

# **Novos materiais poliméricos antimicrobianos: explorando as relações entre estrutura molecular e atividade**

Aluna: Líliam Carmo de Castro

Orientador: Prof. Dr. Fábio Herbst Florenzano

Projeto apresentado para seleção de doutorado

de Engenharia de Materiais – USP

Lorena

2022

# **Novos materiais poliméricos antimicrobianos: explorando as relações entre estrutura molecular e atividade**

## **1. Introdução**

Nos últimos anos o mundo vem vivendo um cenário de disseminação de SARS-Cov-2 e a evolução rápida de variantes que escapam à resposta imune. No cenário atual, de Pandemia, é necessário dar uma atenção especial à proliferação do vírus da COVID e suas variantes. Os ambientes hospitalares, consultórios médicos e odontológicos, embalagens alimentares, dentre outros materiais do cotidiano são de alto risco de contaminação, o que tem gerado várias infecções e doenças graves, sejam elas virais ou bacterianas. O uso de inúmeros tipos de desinfetantes como hipoclorito, peróxido, compostos de amônio quaternário, cloroxedina, dentre outros, foram testados, mas são de curta permanência nas superfícies e alguns de prejuízo ambiental considerável. Isso tudo reforça a urgência na geração de objetos que levem a dimensão da segurança sanitária e de equipamentos mais eficazes que sejam capazes de reduzir a contaminação microbiana em situações específicas.<sup>1</sup>

Materiais poliméricos antimicrobianos que apresentam essa ação por contato (sem a necessidade de adentrar as células) são uma importante opção, podendo ser úteis em inúmeras situações, inclusive imobilizados em superfícies plásticas, metálicas, em tecidos para máscaras ou mesmo em próteses.<sup>2</sup> Devido às suas propriedades antimicrobianas são extremamente eficientes para serem empregados em todos os campos no cotidiano. <sup>3</sup>

Na atualidade, ferramentas avançadas para síntese de polímeros abrem uma janela de oportunidade para a geração de materiais antimicrobianos com

alta eficiência e eficácia. Variantes do método hoje chamado Polimerização por Desativação Reversível de Radicais (PDRR), como a *Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer*, RAFT <sup>4,5</sup>, podem contribuir para a obtenção de polímeros antimicrobianos por permitirem o controle dos parâmetros estruturais, usando-se diferentes unidades repetitivas. Dessa forma, torna-se possível o estudo e a determinação de relações empíricas entre estrutura e essa propriedade, um campo ainda em aberto, mas que pode melhorar em muito a eficiência desses materiais.

Polímeros (copolímeros incluídos) de natureza diversa têm mostrado atividade antimicrobiana. Suas características, como a hidrofiliicidade ou sua massa molar média irão influenciar diretamente na ação final no microorganismo.<sup>3</sup> Devido a isso, estudos podem ser realizados para gerar novas estruturas poliméricas no intuito de ajustar e melhorar a atividade antimicrobiana.<sup>2</sup> Aqueles com carga residual positiva são conhecidos por seus efeitos bactericidas.<sup>6</sup> Alguns com carga negativa apresentam, por sua vez, atividade antiviral.<sup>7</sup> Porém, embora existam inúmeros materiais poliméricos antimicrobianos, a maioria são catiônicos com grupos de nitrogênio; polímeros que mimetizam peptídeos naturais; polímeros de halogênio; derivados de quitosana; e nanocompósitos de prata e titânio.<sup>2</sup> O ajuste dos parâmetros estruturais que determinam essa atividade, novas estruturas ou novos mecanismos de ação para ajustar sua potência e toxicidade, são de grande interesse para a área e podem levar a novos materiais muito mais úteis e eficientes.<sup>2</sup>

Estudos mostram que alguns fatores como massa molar média, comprimento das cadeias laterais, hidrofiliicidade, e fatores ambientais como o

pH e a temperatura, podem influenciar na atividade desses polímeros antimicrobianos.<sup>1</sup>

Com o uso de métodos contemporâneos de síntese, a estrutura do material polimérico pode ser modificada, mediante planejamento, para gerar polímeros mais eficazes como antimicrobianos. Mas o *design* da estrutura polimérica pode ir além. Pode-se incorporar à cadeia polimérica grupos, não para aumentar sua capacidade antimicrobiana, mas para, por exemplo, permitir sua adesão a uma superfície em particular, adequar a solubilidade ou outras<sup>8</sup>. Não se trata, então, apenas de otimizar a capacidade intrínseca de inativação de patógenos, mas também de melhorar a aplicabilidade desses materiais em situações reais.

