve um resultado estável de 73,59%, enquanto a concentração mais baixa, de 60µg/mL, pareceu ter perdido parte de sua eficácia a essa temperatura, exibindo uma redução fúngica de apenas 31,93%. É notável que a temperatura de 50°C se sobressai, especialmente ao aprimorar a eficácia do PVM em concentrações mais elevadas, levando a uma notável inibição do crescimento fúngico em contraste com o controle negativo ressaltando uma possível importância da temperatura de 50°C na melhoria da ação do PVM contra o fungo testado.

A hidrólise do copolímero a 60°C se destaca apenas na concentração mais alta, resultando em uma notável redução de 92,91% no crescimento fúngico em comparação com o controle negativo, sendo superada apenas pela temperatura de 50°C. No entanto, apesar de ter demonstrado uma eficácia significativa na concentração mais alta, essa temperatura revelou-se menos eficaz em concentrações mais baixas. Em concentrações de 240; 120 e 60µg/mL, as reduções foram de 69,86%, 40,32% e 34,33%, respectivamente. Vale ressaltar que a concentração de 60µg/mL foi ligeiramente mais eficaz nesta temperatura do que em 50°C, mas as outras concentrações apresentaram um desempenho inferior em comparação com os grupos estudados, com reduções significativamente menores.

**Figura 7-** Análise da influência das diferentes temperaturas de hidrólise do PVM/MA na eficácia de inibição do crescimento do fungo *C.albicans* em diferentes concentrações e temperatura de hidrólise: (A) 25°C; (B) 40°C; (C) 50°C; (D) 60°C.



Fonte: elaborado pela autora.

Em resumo, os resultados destacam o potencial do copolímero PVM/MA hidrolisado como um agente antifúngico eficaz contra *C. albicans*. Especificamente, a temperatura de 50°C demonstrou ser altamente eficaz na

intensificação da ação do PVM/MA, especialmente quando usado em concentrações mais elevadas. Essa pesquisa representa um passo importante na busca por alternativas no combate a infecções por *C. albicans* e destaca o potencial do PVM/MA hidrolisado como uma ferramenta valiosa nesse contexto.

Estudos anteriores também demonstram a eficácia de copolímeros semelhantes em aplicações antimicrobianas. Por exemplo, Nguyen et al. (2022) investigaram a incorporação do copolímero PVM/MA em resina acrílica de polimetilmetacrilato (PMMA) e suas propriedades antibacterianas. Os resultados mostraram que o material composto exibia propriedades antibacterianas aprimoradas, sugerindo um potencial similar ao observado na pesquisa atual.

#### 4.1.2 *S. aureus* x PVM/MA

A interação entre copolímeros e bactérias gram-positivas, que possuem uma parede celular composta por uma única camada de peptidoglicano, necessita de uma descrição abrangente na literatura. Isso ocorre porque o PVM/MA é mais frequentemente empregado como um veículo para compostos antibióticos do que como um agente bactericida por si só. Apesar da falta de informações substanciais, os resultados preliminares obtidos sugerem promissoras possibilidades conforme observado na tabela 2 e figura 8.

Estudos como de Wang *et al.* (2021) examinaram a aplicação de copolímeros na melhoria da resistência de *S. aureus* em materiais biomédicos, destacando a versatilidade desses compostos em diversas aplicações clínicas e sua eficácia na prevenção de infecções.

**Tabela 2** – Crescimento bacteriano da espécie *S. aureus* representado em UFC em concentrações de 480; 240; 120 e 60µg/mL de PVM/MA hidrolisado em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	CN (UFC/mL)	CP (UFC/mL)	480µg (UFC/mL)	240µg (UFC/mL)	120µg (UFC/mL)	60µg (UFC/mL)
25	1089	1	67 *(93%)	208 *(80%)	536 *(50%)	887 *(18%)
40	995	0	67 *(93%)	238 *(76%)	553 *(44%)	897 *(9%)
50	1079	1	79 *(92%)	255 *(76%)	438 *(59%)	715 *(33%)
60	1005	0	86 *(91%)	188 *(81%)	289 *(71%)	335 *(66%)

CP – Controle positivo. CN – Controle negativo.

\*Inibição de crescimento microbiológico (%) em relação ao CN.

Fonte: elaborado pela autora.

Todas as temperaturas demonstraram eficácia na inibição do crescimento bacteriano. No entanto, a temperatura de 60°C se destacou significativamente, resultando em uma redução acentuada das colônias em todas as concentrações.

Nas concentrações mais elevadas de 480µg/mL e 240µg/mL, todas as temperaturas apresentaram uma notável redução em relação ao controle negativo: 93,86% e 80,89% a 25°C, 93,47% e 76,38% a 40°C, 92,67% e 76,40% a 50°C, e por último, 91,45% e 81,39% a 60°C. Para as concentrações mais baixas de 120µg/mL e 60µg/mL, as temperaturas de 25°C, 40°C e 50°C demonstraram não conter a proliferação bacteriana de forma satisfatória, resultando em uma redução de apenas 50,76% e 18,52% a 25°C, 44,92% e 9,85% com hidrólise a 40°C, e 59,49% e 33,75% a 50°C.

Em contrapartida, a temperatura mais alta de 60°C manteve o efeito bactericida em todas as concentrações mantendo uma alta taxa de inibição, incluindo as concentrações de 60µg/mL e 120µg/mL, resultando em uma redução de colônias de 71,94% e 66,17% respectivamente.

Estes resultados indicam que o copolímero hidrolisado apresenta um potencial promissor como agente inibidor do crescimento de *S.aureus* especialmente em temperaturas mais elevadas, com destaque para a eficácia observada a 60°C.

A capacidade deste composto de inibir o crescimento bacteriano de forma dose-dependente ressalta a importância da otimização das concentrações para aplicações específicas, fornecendo uma base sólida para pesquisas futuras que

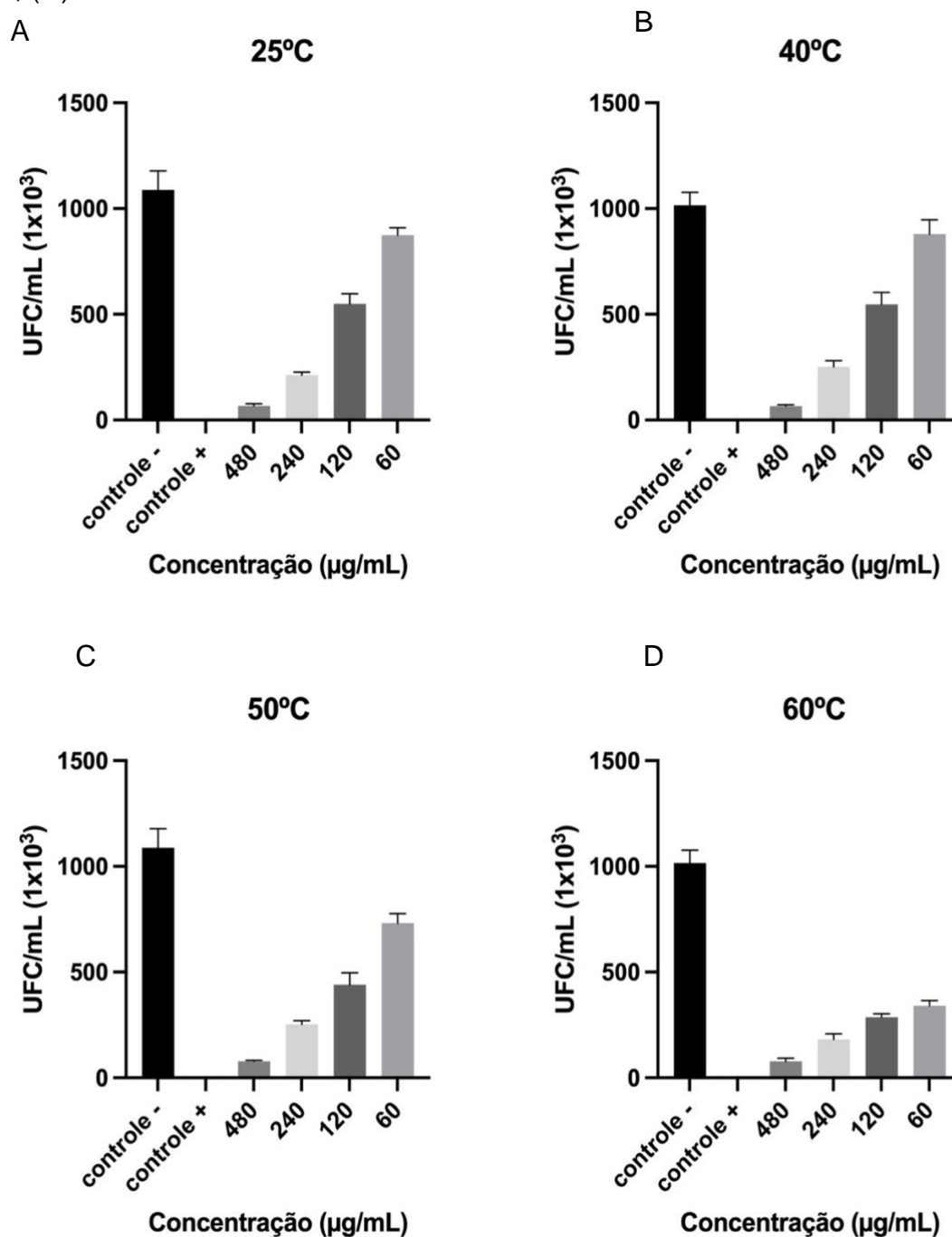
visem explorar ainda mais o potencial do PVM/MA como uma molécula antibacteriana.

Por exemplo, Zhang *et al.* (2022) investigaram copolímeros baseados em polietilenoimina (PEI) e polietilenoglicol (PEG), demonstrando que a incorporação de PEG em PEI pode melhorar a solubilidade e reduzir a citotoxicidade, mantendo atividades antimicrobianas eficazes contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Wang *et al.* (2022) também pesquisaram copolímeros de quitosana e poli(etileno glicol), destacando sua biocompatibilidade e eficácia contra uma ampla gama de microrganismos. Esses avanços sublinham o potencial dos copolímeros como uma classe promissora de materiais antimicrobianos, com aplicações que vão desde dispositivos médicos até revestimentos para superfícies.

Além disso, é importante mencionar que estudos relacionados com uma análise qualitativa e quantitativa (cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC, e espectrometria de massas) dos possíveis subprodutos do PVM/MA que possam se formar a partir da hidrólise do PVM/MA em diferentes temperaturas faz se necessário.

