

PRODUÇÃO DE POLI(DIVINILBENZENO) E INCORPORAÇÃO DE PRATA PARA ATUAR COMO AGENTE GERMICIDA

Lucas Andrade Melchiori¹; José Luis Fejfar²; Leo Kunigk²

¹ Aluno de Iniciação Científica da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT);

² Professor da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT).

Resumo. *Este trabalho tem como objetivo a preparação do poli(divinilbenzeno) por meio de polimerização em suspensão empregando diferentes agentes de suspensão para posterior incorporação de íons de prata por meio de adsorção ou a deposição deste elemento na sua forma metálica. Estes materiais foram testados quanto à sua capacidade de eliminar *Staphylococcus aureus* presentes em suspensão aquosa. Como controle utilizou-se o divinilbenzeno polimerizado com o álcool polivinílico (PVA) como agente de suspensão, sem a incorporação de íons de prata. Verificou-se que o poli(divinilbenzeno) preparado com o poli(acrilato de sódio) como agente de suspensão e tendo íons de prata incorporados resultou em uma redução de 99,993% da população bacteriana após 25 minutos de agitação contínua de uma solução contaminada contendo-o. Os rendimentos das polimerizações foram de 80%, tanto usando PVA como o poli(acrilato de sódio) como agentes de suspensão, e que a incorporação de prata metálica foi inconsistente quanto às características apresentadas pelo polímero, como a coloração final.*

Introdução

Diversos microrganismos são nocivos à saúde de humanos sendo esta a razão pela qual se procura desde o início do século XX métodos para o controle ou eliminação de bactérias patogênicas que poderiam ser ingeridas e provocar enfermidades. Uma das bactérias nocivas mais conhecidas é a *Staphylococcus aureus*. É uma bactéria gram positiva, descoberta em 1860 por um cirurgião chamado Alexander Ogston ao analisar o acúmulo de pús na junta da perna de um de seus pacientes. A bactéria pode ser encontrada na flora bacteriana do corpo humano, especialmente em locais como as fossas nasais e na pele. Apesar disso, a bactéria pode causar inúmeras doenças, desde doenças brandas como o terçol e infecção de pele até doenças mais graves como a pneumonia e a osteomielite. Estima-se que nos EUA aproximadamente 50000 mortes, por ano, estão associadas à *S. aureus*.



Figura 1: Imagem ilustrando as 10 bactérias mais comuns nas UTIs brasileira, em 2015

Fonte: Página da Folha de São Paulo

Como pode ser visto na Figura 1, a *S. aureus* é uma das bactérias mais encontradas em leitos hospitalares no Brasil, o que realça a importância da pesquisa por métodos capazes de inibir seu crescimento ou eliminá-las.

O método mais comum é o tratamento através de antibióticos, sendo ele largamente empregado desde a descoberta da Penicilina. Entretanto nos últimos anos, devido ao crescimento de superbactérias, que são bactérias resistentes a antibióticos, a procura por métodos alternativos aumentou consideravelmente. A Figura 2 e a Figura 3 mostram a ocorrência deste crescimento no Brasil e nos EUA, respectivamente.



Figura 2: Imagem ilustrando a propagação de superbactérias nas UTIs de São Paulo nos últimos 12 anos
 Fonte: Página da BBC

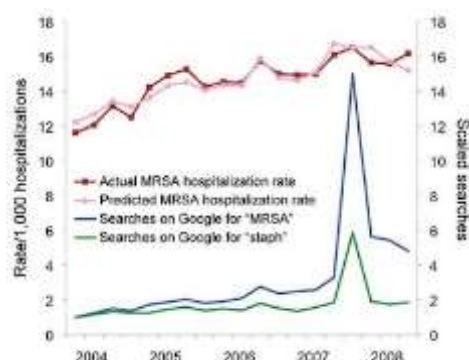


Figura 3: Imagem ilustrando a propagação da MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina) nos EUA
 Fonte: Página da revista Wired

Um desses métodos é a utilização de metais pesados, como a prata e o cobre, que vem sendo aplicada a longa data, mas o problema é que estes metais também podem provocar problemas à saúde. No corpo humano eles podem gerar espécies extremamente reativas, como radicais hidroxila ou hidróxidos, ou reagir com as paredes celulares. Portanto, o grande desafio na sua utilização é garantir a sua ação antimicrobiana sem, contudo, provocar a contaminação de água e alimentos que serão consumidos. Assim, procuram-se métodos para ancorá-los a uma estrutura para garantir que não provoquem a contaminação do material ou meio a ser tratado. O emprego de um polímero insolúvel em água como o poli(divinilbenzeno) contendo os metais em sua forma reduzida depositada, ou iônica adsorvida, pode representar uma solução para este problema. Outros trabalhos, como o trabalho de Dowling (2001), mostraram resultados promissores.