Inúmeras tentativas têm sido realizadas com sucesso na síntese de materiais poliméricos bactericidas<sup>6</sup>. Dois tipos fundamentais de abordagem costumam ser usadas<sup>3</sup>:

- a) Adição de agentes antimicrobianos a cadeias poliméricas com intuito de melhorar propriedades farmacocinéticas e outras;
- b) Materiais poliméricos com ação antimicrobiana intrínseca.

Com relação à abordagem a), antibióticos podem ser ligados às cadeias poliméricas, geralmente por ligações (bio)lábeis, permitindo que esses agentes sejam liberados paulatinamente com melhor perfil farmacocinético ou ainda maximizando seu efeito local<sup>9</sup>. Essa abordagem não será objeto desta proposta.

Em relação à b), existem inúmeros exemplos de sucesso na síntese de materiais poliméricos que, ainda que tenham uma estrutura razoavelmente simples, apresentam atividade antimicrobiana *per se*<sup>1,10,11,12</sup>.

Em linhas gerais, polímeros que apresentam atividade microbicida intrínseca atuam na superfície do patógeno<sup>6</sup>. Sendo assim, as interações entre o material e a superfície da célula (parede celular, membrana plasmática, envelope, por exemplo) são de importância fundamental, tanto para ligação à essa superfície quanto para uma possível desestabilização da célula e sua desativação/morte.

Combinações de unidades repetitivas com diferentes cargas, polaridade e funções químicas podem levar a materiais poliméricos otimizados quanto à capacidade de desativação de vírus, bactérias e outros patógenos, por exemplo por terem mais afinidade pela parede, envelope ou membrana celular. Adicionalmente, blocos podem ser inseridos na estrutura polimérica para emprestar outras propriedades ao material como por exemplo a capacidade de aderir a uma superfície<sup>8</sup> ou formar um agregado supramolecular em meio aquoso<sup>13</sup>.

Um bom exemplo da potencialidade dessa estratégia pode ser ilustrado pela referência 14. Nesse trabalho usou-se a chamada *Photoinduced Electron Transfer–Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer Polymerization*, PET-RAFT, e a técnica de semibatelada para gerar uma biblioteca de copolímeros com diferentes composições e estruturas a partir de 3 unidades repetitivas (catiônica, hidrofóbica e hidrofílica neutra) razoavelmente simples. Foi possível demonstrar que tanto a composição como o padrão de distribuição das mesmas unidades repetitivas ao longo da cadeia foram importantes para a atividade antibacteriana e que esta depende da bactéria estudada. Ou seja, não apenas a quantidade de cada unidade na cadeia foi importante, mas também a forma de distribuição dessas unidades. Isso reforça a importância da estrutura

do material polimérico (não apenas sua composição) na propriedade antimicrobiana. Até um copolímero com ação específica contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria com importante potencial patogênico e relevância sanitária, foi identificado a partir da combinação de unidades repetitivas de forma particular.

No mesmo trabalho<sup>14</sup>, a capacidade hemolítica dos materiais também foi estudada, permitindo então correlacionar a estrutura com um parâmetro relacionado à biocompatibilidade e possível toxicidade. Esse estudo demonstra que é possível modular a atividade antibacteriana e a atividade hemolítica simplesmente mudando a proporção e o arranjo das mesmas unidades repetitivas ao longo das cadeias.

No presente trabalho, a RAFT será usada para gerar e estudar sistematicamente (co)polímeros com propriedades antimicrobianas (bactérias e vírus) buscando aumentar seu desempenho e sobretudo se conhecer os parâmetros que controlam essa ação, além de seu peso relativo nessa relação. Aqui a composição, a massa molar e a arquitetura de (copolímeros) com diferentes unidades repetitivas (cargas negativa, neutra ou positiva em pH fisiológico) serão sistematicamente estudadas para se isolar aquelas que mais influenciam na capacidade antimicrobiana (antibacteriana e antiviral), permitindo então a geração de polímeros que tenham essa propriedade otimizada. Outras propriedades dos materiais também serão exploradas, como a capacidade de adesão a superfícies e a estabilidade do recobrimento formado.