**Figura 8** – Análise da influência das diferentes temperaturas de hidrólise do PVM/MA na eficácia de inibição do crescimento da bactéria *S. aureus* em diferentes concentrações e temperatura de hidrólise: (A) 25°C; (B) 40°C; (C) 50°C; (D) 60°C.



Fonte: elaborado pela autora.

#### 4.1.3 *S. mutans* X PVM/MA

Assim como para *S.aureus*, não existem dados disponíveis na literatura que descrevam a relação do PVM/MA com o *S. mutans*. No entanto, os

resultados indicam uma possível diferença na resposta desta espécie ao PVM/MA em comparação com a bactéria anterior, pois a 25°C o *S. mutans* pareceu ser mais resistente ao copolímero, demonstrando as menores reduções bacterianas (Tabela 3 e Figura 9). As reduções foram de apenas 63,70% para a concentração de 480µg, 61,76% para 240µg, 54,41% para 120µg e apenas 37,50% para a concentração de 60µg.

A temperatura de destaque para esta bactéria sem dúvida é a de 60°C, quando comparada com as outras temperaturas e com a bactéria *S. aureus*. O *S. mutans* apresentou uma redução significativa no número de colônias a 60°C mostrando ser mais sensível aos efeitos do copolímero. As reduções nas concentrações de 480µg e 240µg foram de 95,48% e 92,49% respectivamente, valores consideráveis quando comparados ao controle negativo.

Além disso, as concentrações menores de 120µg e 60µg também apresentaram reduções bacterianas substanciais, atingindo 87,61% e 78,95% respectivamente. Esses resultados são particularmente relevantes no contexto do projeto, já que representam as maiores taxas de redução nas concentrações mais baixas.

Nas temperaturas intermediárias de 40°C e 50°C, os resultados demonstraram eficácia e se aproximaram das observações feitas com *S. aureus*. A 40°C, houve uma redução significativa nas concentrações de PVM/MA, com 92,63% de inibição para 480µg, 73,80% para 240µg, 54,97% para 120µg e 39,56% para 60µg. Quando a temperatura foi elevada para 50°C, a concentração mais alta de 480µg apresentou uma inibição de 95,61%, enquanto 240µg inibiu 76,49%, 120µg obteve 50,40% de redução e 60µg inibiu apenas 35,86% das colônias bacterianas. Esses resultados destacam a influência da temperatura na ação do PVM/MA, evidenciando que temperaturas mais elevadas podem aumentar a eficácia do copolímero na inibição do crescimento de *S. mutans*.

**Tabela 3** – Crescimento bacteriano da espécie *S. mutans* representado em UFC em concentrações de 480; 240; 120 e 60µg/mL de PVM/MA hidrolisado em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	CN (UFC/mL)	CP (UFC/mL)	480µg (UFC/mL)	240µg (UFC/mL)	120µg (UFC/mL)	60µg (UFC/mL)
25	1088	3	395 *(63%)	416 *(61%)	500 *(54%)	680 *(37%)
40	113	4	82 *(92%)	292 *(73%)	501 *(54%)	673 *(39%)
50	1004	3	44 *(95%)	234 *(76%)	498 *(50%)	648 *(35%)
60	1064	0	48 *(95%)	80 *(92%)	132 *(87%)	224 *(78%)

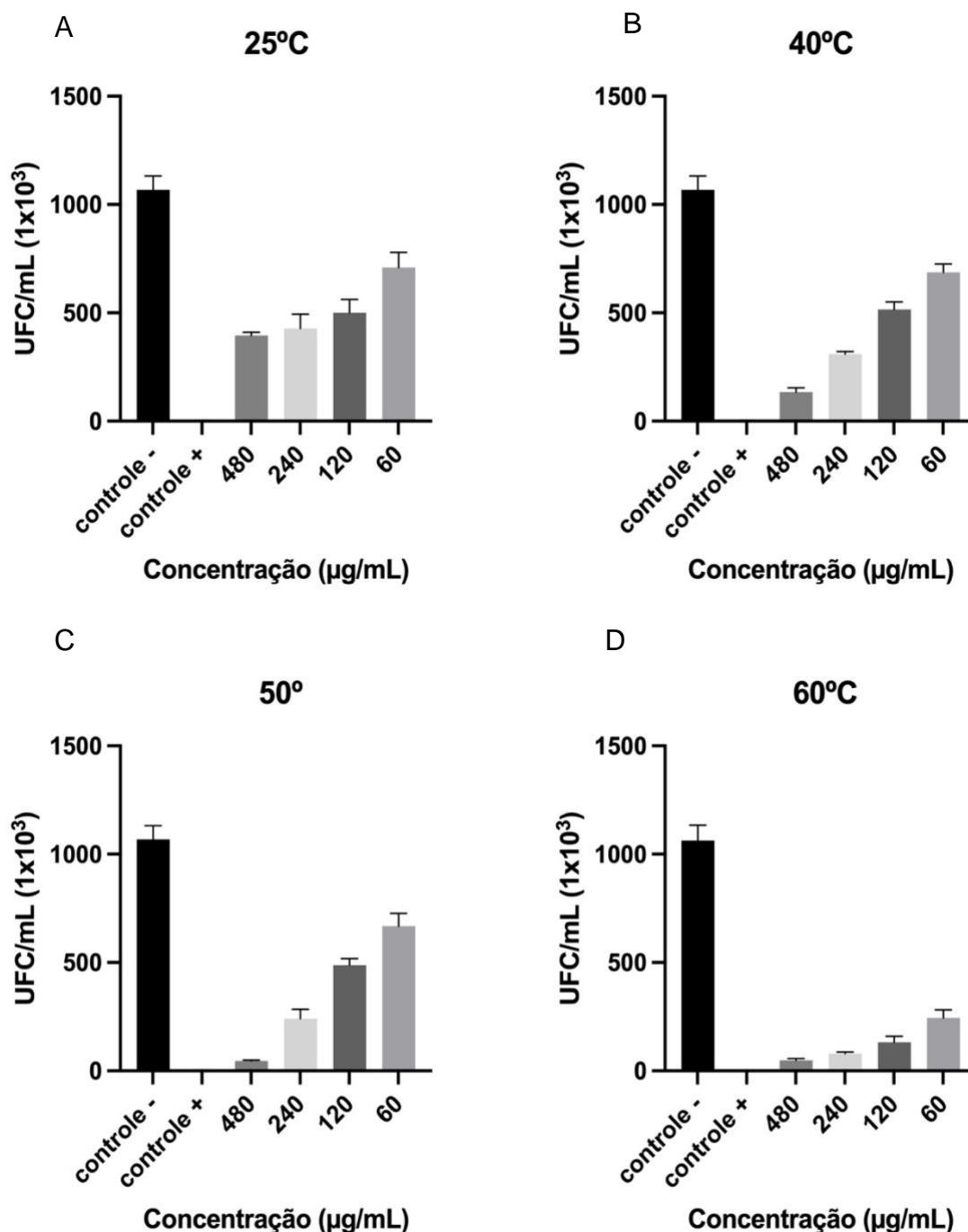
CP – Controle positivo. CN – Controle negativo.

\*Inibição de crescimento microbiológico (%) em relação ao CN.

Fonte: elaborado pela autora.

Os resultados revelam que a sensibilidade bacteriana a esse copolímero varia significativamente com a temperatura de hidrólise. A temperatura de 60°C se destacou como a mais eficaz na redução do crescimento bacteriano, com resultados notáveis em todas as concentrações testadas. Essas descobertas sugerem que o PVM/MA hidrolisado possui potencial como agente inibidor contra bactérias gram-positivas, abrindo portas para várias aplicações, incluindo o desenvolvimento de agentes bactericidas e terapias antimicrobianas. No entanto, é necessário realizar pesquisas adicionais para compreender os mecanismos subjacentes a essa ação e explorar seu potencial em aplicações práticas.

**Figura 9** – Análise da influência das diferentes temperaturas de hidrólise do PVM/MA na eficácia de inibição do crescimento da bactéria *S. mutans* em diferentes concentrações e temperatura de hidrólise: (A) 25°C; (B) 40°C; (C) 50°C; (D) 60°C.



Fonte: elaborado pela autora.

Considerando todos esses resultados e buscando uma compreensão mais profunda, um estudo conduzido por Arthur R. Harrison revelou que uma solução aquosa contendo 10% de PVM/MA, quando submetida a um

aquecimento de 45 minutos a cerca de 100°C, resultou em um pH de 2,0. Esse resultado aponta para a provável criação de um ácido polimérico, o que poderia explicar a redução no crescimento dos micro-organismos, uma vez que esses organismos demonstraram ser sensíveis a interações com substâncias ácidas. Essas descobertas têm o potencial de ter implicações significativas no que diz respeito à aplicação e uso do PVM/MA.

#### 4.2 Integridade de membrana plasmática

O princípio do ensaio de integridade de membrana plasmática baseia-se na avaliação de modificações na permeabilidade e integridade da membrana. Quando as células são expostas ao iodeto de propídio (que não penetra em células viáveis com membranas intactas), quaisquer alterações na membrana permitem que o corante entre na célula. No microscópio de fluorescência, estas células coradas emitem luz, indicando a perda de integridade da membrana. Este método evidencia o impacto do tratamento sobre as células, permitindo a visualização direta de danos na membrana plasmática devido a fatores externos, como exposição a agentes antimicrobianos. Lembrando que estes testes foram feitos com a concentração de PVM/MA de melhor desempenho, ou seja, 480µg/mL.

##### 4.2.1 *C. albicans*

Como podemos observar na Figura 10, o grupo controle negativo, composto por PBS estéril, apresentou menos de 1% de células coradas, confirmando que o PBS não causa danos a membrana. No controle positivo, composto por fluconazol cerca de 100% das células foram permeadas pelo iodeto de propídio, sendo este antifúngico um modelo de mecanismo antimicrobiano que envolve causar danos na integridade da membrana dos micro-organismos.