Este trabalho teve como objetivo polimerizar em suspensão o divinilbenzeno usando PVA ou poli(acrilato de sódio) como agentes de suspensão e calcular o rendimento do processo, incorporar íons de prata por adsorção ou por deposição de prata metálica por meio de reação redox e analisar o efeito dessa adição na inibição de crescimento bacteriano por meio de testes em placa Petri e analisar sua atuação como agente germicida em meios líquidos contaminados.

Materiais e Métodos

Foram utilizados para a fabricação do polímero: Divinilbenzeno (DVB) (Figura 4) (55% Sigma-Aldrich), Álcool Polivinílico (PVA) (Figura 5) (P.A. Vetec), Peróxido de Benzoíla ($C_{14}H_{10}O_4$) (72,0-80,0% Vetec), Poli(acrilato de Sódio) (Figura 6) (aquoso 50% m/m Sigma-Aldrich), Nitrato de Prata ($AgNO_3$) (99,8% Sigma-Aldrich), Cloreto de Sódio ($NaCl$) (P.A.) e água destilada. O reator utilizado é mostrado na Figura 7.

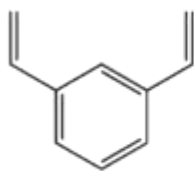


Figura 4: Estruturas do divinilbenzeno

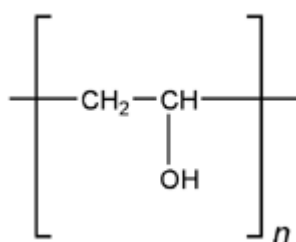
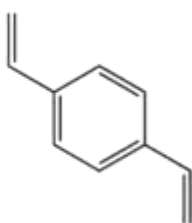


Figura 5: Estrutura do PVA

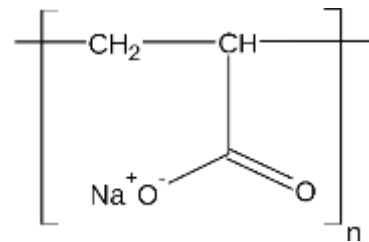


Figura 6: Estrutura do poli(acrilato de sódio)



Figura 7: Equipamentos utilizados no processo de polimerização. Composto por um reator tipo kettle, uma manta térmica, um termômetro analógico e um agitador mecânico.

Para as análises microbiológicas utilizou-se uma cepa de *Staphylococcus aureus* presente na coleção de culturas da EEM e cultivada em *plate count agar* (PCA).

Foram utilizados também vidrarias e equipamentos de uso rotineiro em laboratórios como Béqueres, Erlenmeyers, pipetas volumétricas e graduadas, provetas, balança semianalítica, autoclave, bico de Bunsen entre outros.

Para os testes em meio líquido utilizou-se solução salina 0.85% previamente esterilizada, tubos de vidro com fundo arredondado também previamente esterilizados, pipetas de 1 e 5 mL previamente esterilizadas e um cronômetro digital. O agitador de tubos e o contador de colônias usados estão representados na Figura 8 e Figura 9, respectivamente.



Figura 8: Agitador de tubos



Figura 9: Contador de colônias

Na primeira parte do projeto realizou-se a polimerização do DVB. Preparou-se a fase orgânica dissolvendo 0,75 g de peróxido de benzoíla em 15 mL de DVB. A fase aquosa foi feita misturando 1,5 g de PVA em 750 mL de água destilada. Adicionou-se a fase aquosa e a fase

orgânica no reator e agitou-se vigorosamente a 500 rpm. A temperatura foi mantida entre 80-90°C por 30 min. O produto obtido foi lavado com água destilada em abundância e filtrado com um funil de Büchner, com papel de filtro, e depois seco em dessecador contendo sílica gel como secante. Uma segunda lavagem com água destilada foi realizada após 24 horas de secagem. Uma nova batelada de material polimérico foi efetuada com a substituição do PVA por poli(acrilato de sódio), mantendo a mesma massa de agente de suspensão. Para efeito de cálculo de rendimento, considerou-se como 100% a polimerização total da massa inicial do DVB empregado no processo e desprezaram-se os efeitos do agente de suspensão e do catalisador da reação.