O uso da RAFT (ou outras ferramentas sintéticas avançadas) é crucial por permitir, de fato, o planejamento da estrutura molecular do material a ser testado: massa molar média final, arquitetura, composição relativa, etc., permitindo o

isolamento dessas variáveis para se chegar no exato efeito de cada uma delas sobre a capacidade antimicrobiana. A homogeneidade composicional intercadeias que é conseguida usando-se a RAFT também é fundamental para isso.

Espera-se contribuir com materiais poliméricos antimicrobianos diretamente aplicáveis e com relações estrutura/propriedades que facilitem a obtenção de mais materiais com essa capacidade e elucidar algumas questões científicas relevantes para a Ciência dos Materiais Poliméricos e outras áreas.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Gerais**

- Gerar materiais poliméricos com alta eficiência antimicrobiana.

### **2.2 Específicos**

- sintetizar novos (co)polímeros com potencial atividade antimicrobiana;
- caracterizar os materiais em profundidade, principalmente em relação à sua massa molar média e composição relativa;
- usar testes padronizados de ação antimicrobiana para determinar a atividade dos materiais sintetizados;
- criar relações empíricas entre os parâmetros estruturais dos materiais, estado de agregação e sua atividade antimicrobiana;
- sintetizar materiais altamente eficientes com base nas relações anteriormente definidas no âmbito do projeto.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 Monômeros**

Serão usados monômeros típicos aptos para polimerização radicalar, com especial atenção para aqueles com carga negativa ou positiva em meio aquoso e pH próximo da neutralidade, que são os que têm se mostrado efetivos como agentes antivirais<sup>7</sup> e antibacterianos<sup>6</sup>, respectivamente. Entre eles pode-se citar: ácido acrílico, acrilamida, ácido metacrílico, metacrilamida, metacrilato de 2-hidroxietila e metacrilato de (2-dietilamino)etila (DMAEMA) ou monômeros que após hidrólise gerem grupos polares, como é o caso do acrilato de terc-butila. Monômeros apolares comuns como o metacrilato de metila e congêneres para o estudo da influência da polaridade na atividade.

#### **3.2 Sínteses**

Serão realizadas sínteses via radical livre controladas (RAFT) preferencialmente usando agentes RAFT disponíveis no mercado (fornecedores: Sigma-Aldrich, Boron Molecular, Stream e outros). Todos os demais reagentes e solventes serão de grau P.A. obtidos de fornecedores/representantes locais. Agentes reticulantes, como a N, N'-etilenobis(acrilamida) ou outros podem ser usados para gerar materiais insolúveis.

Serão obtidos copolímeros com diferentes massas molares médias, diferentes composições e arquiteturas diversas (copolímeros aleatórios e em bloco e combinações dessas estratégias), usando-se RAFT.

Os polímeros serão purificados, preferencialmente, por precipitação seletiva. Alternativamente, pode-se utilizar diálise como método de purificação.



## Planejamento

Inicialmente, dois conjuntos de polímeros serão planejados para posterior síntese a saber:

- a) Polímeros orientados para apresentarem atividade antibacteriana
- b) Polímeros orientados para apresentarem atividade antiviral.

Em relação ao conjunto a), as primeiras sínteses serão direcionadas para a geração de copolímeros aleatórios (devido à diferença de reatividade espera-se, de fato, copolímeros em gradiente) sintetizados a partir dos monômeros DMAEMA (catiônico) MMA (apolar) e um monômero polar neutro como o metacrilato 2-hidroxietila (HEMA). Pretende-se gerar 5 materiais conforme a matriz a seguir:

Material	Composição Molar relativa mero catiônico (%)	Composição molar relativa mero apolar (%)	Composição molar relativa mero polar neutra (%)
A	50	50	0
B	30	70	0
C	30	60	10
D	50	40	10

A partir do estudo da atividade antibacteriana desses materiais, novas sínteses serão planejadas para consolidação das relações entre a ação antibacteriana e a composição relativa. Essas relações permitem previsibilidade da atividade antibacteriana com a composição relativa e

podem levar ao planejamento e síntese de materiais com alta eficiência para este fim.