Baseado nestas informações, nota-se que as células de *C. albicans* tratadas com PVM/MA hidrolisado a 25°C apresentam mínima fluorescência, similar ao controle negativo, sugerindo que a hidrólise do copolímero a esta temperatura não compromete significativamente a integridade da membrana celular. À medida que a temperatura de hidrólise aumenta, nota-se um aumento na

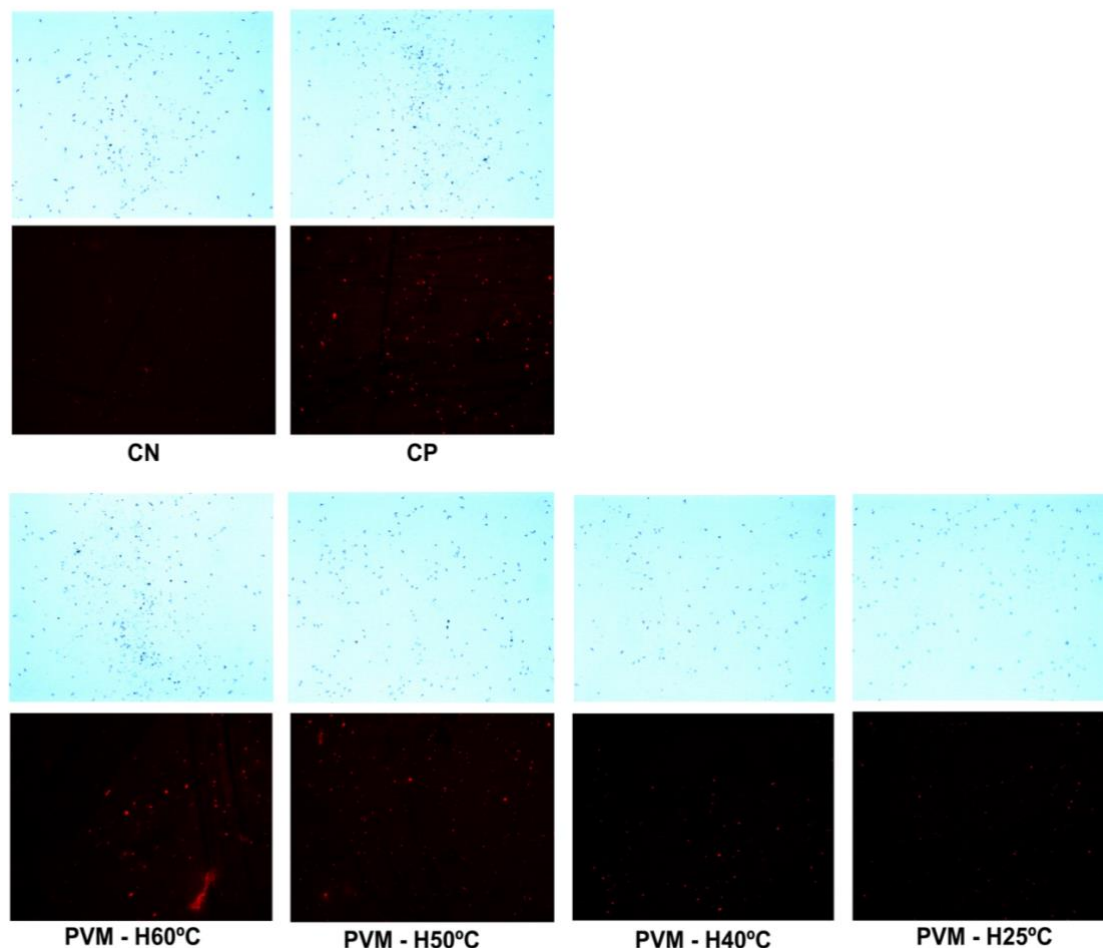
fluorescência vermelha: as células tratadas com PVM/MA a 40°C mostram um aumento moderado na fluorescência, indicando alguma permeabilidade da membrana; a 50°C, observa-se um aumento mais pronunciado na fluorescência vermelha, sugerindo um efeito mais forte em danificar a membrana celular; e a 60°C, as células apresentam a fluorescência mais intensa entre todas as temperaturas testadas, indicando que a hidrólise do copolímero a esta temperatura causa um nível máximo de dano à membrana celular, permitindo uma alta permeabilidade ao corante.

A membrana celular de *C. albicans* é composta por uma bicamada lipídica rica em ergosterol e proteínas de membrana, que desempenham papéis cruciais na manutenção da integridade celular, regulação do transporte de moléculas e sinalização celular. O iodeto de propídio é incapaz de atravessar uma membrana intacta; portanto, a presença de fluorescência indica que a membrana foi comprometida, permitindo a entrada do corante. Os resultados sugerem que o copolímero PVM/MA, quando hidrolisado a temperaturas mais altas, interage de maneira mais eficaz com os componentes lipídicos e proteicos da membrana, resultando em sua desestabilização.

Os resultados indicam uma correlação direta entre a temperatura de hidrólise do PVM/MA e a integridade da membrana celular de *C. albicans*. À medida que a temperatura de hidrólise aumenta, a eficiência do copolímero em comprometer a membrana celular também aumenta. Isso pode ser devido a uma maior quebra das ligações no copolímero em temperaturas mais altas, resultando em fragmentos menores que são mais eficazes em interagir e perturbar a membrana celular.

Em conclusão, a atividade antimicrobiana do PVM/MA contra *C. albicans* é significativamente influenciada pela temperatura de hidrólise. O tratamento a 60°C mostrou o maior comprometimento da integridade da membrana celular, sugerindo que a preparação do copolímero a esta temperatura pode ser a mais eficaz para aplicações que visam danificar membranas celulares de fungos, como no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Essa informação é crucial para otimizar o uso do PVM/MA em aplicações biotecnológicas, ajustando as condições de preparação para obter a máxima eficácia antimicrobiana contra *C. albicans*.

**Figura 10** – Imagens de microscopia de fluorescência referente aos estudos de integridade da membrana plasmática de *C.albicans*, tratadas com PVM/MA em diferentes temperaturas de hidrólise (H), em PBS para controle negativo (CN), fluconazol 10% controle positivo (CP). Coloração com iodeto de propídio (PI,6  $\mu$ M), aumento 400x.



Fonte: elaborado pela autora.

#### 4.2.2 *S. aureus*

As células de *S. aureus* tratadas com PVM/MA hidrolisado a 25°C apresentam mínima fluorescência, similar ao controle negativo, sugerindo que a hidrólise do copolímero a esta temperatura não compromete significativamente a integridade da membrana celular. À medida que a temperatura de hidrólise aumenta, nota-se um aumento na fluorescência vermelha. A 40°C observa-se um leve aumento na fluorescência em comparação ao tratamento a 25°C, indicando alguma permeabilidade da membrana. Isso sugere que a hidrólise a 40°C começa a comprometer a integridade da membrana de *S. aureus*.

Com o PVM/MA hidrolisado a 50°C a fluorescência é mais pronunciada, indicando um efeito mais forte em danificar a membrana celular. As células tratadas a esta temperatura mostram um aumento significativo na permeabilidade da membrana, permitindo a entrada do iodeto de propídio.

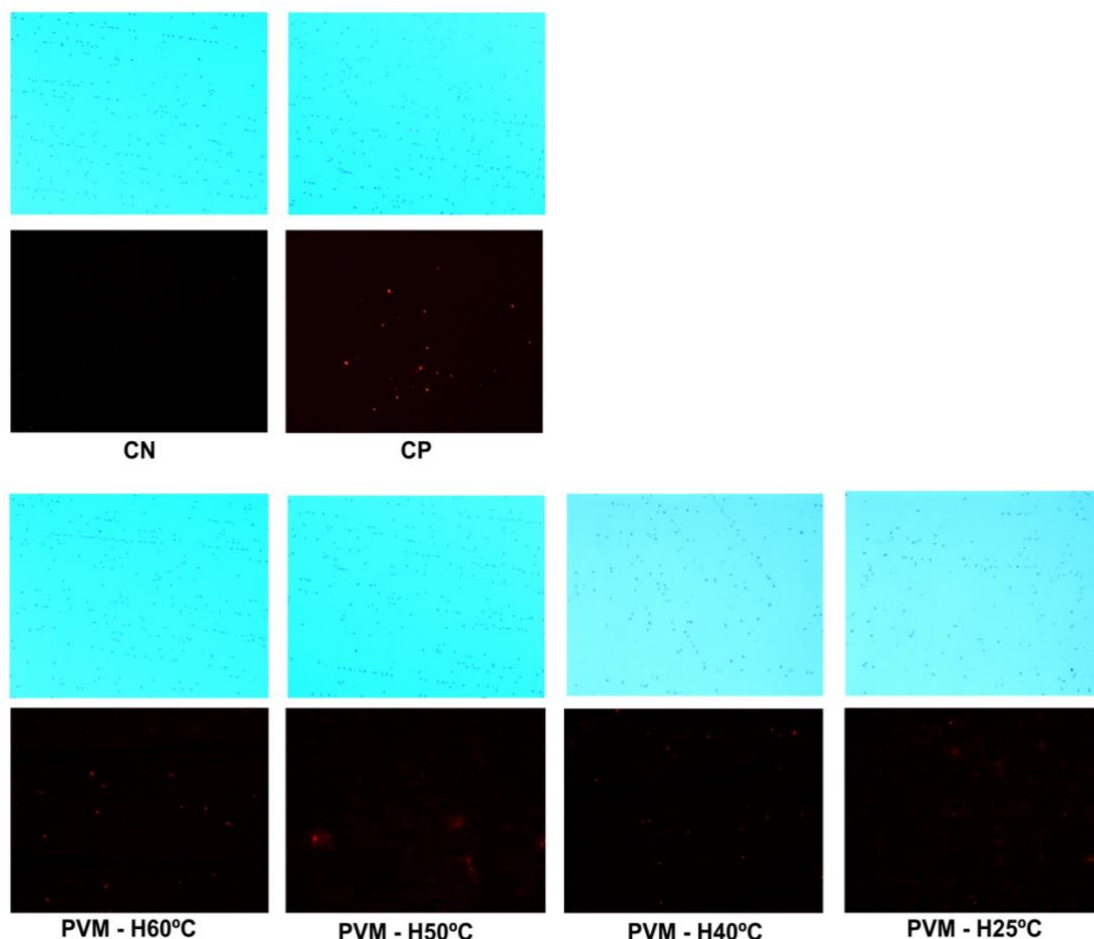
Já no resultado de 60°C as células apresentam a fluorescência mais intensa entre todas as temperaturas testadas, indicando que a hidrólise do copolímero a esta temperatura causa um nível máximo de dano à membrana celular. Isso sugere que a exposição a 60°C resulta na maior desestabilização da membrana celular

A membrana celular de *S. aureus* é composta por uma bicamada lipídica, além de peptidoglicano espesso que confere rigidez e proteção. O iodeto de propídio, incapaz de atravessar uma membrana intacta, indica, por meio da fluorescência, que a membrana foi comprometida, permitindo a entrada do corante. Os resultados sugerem que o copolímero PVM/MA, quando hidrolisado a temperaturas mais altas, interage de maneira mais eficaz com os componentes da membrana, resultando em sua desestabilização.

Os resultados indicam uma correlação direta entre a temperatura de hidrólise do PVM/MA e a integridade da membrana celular. À medida que a temperatura aumenta, a eficiência do copolímero em comprometer a membrana celular também aumenta. Isso pode ser devido a uma maior quebra das ligações no copolímero em temperaturas mais altas, resultando em fragmentos menores que são mais eficazes em interagir e perturbar a membrana celular.