O método para a incorporação de íons de prata no material polimérico consistiu em adicionar o polímero em uma solução aquosa contendo AgNO_3 0,1 Molar mantendo-se sob agitação, a temperatura ambiente, por 24 horas. Após este período lavou-se e filtrou-se o polímero empregando-se o método descrito anteriormente mantendo-se em dessecador por 24 horas. Após este período utilizou-se o método de detecção de prata por precipitação de AgCl , ao adicionar NaCl aquoso na água residual de lavagens posteriores. A lavagem foi concluída quando não se observou mais uma turvação. Após a lavagem o polímero foi mantido por 24 horas em dessecador.

O método para incorporação de prata metálica consistiu em utilizar um reagente de Tollens para depositar a prata metálica no polímero. O reagente foi feito da seguinte forma: em um béquer adicionou-se 3 mL de AgNO_3 aquoso 0,1 Molar e 1 mL de NaOH 2 Molar. Então adicionou-se NH_4OH até dissolver o precipitado, porém sem deixar excesso de NH_4OH . Adicionou-se o polímero na solução e, por fim, adicionou-se, na solução, 20 mL de sacarose aquosa 0,5 g.L^{-1} , a qual foi mantida sob agitação por 24 horas. Por meio dessa reação os íons de prata são lentamente reduzidos à prata metálica sendo depositados na superfície do material polimérico.

Para criar o meio de cultura diluiu-se o PCA em água destilada em uma concentração de 17,5 g.L^{-1} em um Erlenmeyer de 400 mL sob aquecimento e agitação até a sua completa dissolução. Fracionou-se esse volume em recipientes menores para que o meio de cultura fosse esterilizado em autoclave.

A ação antimicrobiana foi feita da seguinte forma: Fundiu-se o meio de cultura e preencheu-se placas de Petri com ele e aguardou-se a sua solidificação. Com uma alça de inoculação esterilizada em chama colheu-se uma amostra da bactéria *S. aureus* existente na coleção de cultura e levemente passou-se sobre a superfície de forma alternada. Após isso a placa foi colocada em estufa a 36°C por 24 horas. Após este período, colheu-se uma amostra da colônia e dilui-se em solução salina até a turvação da mesma. Após a obtenção dessa suspensão, ela foi transferida para um Erlenmeyer contendo 200 mL de meio PCA fundido tomando-se o cuidado que a temperatura deste estivesse entre 40 e 50 °C, através de um banho com água a 45 °C. Esse meio de cultura contaminado foi transferido para placas de Petri, aguardou-se a sua solidificação e então depositou-se sobre a superfície do meio de cultura pequenas quantidades do polímero com e sem a incorporação de prata. Essas placas foram mantidas em estufa por 48 horas e após este período analisou-se o crescimento bacteriano ao redor das amostras do polímero depositado.

O teste bacteriano em meio líquido foi efetuado da seguinte forma: Uma cepa bacteriana foi previamente preparada um dia antes do experimento. Pipetas de 1 mL e tubos de vidro contendo soluções salinas a 0,85% também foram esterilizadas previamente. Amostras de *S. aureus* foram adicionadas em um tubo de 10 mL de solução salina esterilizada até apresentar uma alta opacidade (Figura 18). Homogeneizou-se a solução, e então se realizou diluições sucessivas, transferindo um 1 mL da solução mais concentrada para um tubo de 9 mL de solução salina esterilizada, homogeneizando-a posteriormente, até obter uma concentração 10^7 vezes menor em relação a inicial. Após isto, pesou-se 1,00 g de polímero em um tubo de vidro vazio e esterilizado, e então se adicionou 5 mL da solução mãe contaminada. Com um agitador de tubo agitou-se a amostra durante 10 minutos. Após este período realizou-se diluições

sucessivas até obter uma concentração 10^7 vezes menor que a inicial. Realizou-se, então, a semeadura de todas as diluições a fim de observar a atuação do polímero e de obter a concentração inicial de bactérias. O mesmo procedimento foi executado para o polímero com íons de prata adsorvidos, e com a prata metálica depositada, variando o tempo de 10 a 25 minutos de 5 em 5 minutos. As amostras semeadas foram mantidas em uma estufa por 24 horas, realizando-se a contagem após este período.