Depois dessas etapas, escolhida uma composição, será estudada a dependência da atividade antibacteriana com a massa molar média. Novos materiais com essa composição, mas com a arquitetura em bloco, também serão testados. Estes testes balizarão outras sínteses como a adição de blocos responsáveis pela adsorção a superfícies metálicas ou de tecidos (usando-se blocos de meros com funções apropriadas para tanto, como aqueles com capacidade de complexação com óxidos metálicos ou de alta hidrofobicidade para garantir a imobilização em tecidos).

Com relação ao conjunto b), serão sintetizados copolímeros aniônicos que podem apresentar atividade antiviral<sup>7,15</sup>. Num primeiro momento serão planejados copolímeros aleatórios (em gradiente, devido a diferença de reatividade) usando um monômero ácido, como o ácido metacrílico e um monômero apolar, como o estireno que, potencialmente, modularia a interação como o envelope externo e, portanto, a atividade antiviral que depende desse fenômeno<sup>16</sup>. A princípio, três materiais serão sintetizados: um com excesso de monômero ácido no início da reação, um com número de moles equivalente e outro com excesso de monômero apolar. Para estas sínteses pode-se usar a estratégia de partir-se de um éster como metacrilato de terc-butila para gerar-se o ácido por hidrólise pós-polimerização.

De posse dos resultados de ensaios antivirais, novas sínteses serão planejadas (com os mesmos ou outros monômeros) para elucidar

a influência da estrutura do material nessa atividade e para a produção de materiais com alta eficiência antiviral.

Materiais catiônicos e aniônicos serão simultaneamente testados como antivirais e antibacterianos, na busca por polímeros capazes de desempenhar antimicrobianos polivalentes.

### **3.3 Caracterizações**

Os materiais poliméricos serão caracterizados quanto à sua composição, massa molar média e distribuição da massa molar (dispersividade molecular). Para isso serão usadas as técnicas de cromatografia por permeação em gel (GPC), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR); ressonância magnética nuclear de próton ( $^1\text{H-NMR}$ ). Todas essas estão à disposição do proponente. Outras técnicas de caracterização podem vir a ser usadas.

### **3.4 Testes antimicrobianos**

Serão realizados testes clássicos de concentração mínima inibitória (MIC)<sup>33</sup> para os materiais poliméricos solúveis. Para materiais insolúveis serão adaptados testes de crescimento de colônias em placas. Esses testes serão realizados em colaboração com o grupo da Profa. Iolanda Midea Cuccovia do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP-SP.

Testes antivirais clássicos<sup>34</sup> também serão realizados para materiais selecionados, em colaboração com grupos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP-SP, entre eles o da Profa. Cristiane Rodrigues Guzzo, usando, preferencialmente, o vírus SARS-CoV-2.

#### 4. Cronograma

Atividade	Semestre							
	1º.	2º.	3º.	4º.	5º.	6º.	7º.	8º.
Adequação do laboratório/aquisições	X				X			
Síntese de Materiais Poliméricos	X	X	X					
Testes antimicrobianos		X	X	X	X			
Propostas de relação estrutura/atividade			X	X				
Síntese de materiais otimizados					X	X		
Testes antimicrobianos dos materiais otimizados					X	X	X	
Incorporação dos materiais a superfícies			X			X	X	
Exame de qualificação							X	
Preparo de manuscritos			X		X	X	X	X

Confecção e Defesa da tese								X
-------------------------------	--	--	--	--	--	--	--	---

## 5. Orgão financiador

O orientador da presente proposta tem projeto PND-USP (Programa Novos Docentes) ativo e projeto enviado à FAPESP. Este projeto está em linha com proposta recentemente aprovada pela FAPESP (2022/02049-6, projeto regular) que garante a viabilidade econômica da proposta.

## 6. Recurso Necessários

Estão já à disposição do grupo na EEL-USP: equipamento de GPC completo com injetor automático (Shimadzu), espectrofotômetro UV-Vis (Thermo Scientific); espectrômetro FTIR (Nietsche); calorímetro diferencial (Nietsche); termogravimetria(Nietsche), espectrômetro de ressonância magnética nuclear; entre outros. Parte importante dos insumos necessários também já se encontra disponível.

Parcerias colaborativas já estão fechadas para a realização de diversos experimentos, particularmente os ensaios antimicrobianos.

## 7. Referências

- (1) Jain, A.; Duvvuri, L. S.; Farah, S.; Beyth, N.; Domb, A. J.; Khan, W. Antimicrobial Polymers. *Adv. Healthcare Mater.* **2014**, 3 (12), 1969–1985. <https://doi.org/10.1002/adhm.201400418>.