Em conclusão, a atividade antimicrobiana do PVM/MA contra *S. aureus* é significativamente influenciada pela temperatura de hidrólise. O tratamento a 60°C mostrou o maior comprometimento da integridade da membrana celular (Figura 11), sugerindo que a preparação do copolímero a esta temperatura pode ser a mais eficaz para aplicações que visam danificar membranas celulares bacterianas, como no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

**Figura 11** - Imagens de microscopia de fluorescência referente aos estudos de integridade da membrana plasmática de *S.aureus*, tratadas com PVM/MA em diferentes temperaturas de hidrólise (H), em PBS para controle negativo (CN), clorexidina 0,12% controle positivo (CP). Coloração com iodeto de propídio (PI,6  $\mu$ M), aumento 400x.



Fonte: elaborado pela autora.

#### 4.2.3 *S. mutans*

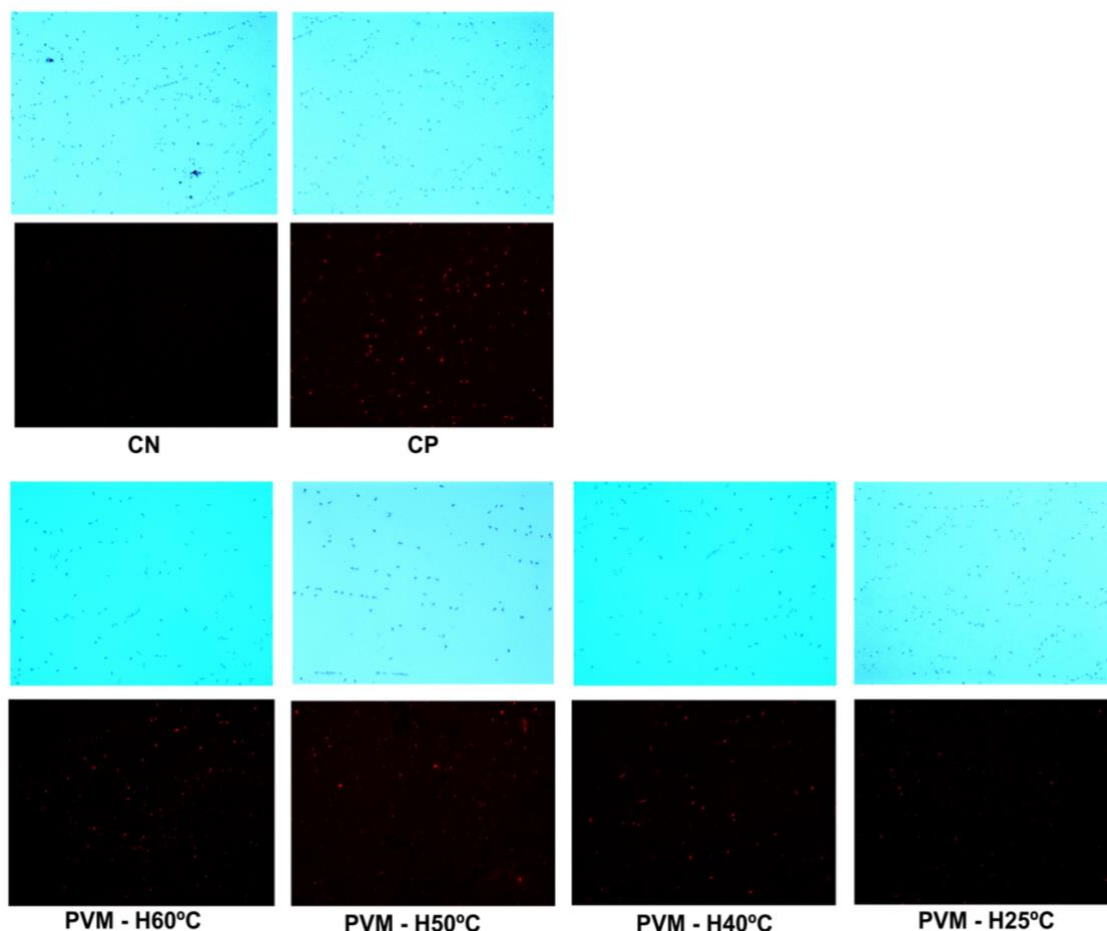
Os resultados da análise da integridade da membrana plasmática das células de *S. mutans* após exposição ao copolímero PVM/MA foram consistentes como os observados para *S. aureus*, assim como mostra a Figura 12. No controle negativo (CN), as células não tratadas não mostraram fluorescência, indicando membranas intactas. No controle positivo (CP), as células exibiram intensa fluorescência vermelha, evidenciando membranas comprometidas.

Para as células tratadas com PVM/MA hidrolisado a 25°C, a fluorescência foi mínima, semelhante ao controle negativo, sugerindo que a integridade da

membrana não foi significativamente afetada. À medida que a temperatura de hidrólise aumentava, observou-se um aumento gradual na fluorescência. No tratamento a 40°C, a fluorescência aumentou ligeiramente, indicando um início de comprometimento da membrana. No tratamento a 50°C, a fluorescência foi mais pronunciada, indicando um maior dano à membrana celular. No tratamento a 60°C, a fluorescência foi a mais intensa, indicando que a hidrólise do copolímero a esta temperatura resultou no maior nível de dano à membrana celular.

Estes resultados indicam que a atividade antimicrobiana do PVM/MA contra *S. mutans* se manteve constante, seguindo o mesmo padrão observado para *S. aureus*. Isso pode ser atribuído à similaridade na estrutura das membranas celulares desses dois micro-organismos, ambos possuindo uma bicamada lipídica e uma camada de peptidoglicano que confere rigidez e proteção. A similaridade na resposta das membranas de *S. mutans* e *S. aureus* ao tratamento com PVM/MA sugere que a eficácia do copolímero em desestabilizar membranas bacterianas é consistente entre diferentes espécies bacterianas com características de membrana semelhantes.

**Figura 12** - Imagens de microscopia de fluorescência referente aos estudos de integridade da membrana plasmática de *S.mutans*, tratadas com PVM/MA em diferentes temperaturas de hidrólise (H), em PBS para controle negativo (CN), clorexidina 0,12% controle positivo (CP). Coloração com iodeto de propídio (PI,6  $\mu$ M), aumento 400x.



Fonte: elaborado pela autora

## Fase B – Testes físico-químicos

### 4.3 Análise físico-química

Os resultados a seguir foram obtidos a partir dos experimentos de DLS e Potencial Zeta em função de diferentes condições do PVM/MA como adição de NaCl e pH. As análises foram interpretadas com o intuito de encontrar uma melhor estabilidade do copolímero e correlacioná-la com os resultados obtidos em estudo microbiológico. Vale ressaltar que devido a característica do copolímero (formado por dois ou mais tipos de monômeros) o seu tamanho pode sofrer variações por decorrência das reações de polimerização, afinidade e

interações entre os monômeros, e das condições que estão presentes (RAY, KALIA, 2017). Além disso, o PVM/MA pode formar agregados em solução, como micelas ou complexos, esses agregados têm um efeito significativo nas medições de tamanho, levando a resultados maiores do que o tamanho molecular real (ALVAREZ, 2004).

A análise do comportamento de hidrólise do copolímero foi analisada através de espectrofotometria, devido à indisponibilidade de utilizar a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) durante o estudo. Esta limitação destaca a necessidade de investigações futuras que explorem mais a fundo a hidrólise do PVM/MA e suas características, utilizando técnicas adicionais, como a HPLC, espectrometria de massas e calorimetria diferencial de varredura (DSC). Essas técnicas avançadas poderão fornecer resultados mais detalhados e precisos, contribuindo para uma compreensão mais abrangente das propriedades e comportamentos do copolímero.

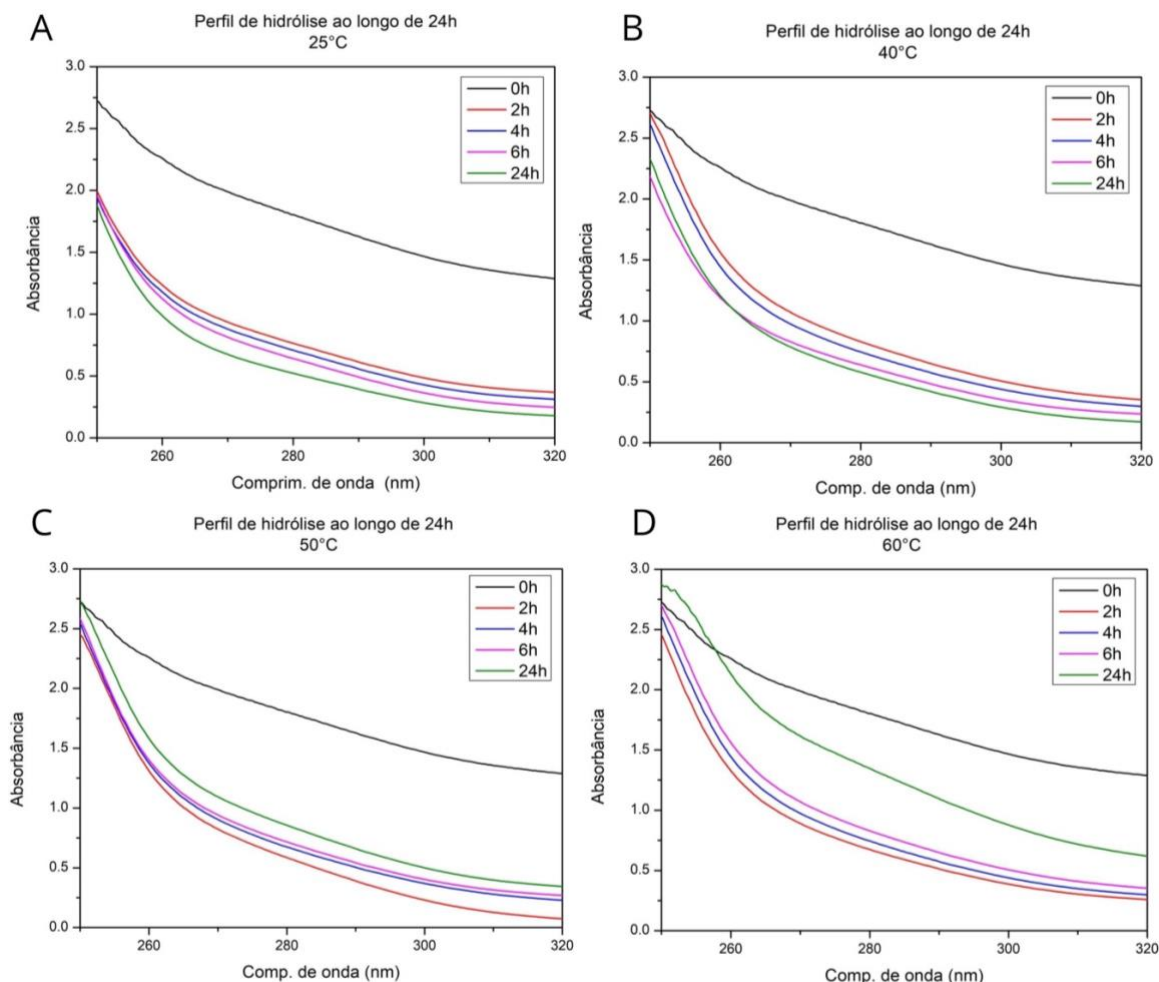
#### 4.3.1 Análise da hidrólise de PVM/MA através de espectrofotometria

Os espectros de absorção ótica apresentados na Figura 13 mostram o perfil de hidrólise ao longo de 24 horas em diferentes valores de temperaturas: 25°C, 40°C, 50°C e 60°C.