Resultados e Discussão

A síntese dos polímeros usando poli(acrilato de sódio) e PVA como agentes de suspensão apresentou os seguintes resultados mostrados na Tabela 1. Para o cálculo da média ignorou-se a amostra 1 do DVB-PVA, pois, nesse caso, ocorreram perdas físicas de monômero por uma falha no termopar, o qual regulava o calor gerado pela manta térmica. Por estar descalibrado este causou com que a água entrasse em ebulição, acarretando em perdas físicas do monômero, o qual era arrastado pelo vapor d'água saindo do reator. O termopar foi posteriormente substituído por um termômetro analógico e o controle da manta passou a ser feito manualmente.

Tabela 1: Resultados da polimerização do divinilbenzeno

Amostra	DVB-PVA			DVB-poli(acrilato de sódio)		
	m inicial (g)	m final (g)	Rendimento	m inicial (g)	m final (g)	Rendimento
1	13.68	3.17	23.17%	14.70	12.06	82.04%
2	13.68	11.15	81.51%	13.68	10.69	78.14%
3	13.68	11.03	80.63%	8.21	6.26	76.27%
		Média	81.07%		Média	78.82%



Figura 10: Amostra 1



Figura 11: Amostra 2



Figura 12: Amostra 3



Figura 13: Amostra controle, sem *S. aureus*

As amostras de DVB polimerizado empregando-se o PVA como agente de suspensão mostraram resultados negativos de atividade germicida para o polímero sem prata, com prata

metálica depositada e com íons de prata incorporada, visto que não houve formação de um anel de inibição em torno das amostras, como pode ser visto nas imagens acima.



Figura 14: Amostra 1



Figura 15: Amostra 2



Figura 16: Amostra 3



Figura 17: Amostra controle, sem *S. aureus*

O polímero contendo poliacrilato, por outro lado, mostrou-se promissor havendo formação do anel de inibição em torno das amostras contendo prata. Notou-se também que o anel de inibição formado foi maior em torno do polímero com prata adsorvida, como pode ser visto nas imagens acima. Uma hipótese para explicar essa observação é a possibilidade do grupo carboxilato (COO^-), presente no poli(acrilato de sódio), permitir uma melhor incorporação da prata em relação ao grupo hidroxila (OH^-) presente no PVA. No trabalho de Zhang (2011) foi comprovado que ocorre uma interação entre os íons de prata e os grupos carboxilatos. O trabalho de Plaza (2015) menciona, como uma das possíveis rotas de incorporação de íons de prata, a substituição de íons de sódio por íons de prata, o que sustenta a hipótese levantada.



Figura 18: Padrão de turvação utilizado para a solução contaminada

Para o teste em meio líquido, utilizou-se como padrão uma 10 mL de uma solução salina 0,85% contaminada com *S. aureus* com a opacidade similar à apresentada pelas soluções presentes na Figura 18. Os testes foram realizados com o polímero contendo poli(acrilato de sódio) apenas, tendo em vista que o polímero com PVA não apresentou atividade germicida no teste em meio sólido.

Para o polímero não contendo prata obtive-se os resultados apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados dos testes em meio líquido efetuados com o polímero não contendo prata

t (min)	População controle	Desvio padrão C	População amostra	Desvio padrão amostra
10	1.69E+08	2.00E+06	2.28E+08	3.00E+06
15	1.04E+08	2.00E+06	-	-
15	2.01E+08	3.00E+06	-	-
15	4.50E+08	3.00E+07	1.14E+08	0.00E+00
20	2.50E+08	5.00E+06	-	-
20	1.13E+09	3.00E+07	3.10E+07	5.00E+06
25	4.40E+08	1.00E+07	1.65E+08	4.00E+06

Houveram três resultados nos quais a semeadura da amostra não indicou crescimento bacteriano. É possível que isto tenha ocorrido pelo fato ainda de haver traços de monômero no polímero, que poderia ser tóxico às bactérias. Decidiu-se realizar uma segunda lavagem, com água destilada e metanol, do polímero a fim de eliminar quaisquer traços de monômero. Notou-se que, após adotar um segundo processo de lavagem seguido de filtração e secagem, as amostras de polímero sem prata incorporada passaram a apresentar resultados dentro do esperado.