- (2) Alvarez-Paino, M.; Munoz-Bonilla, A.; Fernandez-Garcia, M. Antimicrobial Polymers in the Nano-World. *Nanomaterials* **2017**, 7 (2), 48. <https://doi.org/10.3390/nano7020048>.
- (3) Muñoz-Bonilla, A.; Fernández-García, M. Polymeric Materials with Antimicrobial Activity. *Progress in Polymer Science* **2012**, 37 (2), 281–339. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.08.005>.
- (4) Chiefari, J.; Chong, Y. K. (Bill); Ercole, F.; Krstina, J.; Jeffery, J.; Le, T. P. T.; Mayadunne, R. T. A.; Meijs, G. F.; Moad, C. L.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer: The RAFT Process. *Macromolecules* **1998**, 31 (16), 5559–5562. <https://doi.org/10.1021/ma9804951>.
- (5) Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. Living Radical Polymerization by the RAFT Process – A Third Update. *Aust. J. Chem.* **2012**, 65 (8), 985–1076.
- (6) Ding, X.; Duan, S.; Ding, X.; Liu, R.; Xu, F.-J. Versatile Antibacterial Materials: An Emerging Arsenal for Combatting Bacterial Pathogens. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, 28 (40), 1802140. <https://doi.org/10.1002/adfm.201802140>.
- (7) Bianculli, R. H.; Mase, J. D.; Schulz, M. D. Antiviral Polymers: Past Approaches and Future Possibilities. *Macromolecules* **2020**, 53 (21), 9158–9186. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.0c01273>.
- (8) Choudhury, R. R.; Gohil, J. M.; Mohanty, S.; Nayak, S. K. Antifouling, Fouling Release and Antimicrobial Materials for Surface Modification

of Reverse Osmosis and Nanofiltration Membranes. *J. Mater. Chem. A* **2018**, 6 (2), 313–333. <https://doi.org/10.1039/c7ta08627j>.

- (9) Hetrick, E. M.; Schoenfisch, M. H. Reducing Implant-Related Infections: Active Release Strategies. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35 (9), 780–789. <https://doi.org/10.1039/B515219B>.
- (10) Ghosh, C.; Sarkar, P.; Issa, R.; Haldar, J. Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends Microbiol.* **2019**, 27 (4), 323–338. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.12.010>.
- (11) Carmona-Ribeiro, A. M.; de Melo Carrasco, L. D. Cationic Antimicrobial Polymers and Their Assemblies. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, 14 (5), 9906–9946. <https://doi.org/10.3390/ijms14059906>.
- (12) Ergene, C.; Yasuhara, K.; Palermo, E. F. Biomimetic Antimicrobial Polymers: Recent Advances in Molecular Design. *Polym. Chem.* **2018**, 9 (18), 2407–2427. <https://doi.org/10.1039/c8py00012c>.
- (13) Sun, H.; Wang, Y.; Song, J. Polymer Vesicles for Antimicrobial Applications. *Polymers* **2021**, 13 (17), 2903. <https://doi.org/10.3390/polym13172903>.
- (14) Judzewitsch, P. R.; Nguyen, T.-K.; Shanmugam, S.; Wong, E. H. H.; Boyer, C. Towards Sequence-Controlled Antimicrobial Polymers: Effect of Polymer Block Order on Antimicrobial Activity. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2018**, 57 (17), 4559–4564. <https://doi.org/10.1002/anie.201713036>.

- (15) Machado, R. R. G.; Glaser, T.; Araujo, D. B.; Petiz, L. L.; Oliveira, D. B. L.; Durigon, G. S.; Leal, A. L.; Pinho, J. R. R.; Ferreira, L. C. S.; Ulrich, H.; Durigon, E. L.; Guzzo, C. R. Inhibition of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Replication by Hypertonic Saline Solution in Lung and Kidney Epithelial Cells. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2021**, *4* (5), 1514–1527. <https://doi.org/10.1021/acsptsci.1c00080>.
- (16) Pan, Y.; Xue, Y.; Snow, J.; Xiao, H. Tailor-Made Antimicrobial/Antiviral Star Polymer via ATRP of Cyclodextrin and Guanidine-Based Macromonomer. *Macromol. Chem. Phys.* **2015**, *216* (5), 511–518. <https://doi.org/10.1002/macp.201400525>.