Um fato bastante interessante é o de que a absorbância aumenta após 24 horas de hidrólise nas temperaturas de 50 e 60°C. Segundo Khanna, Kuthe e Bhosale (1997), isso ocorre, porque a elevação da temperatura geralmente acelera a taxa de reações químicas. No caso da hidrólise do copolímero, temperaturas mais altas promovem uma maior degradação do material em menor tempo, resultando em produtos de hidrólise que absorvam mais luz em comprimentos de onda específicos.

Além disso, as temperaturas mais altas podem provocar alterações estruturais no copolímero, tornando-o mais suscetível à hidrólise. Isso pode gerar uma maior quantidade de grupos funcionais capazes de absorver luz, aumentando assim a absorbância.

**Figura 13** – Espectros de absorção ótica do copolímero PVM/MA em diferentes valores de temperatura durante o processo de hidrólise: (A) 25°; (B) 40°C; (C) 50°C; (D) 60°. As amostras foram analisadas a cada duas horas, mantendo as condições de temperatura constantes.



Fonte: elaborado pela autora.

Nas temperaturas de 25 e 40°C o comportamento é bastante similar. No tempo 0h o PVM/MA apresenta uma grande contribuição de espalhamento de luz devido a pouca solubilização do PVM/MA. Nos tempos seguintes a intensidade de absorção/espalhamento de luz diminuiu. Já nas temperaturas de 50 e 60°C, após 24h de hidrólise, a intensidade de absorção/espalhamento de luz aumentou, porém permanece menor do que no tempo 0h.

Em geral, para todas as temperaturas analisadas, observa-se um comportamento semelhante na intensidade de absorbância/espalhamento de luz, diminuindo ao longo do tempo. Exceto para a temperatura de 60°C, onde

após 24h de hidrólise a intensidade de absorção aumentou e o perfil espectral se alterou.

De acordo com a literatura, a elevação da temperatura não apenas acelera a reação de hidrólise, mas também pode alterar as propriedades físico-químicas do copolímero. Este efeito é bem documentado por estudos como os de Zhu *et al.* (2019), que demonstraram que o aumento da temperatura pode levar a uma maior fragmentação do copolímero, resultando em produtos de hidrólise que possuem diferentes capacidades de absorção de luz.

Além disso, conforme discutido por Wang *et al.* (2020) em seu estudo sobre a hidrólise de copolímeros sob diferentes condições térmicas, as mudanças na estrutura molecular podem levar a uma variação significativa na intensidade de absorbância. O comportamento observado a 60°C, onde a intensidade de absorção aumenta após 24h, pode ser atribuído à formação de novos grupos funcionais que absorvem luz em determinados comprimentos de onda de luz, como mencionado anteriormente.

Este estudo é corroborado por dados de outros pesquisadores que investigaram a relação entre temperatura e reatividade química em copolímeros. Por exemplo, o trabalho de Fussel *et al.* (2022) destaca que temperaturas mais elevadas podem não apenas acelerar a taxa de hidrólise, mas também modificar a dinâmica de solubilização e interação do copolímero com o meio, afetando assim a sua absorbância.

#### 4.3.2 Estudos por DLS em função da diluição do PVM/MA a 25°C em diferentes valores de pH

A distribuição de tamanho das partículas obtidas por DLS em função dos valores de pH podem ser observadas nos gráficos da Figura 14. Estes gráficos foram obtidos a partir das análises dos dados de DLS em relação ao número de partículas dispersas e por intensidade de espalhamento das partículas espalhadoras. Os estudos foram realizados em diferentes concentrações do copolímero PVM/MA (480, 240 e 120µg/mL) e em diferentes valores de pH.

No gráfico A, correspondente à concentração de 480µg/mL e distribuição em número percentual, observa-se que em pH 9 há um pico pronunciado ao redor de 10nm. Em pH 7 e 5, os picos principais estão situados entre 10 e 100

nm, com tendência a se aproximar de 10nm. Já em pH 3 e em água deionizada, os picos também estão nessa faixa, porém com menores intensidades relativas. No gráfico B, referente à mesma concentração, mas com distribuição em intensidade percentual, observa-se que em pH 9 há um pico ao redor de 10nm, e um outro bastante intenso para partículas maiores de 100nm. Em pH 7 e 5, os picos principais se encontram entre 10 e 100nm. Para pH 3 e água deionizada, os picos são menores e menos definidos, sugerindo uma menor estabilidade das partículas nessas condições.

Para a concentração de 240 $\mu$ g/mL, os gráficos C e D apresentam comportamentos similares aos observados para a concentração mais alta. No gráfico C, em pH 9, o pico principal se mantém ao redor de 10 - 20nm, enquanto em pH 7 e 5, os picos se situam para valores menores que 10nm. Em pH 3 e água deionizada, há uma distribuição mais dispersa e com picos menos pronunciados. No gráfico D, que representa a distribuição em intensidade percentual, os picos seguem a mesma tendência, com uma diminuição da intensidade e alargamento dos picos em valores de pH mais baixos.

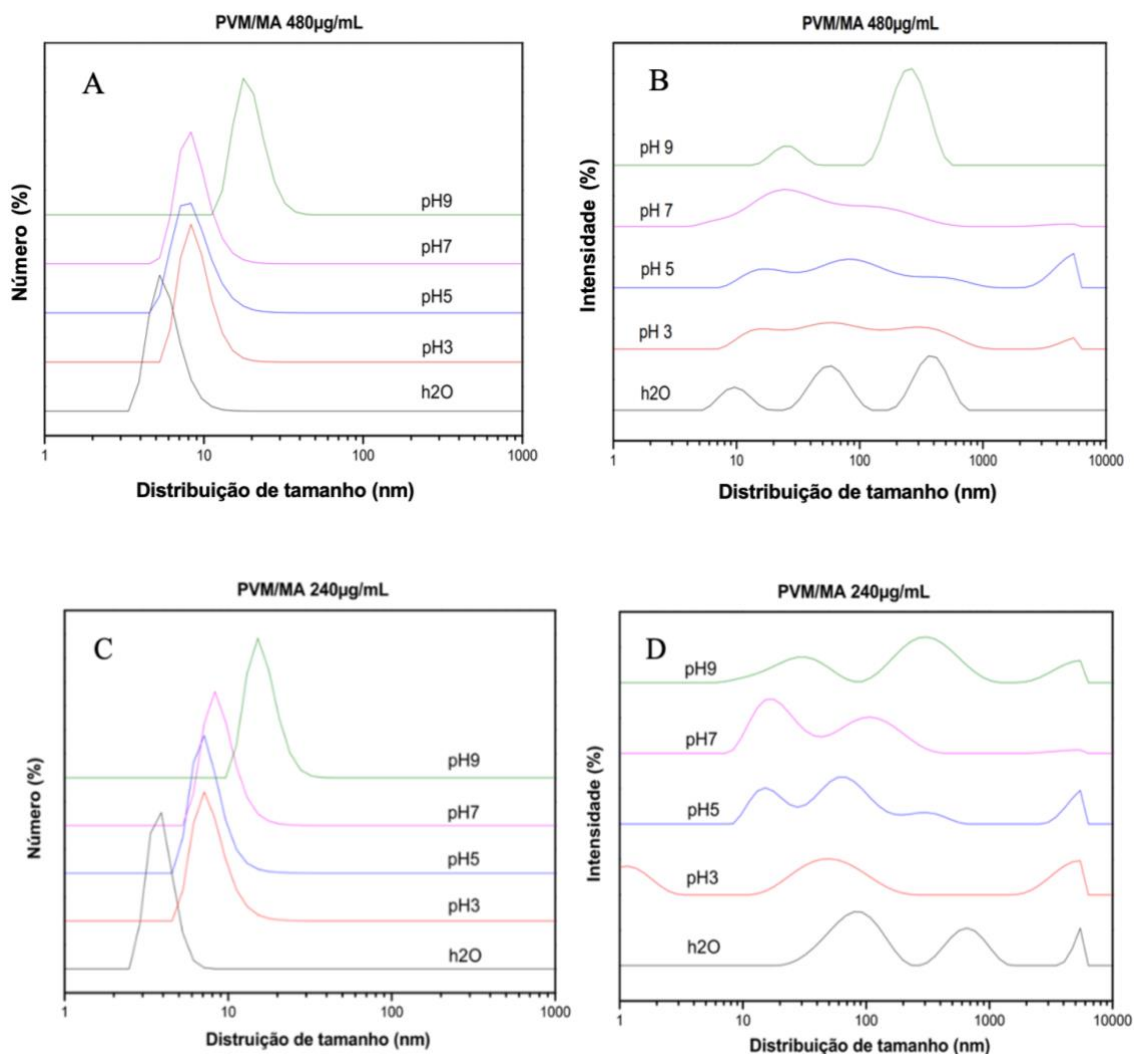
Para a concentração de 120 $\mu$ g/mL, os gráficos E e F mostram que em pH 9 há um pico principal entre 10 e 30nm, tanto em número quanto em intensidade percentual. Porém, na análise por intensidade surge uma contribuição de partículas maiores que 100nm. Em pH 7, 5 e 3, na análise por número de partículas espalhadoras observa uma diminuição do tamanho das partículas com a diminuição do pH.