Para o polímero contendo prata metálica obtive-se os resultados mostrados na Tabela 3. Para a prata metálica não se efetuou o teste em 25 minutos pelo fato da incorporação não ter sido consistente ao longo do processo.

Tabela 3: Resultados dos testes em meio líquido efetuados com polímero contendo prata metálica

t (min)	População controle	Desvio padrão C	População amostra	Desvio padrão amostra
10	3.70E+09	1.00E+08	2.29E+09	9.80E+07
15	2.44E+08	3.00E+06	2.62E+07	6.00E+05
20	1.70E+08	6.00E+06	-	-
20	4.50E+08	1.00E+07	5.17E+07	7.00E+05
25	-	-	-	-

Como pode-se perceber na Figura 19, uma das amostras apresentou um aspecto acinzentado, duas das amostras apresentaram um aspecto amarronzado, uma das amostras apresentou um aspecto prateado e a amostra mais a direita apresentou um aspecto um pouco amarronzado, um pouco acinzentado. A última amostra apresentou uma coloração mista, indicando que a incorporação de prata não ocorreu de maneira homogênea no polímero.



Figura 19: Resultados da deposição de prata metálica em cinco amostras de poli(divinilbenzeno)

Segundo o trabalho de Humberto Plaza (2015) o tamanho da nanopartícula de prata depositada em uma matriz polimérica influencia diretamente a efetividade do composto como agente germicida. Como esta variação de cor é devida ao estado de agregação da prata no polímero, isto é, o tamanho da partícula depositada, esta variação poderia causar uma

interferência nos resultados do teste em meio líquido, o que impediria de obter uma curva de redução precisa.

O polímero contendo íons de prata apresentou os resultados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados dos testes em meio líquido efetuados com o polímero contendo íons de prata

t (min)	População controle	Desvio padrão C	População amostra	Desvio padrão amostra
10	1.34E+08	1.00E+06	1.02E+08	1.00E+06
15	2.66E+08	2.00E+06	3.60E+07	2.00E+06
20	1.90E+08	7.00E+06	-	-
20	4.20E+08	4.00E+07	9.95E+06	1.50E+05
25	6.70E+08	1.20E+08	5.00E+04	1.00E+03

Em uma das amostras ocorreu a contaminação desta, o que impossibilitou realizar a contagem na faixa de confiança. A partir dos resultados das tabelas 2 a 4, foi possível construir o gráfico da Figura 20.

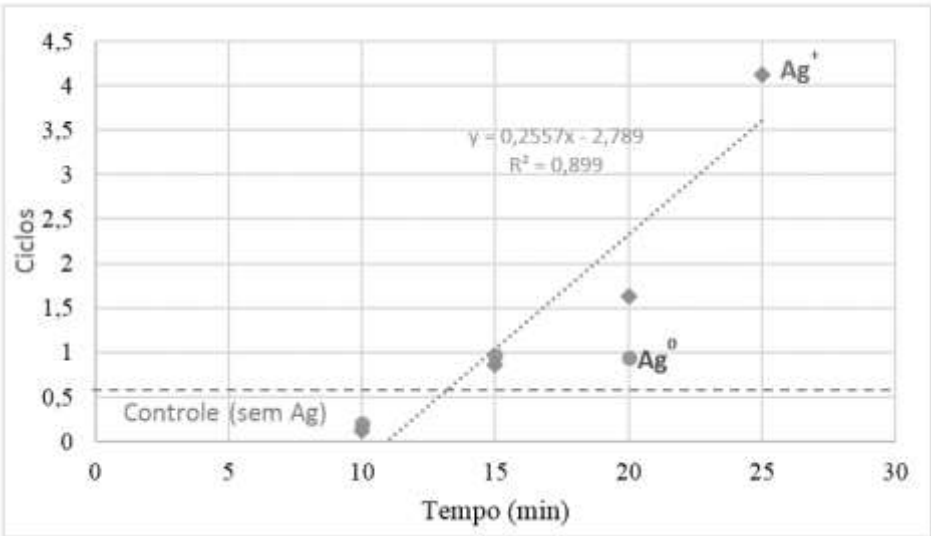


Figura 20: Gráfico da redução da população de *S. aureus*, em ciclos, em função do tempo de agitação linearizado.