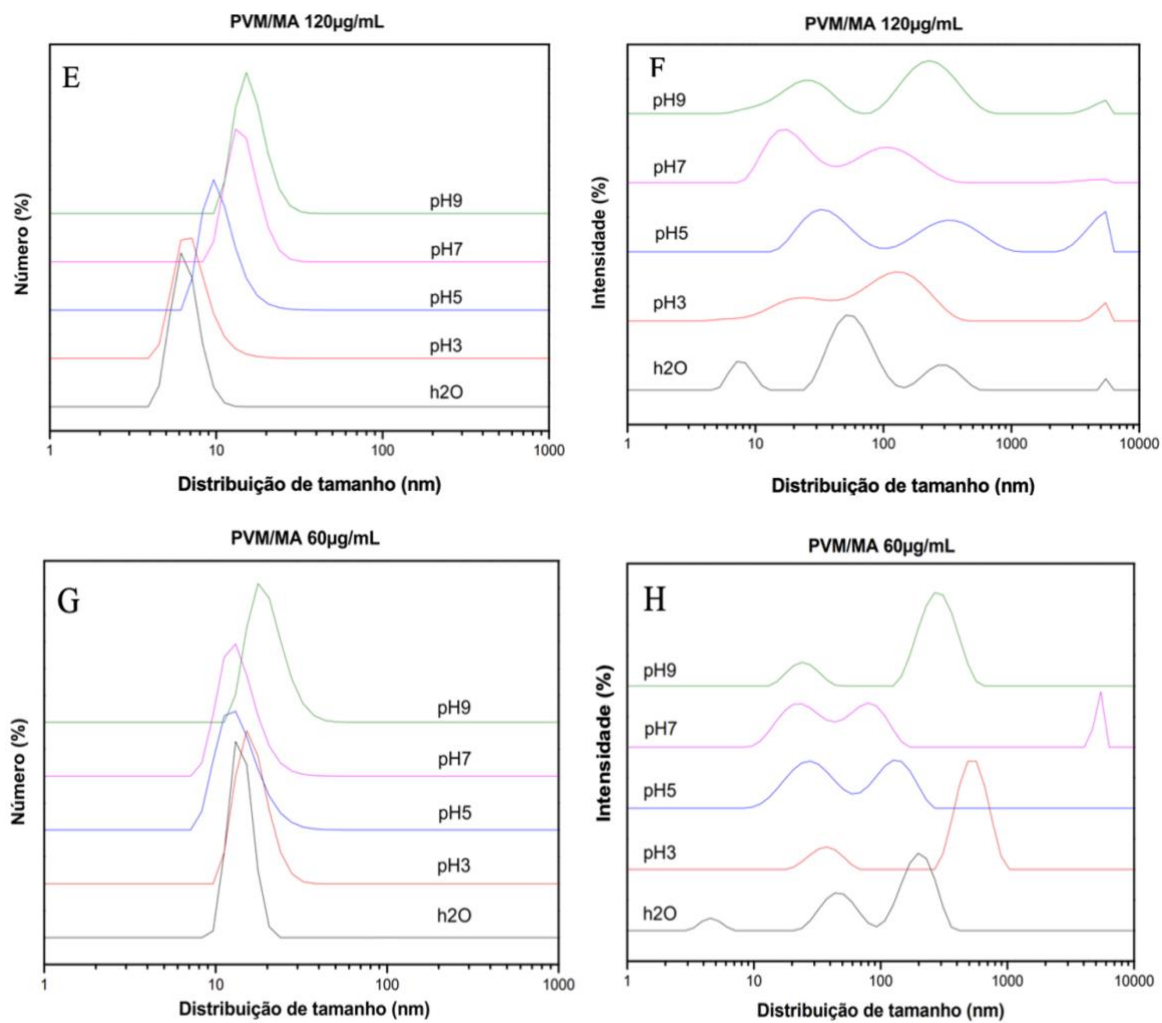
Para a concentração de 60 $\mu$ g/mL, menor concentração analisada, os gráficos G e H revelam um comportamento distinto. Nos valores de pH 7, 5 e 3, e em água, na análise por número de partículas espalhadoras observou-se uma distribuição do tamanho das partículas para a esquerda, indicando tamanhos menores em comparação com os outros ensaios. Em pH 9, o pico dominante está ao redor de 20nm. Na análise por intensidade observa-se que para todos os valores de pH analisados que as contribuições foram mais bem definidas.

Comparativamente, as concentrações mais elevadas (480 a 120 g/mL) do copolímero parecem não afetar significativamente o tamanho das partículas, mas a variação do pH resulta em diferentes tamanhos de partículas. Nota-se que em um meio alcalino com pH 9, a molécula de PVM/MA tende a apresentar um diâmetro hidrodinâmico (Dh) maior em comparação com os demais valores de

pH. A Tabela 4 apresenta de forma sistematizada os resultados apresentados na figura a seguir.

**Figura 14** – Distribuição do tamanho de partículas por análise de número de partículas espalhadoras (A; C; E; G) e por intensidade de espalhamento de partículas espalhadoras (B; D; F; H) em solução tampão acetato-fosfato-borato 30mM nos valores de pH 3; 5; 7; 9 em concentrações de PVM/MA de 480 $\mu$ g/mL (A; B), 240 $\mu$ g (C; D), 120 $\mu$ g (E; F) e 60 $\mu$ g (G; H).





Fonte: elaborado pela autora.

**Tabela 4.** Representatividade de espalhamento de luz dinâmico no sistema (%), coeficiente de difusão e índice de polidispersão de populações obtidas por DLS em concentrações de 480; 240; 120 e 60 $\mu\text{g/mL}$  de PVM/MA em diferentes valores de pH. Os valores indicados foram obtidos através das análises de intensidade e número de partículas espalhadoras.

Concentração	pH	Intensidade		Número		Coeficiente de difusão	Índice de polidispersão
$\mu\text{g/mL}$		(nm)	(%)	(nm)	(%)	$\mu\text{m}^2/\text{s}$	(PDI)
480	9	315,6	82,2	19,77	100	2,89	0,5324
	7	78,54	58,6	11,57	100	5,44	0,3394
	5	128,3	93,1	10,81	100	4,29	0,4947
	3	183,4	74,9	7,18	100	2,559	0,5125
240	9	381,6	59,7	18,25	100	2,169	0,4979
	7	79,87	56,1	12,65	100	15,74	0,4427
	5	67,66	52,45	11,9	100	6,771	0,3061
	3	59,6	51,88	7,1	100	4,184	0,2545
120	9	352,1	56,2	12,35	100	0,792	0,8584
	7	245,5	73,9	9,42	100	0,692	0,6213
	5	189,7	43,3	7,18	100	2,684	0,4753
	3	176,8	100	4,51	100	3,025	0,1672
60	9	346,6	81,7	20,71	100	1,954	0,5003
	7	58,44	52,58	13,04	100	7,487	0,7199
	5	172,6	80,53	11,5	100	7,637	0,5417
	3	395,7	84,38	16,68	100	0,477	0,6935

Fonte: elaborado pela autora

A análise dos resultados obtidos, incluindo o diâmetro das partículas, os valores do índice de polidispersão (PDI), coeficiente de difusão ( $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ) e do Potencial Zeta (que será apresentado abaixo), revela que o sistema PVM/MA se caracteriza como não homogêneo, ou seja, um sistema heterogêneo. A interpretação dos resultados do DLS em sistemas heterogêneos pode ser mais desafiadora, devido à presença de múltiplos picos na distribuição do tamanho das partículas (diferentes populações), refletindo diferentes tamanhos ou conformações dos copolímeros na solução.

Entre as condições investigadas, a faixa de pH 9 foi a que resultou em um maior tamanho de partícula, tanto em termos de intensidade quanto de número, em todas as concentrações avaliadas. Por outro lado, os menores tamanhos foram observados nos valores de pH 3, 5 e 7, especialmente nas concentrações de 120 e 60 $\mu\text{g}$ , respectivamente.

Na análise por intensidade, apesar de todas as amostras apresentarem uma população de partículas acima de 43% com o mesmo tamanho, a amostra do pH 5, na concentração de 480 $\mu\text{g}$ , se destacou por apresentar a maior população, com um tamanho médio de 128,3nm, equivalente a 93,1%. Em contraste, a amostra de também pH 5 com 120 $\mu\text{g}$  mostrou a menor população, caracterizada por um único pico de 189,7nm, correspondendo a apenas 43,3% das partículas. Na análise por número, os diâmetros encontrados para o pH 9 variou entre 12 e 20nm, em pH 7 e 5 o tamanho oscilou entre 7 e 13nm, já no pH 3 esse diâmetro ficou entre 4 e 17nm demonstrando uma maior instabilidade da partícula devido sua alta oscilação.

O PDI pode fornecer informações sobre a variabilidade do tamanho de partículas em sistemas coloidais, quanto menor o valor do PDI mais homogênea é a distribuição de tamanho das moléculas na amostra (DANAIEI *et al.*, 2018). Ainda de acordo com Danaei (2018), um PDI próximo a 0 indica que as partículas na amostra têm tamanhos muito semelhantes, o que leva a observação do PVM/MA como um sistema polidisperso. A faixa de pH 9 é a condição estudada que apresenta o maior PDI (0,8584), enquanto a faixa de pH 3 representa os menores valores (0,1672 e 0,2545).

O coeficiente de difusão é um parâmetro importante na caracterização físico-química pois descreve a taxa na qual as partículas difundem em um meio quantificando a rapidez com que elas se espalham em um fluido, esses valores

podem ser obtidos através da relação de Stokes-Einstein (Equação 1). É notório que o pH pode sim influenciar no comportamento da molécula de PVM/MA, no entanto os resultados obtidos não demonstram com certa clareza uma consistência de dados para chegar em uma conclusão precisa.

Apesar da diluição do PVM/MA apresentar maior estabilidade em determinados valores de pH e das concentrações mais altas manterem o polímero mais estável, é possível considerar que, em água, o copolímero apresenta um tamanho de partícula menor em relação às outras condições.

Portanto, pensando em um uso comercial desta molécula com objetivo antimicrobiológico é interessante que seu tamanho seja ajustado de maneira a facilitar sua entrada na célula alvo. Sendo assim, no ponto de vista biológico a diluição em água pura mostra ser uma forma adequada de preparo da amostra para obtenção de resultados satisfatórios. Concomitantemente, de acordo com os dados de DLS a estabilidade do PVM/MA em água é bastante similar com os dados obtidos na presença de tampão acetato-fosfato-borato 30mM.

#### 4.3.3 Estudos por DLS da diluição de PVM/MA a 25°C e 480µg/mL com adição de NaCl em pH neutro

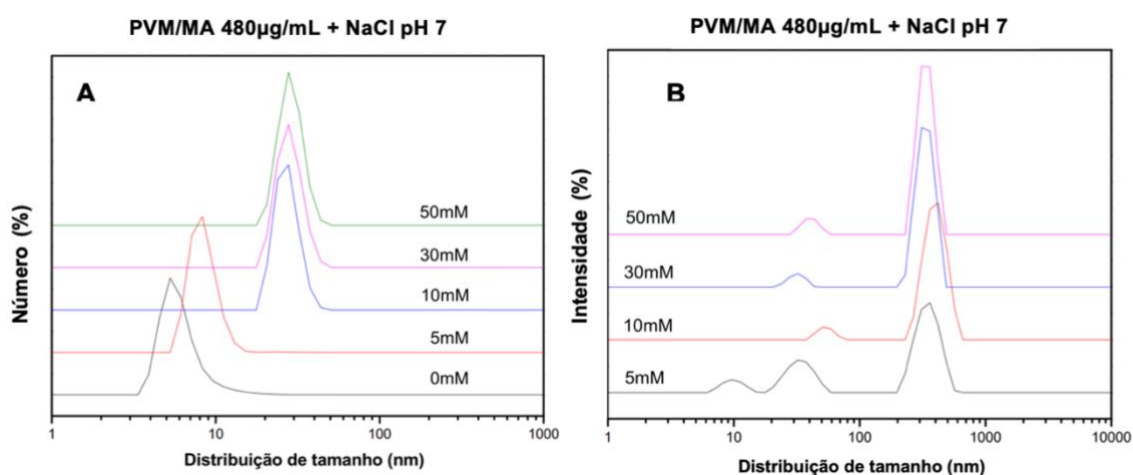
Com o intuito de compreender as nuances do comportamento do copolímero PVM/MA estudos em diferentes ambientes é crucial para o desenvolvimento de novas soluções e avanços científicos. Nesse contexto, os estudos de polímeros em diferentes concentrações de NaCl (cloreto de sódio) se configuram como uma forma para avaliar a estrutura tridimensional dos polímeros, as forças intermoleculares que os governam e os mecanismos que desencadeiam mudanças em suas propriedades física e química.

Assim, avaliar a influência de sal na distribuição de tamanho das partículas do PVM/MA foi adicionado ao meio de hidrólise o NaCl, obtendo-se os dados apresentados na Figura 15. A distribuição de partículas por intensidade de espalhamento de luz das partículas espalhadoras apresentou um comportamento bimodal (com dois picos distintos) na presença de NaCl, exceto para a concentração de 5mM que apresentou um comportamento mais complexo (polimodal/com múltiplos picos).

Na análise por número de partículas dispersas, a presença de NaCl em concentrações de 10 a 50mM favoreceu a formação de partículas com tamanhos

entre 20 e 40 nm. Para concentrações menores de NaCl, como 5mM, o sistema se comportou de maneira similar à ausência de sal, sugerindo que a presença de sal estabiliza a solução polimérica, diminuindo as interações eletrostáticas entre as partículas e, conseqüentemente, reduzindo a agregação. De acordo com Diaz (2008), o NaCl pode melhorar a dispersão das partículas na solução, garantindo que elas não se agreguem ou sedimentem durante a medição, o que justifica os dados da Figura 15 e da Tabela 5.

**Figura 15.** Distribuição do tamanho de partículas por análise de intensidade de espalhamento de partículas espalhadoras (A) e por número de partículas espalhadoras (B) em concentração de PVM/MA 480 $\mu$ g/mL na presença de diferentes concentrações de NaCl a 5; 10; 30 e 50mM em tampão acetato-fosfato-borato 30mM pH 7.



Fonte: elaborado pela autora.

**Tabela 5.** Representatividade de espalhamento de luz dinâmico no sistema (%), coeficiente de difusão e índice de polidispersão de populações obtidas por DLS para o PVM/MA 480µg/mL, tampão acetato-fosfato-borato 30mM pH7, em função da concentração de NaCl. Os valores apresentados foram obtidos por análise de intensidade e número de partículas espalhadoras

Concentração µg/mL	NaCL (mM)	Intensidade (nm)	(%)	Número (nm)	(%)	Coeficiente de difusão µm <sup>2</sup> /s	Índice de polidispersão (PDI)
480	5	374,7	58,77	8,99	100	2,256	0,4163
		38,57	28,38				
	10	360,8	95,55	26,32	100	5,444	0,5541
		86,85	7,82				
	30	321,9	91,35	27,18	100	6,028	0,5820
		48,28	10,38				
50	348,3	87,8	26,92	100	5,826	0,5614	
	47,7	11,4					

Fonte: elaborado pela autora

Considerando a aplicação farmacêutica do copolímero, a presença de NaCl na amostra proporciona maior estabilidade no comportamento e no tamanho das partículas. O uso do sal associado ao PVM/MA pode trazer resultados promissores para ensaios biológicos, embora estes testes específicos ainda não tenham sido realizados.

#### 4.3.4 Análise de Potencial Zeta do PVM/MA 480µg/mL em diferentes valores de pH

O PVM/MA possui uma carga de superfície de partícula negativa em todos os valores pH analisados, assim como mostrado na Tabela 6. Para o pH mais ácido (pH 3) o potencial zeta se mostrou mais próximo do zero (-0,7718 mV), enquanto as faixas de pH 7 e 5 (mais próximos de neutro) manteve um valor de -31,52mV e -39,8mV, respectivamente.

**Tabela 6** – Valores de potencial zeta obtidos por ensaios de hidrólise do PVM/MA 480µg/mL em função de diferentes valores de pH.

pH	9	7	5	3
Potencial Zeta (mV)	-11,6	-31,52	-39,8	-0,7718

Fonte: elaborado pela autora

No pH mais alcalino, representado pelo pH 9, um valor de -11,6 foi observado. Como mencionado anteriormente, valores mais altos tendem diminuir a agregação, enquanto valores mais baixos favorecem a agregação. A carga negativa presente no copolímero o torna uma molécula que pode promover a internalização celular, uma vez que as células frequentemente têm membranas negativas (ARRUDA, 2019). Além disso, segundo Lasic (2001), a carga negativa pode contribuir para a estabilidade coloidal de copolímeros, impedindo que eles se aglomerem devido a forças de repulsão eletrostática entre as partículas, um fato importante para manter a dispersão homogênea em suspensão. Evidenciando que as condições de pH 7 e 5 favorecem a estabilidade do copolímero PVM/MA, minimizando sua agregação.

## 5. Conclusão

Com base em todos os testes e estudos realizados observou-se fortemente que a hidrólise do copolímero PVM/MA a 50 e 60°C possivelmente altera a natureza dos subprodutos formados. Esses subprodutos desempenham um papel crucial na atividade antimicrobiana, apresentando características que permitem uma interação mais efetiva com as paredes celulares de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans*. A formação de subprodutos altamente reativos ou com grupos funcionais específicos pode contribuir significativamente para a desestabilização estrutural e inibição do crescimento dessas células microbianas.

Sendo assim, o controle da temperatura de hidrólise é uma estratégia chave para otimizar a manipulação do copolímero PVM/MA e aprimorar seus resultados antimicrobianos. Com esses resultados, é possível abrir margem para novos estudos e aplicações clínicas deste copolímero. Atualmente, o PVM/MA já é utilizado integrado a formulações pré-existentes em cosméticos e produtos bucais. No entanto, com o avanço desses estudos, torna-se viável desenvolver novos elementos e produtos originais à base apenas de PVM/MA, facilitando a rotina de quem os utiliza no dia a dia e garantindo uma boa estabilidade e eficácia contra os principais micro-organismos patogênicos.

Os estudos de absorção ótica relacionados com a hidrólise do PVM/MA são influenciados pela temperatura, temperaturas mais altas pode acelerar a degradação e alterar a estrutura do copolímero de maneira que novos grupos funcionais podem ser expostos. Todavia, estes resultados preliminares não permitem avançarmos nesta teoria, e futuras investigações sobre as propriedades térmicas e a estabilidade do PVM/MA por técnicas analíticas adicionais como HPLC, espectrometria de massas e DSC para uma caracterização mais aprofundada faz se necessário.

A estabilidade do sistema coloidal do PVM/MA é dependente do pH do meio. Em pH neutro, pH 7, a levemente ácido (pH 5), as partículas apresentam tamanhos menores e mais homogêneos, o que é benéfico para aplicações onde uma distribuição de tamanho uniforme é desejada. Em pH alcalino (pH 9), o aumento no tamanho das partículas e a alta polidispersidade podem limitar a sua eficácia em certas aplicações, mas podem ser explorados em outras onde partículas maiores são necessárias.

A presença de NaCl também demonstrou influenciar a estabilidade do PVM/MA, reduzindo a agregação sucessiva e estabilizando a solução polimérica. Estes achados sugerem que a manipulação do pH e da concentração de sal pode ser uma estratégia eficaz para controlar as propriedades coloidais do PVM/MA, tornando-o adequado para uma variedade de aplicações biotecnológicas e farmacêuticas.

No contexto da aplicação farmacêutica, a capacidade de ajustar o tamanho das partículas e a estabilidade do PVM/MA através da modificação do pH e da adição de sal é promissora. No entanto, estudos adicionais são necessários para avaliar o desempenho biológico do copolímero nessas condições, incluindo testes de eficácia antimicrobiana e biocompatibilidade, para validar seu potencial uso clínico.

A investigação detalhada sobre a hidrólise do copolímero PVM/MA revelou que a presença de NaCl em diferentes concentrações influencia significativamente o comportamento coloidal do sistema. Observou-se que a adição de 5mM de NaCl resultou em uma maior variabilidade no tamanho das partículas. Esse comportamento sugere que as concentrações menores de NaCl não são suficientes para estabilizar completamente a solução polimérica,

permitindo interações eletrostáticas e, conseqüentemente, maior agregação das partículas.

Em contrapartida, concentrações de NaCl entre 10 e 50mM demonstraram uma melhor organização do sistema coloidal, com tamanhos de partículas mais uniformes e menor polidispersidade. Este comportamento está correlacionado com a capacidade do NaCl em reduzir as interações eletrostáticas entre as partículas, promovendo uma estrutura coloidal mais estável e homogênea.

Esses resultados são particularmente relevantes no contexto das aplicações farmacêuticas do copolímero PVM/MA. A estabilidade coloidal é um fator crítico na formulação de medicamentos, pois influencia diretamente a biodisponibilidade e a eficácia terapêutica dos compostos. A presença de NaCl na formulação do PVM/MA pode, portanto, melhorar a estabilidade e a consistência do tamanho das partículas, resultando em melhores resultados clínicos.

Concluindo, os resultados indicam que o copolímero PVM/MA exibe uma dependência significativa do pH e da presença de NaCl em suas propriedades coloidais, com menores tamanhos de partícula e maior estabilidade em pH neutro (pH 7) a levemente ácido (pH 5). Além disso, o copolímero demonstrou eficácia antimicrobiana contra *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans*. A manipulação dessas condições pode otimizar sua aplicação em sistemas de liberação de fármacos e outras aplicações biomédicas, ressaltando a necessidade de estudos adicionais para validar seu desempenho biológico e clínico.

## 6. Referências Bibliográficas

KOULENTI, D.; SONG, A.; ELLINGBOE, A.; ABDUL-AZIZ, M. H.; HARRIS, P.; GAVEY, E.; LIPMAN, J. **Infections by multidrug-resistant Gram-negative Bacteria: what's new in our arsenal and what's in the pipeline?** *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 53, n. 3, p. 211-224, mar. 2019. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.10.011. Epub 2018 Oct 27. PMID: 30394301

MEGRAN, D.; TAIB, N.; WITWINOWSKI, J.; BELOIN, C.; GRIBALDO, S. **One or two membranes? Diderm Firmicutes challenge the Gram-positive/Gram-negative divide.** *Molecular Microbiology*, v. 113, n. 3, p. 659-671, mar. 2020. DOI: 10.1111/mmi.14469. PMID: 31975449.

OSMAKOVA, A.; KIRPICHNIKOV, M.; POPOV, V. **Recent biotechnology developments and trends in the Russian Federation**. *New Biotechnology*, v. 40, Pt A, p. 76-81, 25 jan. 2018. DOI: 10.1016/j.nbt.2017.06.001.

CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. **Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus***. *Virulence*, v. 12, n. 1, p. 547-569, dez. 2021. DOI: 10.1080/21505594.2021.1878688. PMID: 33522395; PMCID: PMC7872022.

KAMARUZZAMAN, N. F.; *et al.* **Antimicrobial Polymers: The Potential Replacement of Existing Antibiotics**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 11, p. 2747, 4 jun. 2019.

POULAIN, D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 208-217, jun. 2015. DOI: 10.3109/1040841X.2013.813904. Epub 2013 Aug 20. PMID: 23962107

HOF, H. Pilze im Darm – das Mykobiom des Darms [Fungi in the gut - the gut mycobiome. **Zeitschrift für Gastroenterologie**, v. 55, n. 8, p. 772-778, ago. 2017. DOI: 10.1055/s-0043-112657. Epub 2017 Aug 10. PMID: 28799153.

SCHELER, O.; POSTEK, W.; GARSTECKI, P. **Recent developments of microfluidics as a tool for biotechnology and microbiology**. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 55, p. 60-67, fev. 2019. DOI: 10.1016/j.copbio.2018.08.004. Epub 2018 Aug 30. PMID: 30172910.

HUNTER, R. J. **Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications**. London: Academic Press, 1981. 386 p. (Colloid Science, v. 2)

KLEVENS, R. M.; *et al.* **Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States**. *JAMA*, v. 298, n. 15, p. 1763–1771, 2007. doi:10.1001/jama.298.15.1763.

CAO, Y.; LIN, H. Characterization and function of membrane vesicles in Gram-positive bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 5, p. 1795-1801, mar. 2021. DOI: 10.1007/s00253-021-11140-1.

WANG, H., Li, J., & ZHANG, L. (2020). **Thermal behavior and hydrolytic stability of copolymers in different environments**. *Polymer Degradation and Stability*, 179, 109-118.

DANAEI, M.; DEHGHANKHOLD, M.; ATAEI, S.; HASANZADEH DAVARANI, F.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KHORASANI, S.; MOZAFARI, M. R. **Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems**. *Pharmaceutics*, v. 10, n. 2, p. 57, 18 mai. 2018.

FUSSELL, S. L.; KING, S. M.; ROYALL, C. P.; VAN DUIJNEVELDT, J. S. **Oxidative degradation of triblock-copolymer surfactant and its effects on self-assembly.** *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 606, Pt 2, p. 953-960, 15 jan. 2022

ZHU, Y.; POMA, A.; RIZZELLO, L.; GOUVEIA, V. M.; RUIZ-PEREZ, L.; BATTAGLIA, G.; WILLIAMS, C. K. **Metabolically Active, Fully Hydrolysable Polymersomes.** *Angewandte Chemie International Edition in English*, v. 58, n. 14, p. 4581-4586, 26 mar. 2019.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; STAHL, D. P.; BUCKLEY, D. H. **Brock Biology of Microorganisms.** 15. ed. Boston: Pearson, 2018.

LEE, Cheol Min; CHO, Eun-Min; YANG, Sung Ik; GANBOLD, Erdene-Ochir; JUN, Jehoon; CHO, Kwang-Hwi. **Raman Spectroscopy and Density Functional Theory Calculations of  $\beta$ -Glucans and Chitins in Fungal Cell Walls.** *Bulletin of the Korean Chemical Society*, v. 34, n. 3, p. 943, 2013.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. **MRSA: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus.** In: LIU, X. *et al.* **MRSA: Mechanisms of Resistance and Therapeutic Approaches.** Springer, 2020.

NGUYEN, A.; YE, L.; HAO, J.; KOO, H.; MANTE, F.; OZER, F. **Antibacterial and Physical Properties of PVM/MA Copolymer-Incorporated Polymethyl Methacrylate as a Novel Antimicrobial Acrylic Resin Material.** *Journal of Applied Polymer Science*, 139(4), p. 516-525, 2022.

KWIECINSKI, J. M.; HORSWILL, A. R. **Staphylococcus aureus bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms.** *Current Opinion in Microbiology*, v. 53, p. 51-60, fev. 2020. DOI: 10.1016/j.mib.2020.02.005. Epub 2020 Mar 12.

SENJO, A.; OTEO-IGLESIAS, J.; ALÓS, J. I. **What's new in mechanisms of antibiotic resistance in bacteria of clinical origin?** *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (English Edition)*, v. 39, n. 6, p. 291-299, jun.-jul. 2021. DOI: 10.1016/j.eimce.2020.02.017

HALLEN-ADAMS, H. E.; SUHR, M. J. **Fungi in the healthy human gastrointestinal tract.** *Virulence*, v. 8, n. 3, p. 352-358, 3 abr. 2017. DOI: 10.1080/21505594.2016.1247140. Epub 2016 Oct 13.

VENTOLA, C. L. **The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats.** *Pharmacy and Therapeutics*, v. 40, n. 4, p. 277-283, 2015.

WANG, Y. **Looking into *Candida albicans* infection, host response, and antifungal strategies.** *Virulence*, v. 6, n. 4, p. 307-308, 2015. DOI: 10.1080/21505594.2014.1000752. Epub 2015 Jan 15. PMID: 25590793; PMCID: PMC4601349.

DAVIES, R. M. **The clinical efficacy of triclosan/copolymer and other common therapeutic approaches to periodontal health.** *Clinical Microbiology and Infection*, v. 13, Suppl 4, p. 25-29, out. 2007.

BONARTSEV, A. P.; VOINOVA, V. V.; VOLKOV, A. V.; MURAEV, A. A.; BOYKO, E. M.; VENEDIKTOV, A. A.; DIDENKO, N. N.; DOLGALEV, A. A. **Scaffolds Based on Poly(3-Hydroxybutyrate) and Its Copolymers for Bone Tissue Engineering (Review).** *Sovremennyye Tekhnologii v Meditsine*, v. 14, n. 5, p. 78-90, 2022

BAKER, J. L.; FAUSTOFERRI, R. C.; QUIVEY, R. G. **Acid-adaptive mechanisms of *Streptococcus mutans*-the more we know, the more we don't.** *Molecular Oral Microbiology*, v. 32, n. 2, p. 107–117, 21 jun. 2016.

BOWEN, W. H.; *et al.* **Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments.** *Trends in Microbiology*, v. 26, n. 3, p. 229–242, mar. 2018.

MURRAY, B. S.; JACKSON, A. W.; MAHON, C. S.; FULTON, D. A. **Reactive thermoresponsive copolymer scaffolds.** *Chemical Communications (Cambridge)*, v. 46, n. 45, p. 8651-8653, 7 dez. 2010. DOI: 10.1039/c0cc03856c. Epub 2010 Oct 18. PMID: 20957257.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. **Virulence factors of *Candida albicans*.** *Trends in Microbiology*, v. 9, n. 7, p. 327-335, 2002.

LAI, C.; NGUYEN, A.; YE, L.; HAO, J.; KOO, H.; MANTE, F.; OZER, F. **Antibacterial and Physical Properties of PVM/MA Copolymer-Incorporated Polymethyl Methacrylate as a Novel Antimicrobial Acrylic Resin Material.** *Molecules*, v. 27, n. 24, p. 8848, 13 dez. 2022.

LIU, W.; FENG, Z.; OU-YANG, W.; PAN, X.; WANG, X.; HUANG, P.; ZHANG, C.; KONG, D.; WANG, W. **3D printing of implantable elastic PLCL copolymer scaffolds.** *Soft Matter*, v. 16, n. 8, p. 2141-2148, 26 fev. 2020.

RAY, S.; KALIA, V. C. **Microbial Cometabolism and Polyhydroxyalkanoate Co-polymers.** *Indian Journal of Microbiology*, v. 57, n. 1, p. 39-47, mar. 2017. doi: 10.1007/s12088-016-0622-4. Epub 2016 Sep 28. PMID: 28148978; PMCID: PMC5243247.

GANASSIN, R.; *et al.* **Nanocapsules for the co-delivery of selol and doxorubicin to breast adenocarcinoma 4T1 cells in vitro**, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, v. 46, n. 8, p. 567-589, 2018.

LEÓN-RODRIGUEZ, L.; LEIRO-VIDAL, J.; BLANCO-MÉNDEZ, J.; LUZARDO-ÁLVAREZ, A. **Incorporation of PVMMA to PLGA MS enhances lectin grafting and their in vitro activity in macrophages**. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 402, n. 1-2, p. 165-174, 15 dez. 2010.

HUEMER, M.; *et al.* **Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives**. *EMBO reports*, v. 21, n. 12, 3 dez. 2020.

HU, J. **Toughening and Shape Memory Effect on PLA/Copolymers Blends Produced by Simultaneous Dynamic Vulcanization and Reactive Compatibilization**. *Shape Memory and Superelasticity*, v. 4, n. 2, p. 112-130, 2022.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. **Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms**. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DE ARRUDA, C. N. F.; SALLES, M. M.; BADARÓ, M. M.; DE CÁSSIA, O. V.; MACEDO, A. P.; SILVA-LOVATO, C. H.; PARANHOS, H. de F. O. **Effect of sodium hypochlorite and Ricinus communis solutions on control of denture biofilm: a randomized crossover clinical trial**. *Journal of Prosthetic Dentistry*, v. 117, n. 6, p. 729-734, 2017.

KIZALOGLU, A.; KILICAY, E.; KARAHALIOGLU, Z.; HAZER, B.; DENKBAS, E. B. **Preparation of chitosan membrane improved with nanoparticles based on unsaturated fatty acid for use in cancer-related infections**. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 35, n. 4-5, p. 328-350, 2020.