Como os testes com prata metálica foram interrompidos, foi somente gerada a equação da redução da população bacteriana para o polímero contendo íons de prata. Para tal assumiu-se que a cinética da destruição de bactérias é uma cinética de primeira ordem.

A linha controle apresentada na Figura 20 representa a média da redução, em ciclos, da população nos testes com o polímero sem prata, e representa o erro de diluição que ocorre durante o processo, e, possivelmente, a absorção de bactérias pelo polímero, as quais ficariam alojadas nas suas cavidades microscópicas. Esta absorção apresentaria uma redução, porém sem ser causada pela atividade germicida da prata.

A redução da população bacteriana, percentualmente, para o polímero com íons de prata e para ele com prata metálica, é apresentada na Tabela 5. Nela é possível perceber que houve uma estagnação da redução para as amostras utilizando o polímero contendo prata metálica. Uma hipótese para explicar essa observação seria de que um dos mecanismos para a eliminação de bactérias envolve a entrada de íons Ag^+ no interior da célula da bactéria *S. aureus* (Feng, et al, 2000). Com a prata apenas adsorvida no polímero, este pode liberá-la ao ser adicionado em um meio aquoso, enquanto que o polímero com a prata depositada não possui íons de prata para liberar no meio, dependendo apenas do contato direto das bactérias com ele para elimina-las.

Tabela 5: Redução percentual da população bacteriana

t (min)	$-\Delta [\log (\text{População } \text{Ag}^0)]$	$-\Delta [\log (\text{População } \text{Ag}^+)]$	% Ag^0	% Ag^+
---------	--	--	-----------------	-----------------

10	0.208366	0.118505	38.11%	23.881%
15	0.969089	0.868579	89.26%	86.466%
20	0.939722	1.625426	88.51%	97.631%
25	-	4.127105	-	99.993%

Conclusões

A polimerização do divinilbenzeno, em suspensão, empregando-se o PVA como agente de suspensão obteve um rendimento de 81.07%, e empregando-se o poli(acrilato de sódio) como agente de suspensão obteve um rendimento de 78.81%.

Pôde-se concluir que o poli(divinilbenzeno) contendo poli(acrilato de sódio) e íons de prata adsorvidos foi, dentre as seis opções estudadas, o que apresentou maior atividade germicida, chegando a eliminar 99.993% da população de *Staphylococcus aureus* após 25 minutos de contato.

Em uma segunda fase poderia se estudar uma eliminação completa da *Staphylococcus aureus*, isto é, uma redução da população bacteriana em 6 ciclos, ou 99,9999%, empregando-se uma maior massa de polímero contendo prata, como 2 gramas, ou tempos maiores de agitação da solução salina contaminada com a bactéria e contendo o polímero, como 30 ou 40 minutos. Poderia também se estudar uma técnica de deposição de prata no polímero mais controlada, ou buscar realizar uma maior quantidade de deposições até que se obtenha uma quantidade suficientemente adequada (em torno de 20 gramas) de polímero com prata depositada contendo o mesmo estado de agregação da prata, para que fosse possível obter uma equação da cinética da destruição das bactérias para o polímero com prata metálica depositada.

Referências Bibliográficas

- Dowling, D.P. Donnelly, K. Mcconnell, M.I. Eloy, R. Arnaud, M.N. (2001) Deposition of anti-bacterial silver coatings on polymeric substrates. *Thin Solid Films*, **398-399**, 602-606.
- Feng, Q. L. Wu, L. Chen, G. Q. Cui, F. Z. Kim, T. N. Kim, J. O. (2000) A mechanistic study of the antibacterial effects of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Journal of Biomedical Materials Research*, **52**, 662-668.
- GUIMARÃES, K. Superbactérias avançam no Brasil e levam autoridades de saúde a correr contra o tempo. [www.bbc.com](http://www.bbc.com/portuguese/brasil-40561948). 11/07/2017. Disponível em: <<http://www.bbc.com/portuguese/brasil-40561948>> Acessado em 02/12/2017.
- H. Palza, (2015) Antimicrobial Polymers with Metal Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, **116**, 2099-2116.
- KEIM, B. Google search patterns could track MRSA spread. www.wired.com. 20/05/2011. Disponível em: <<https://www.wired.com/2011/05/google-mrsa/>> Acessado em: 02.12/2017.
- SITE FOLHA.UOL.COM.BR. As 10 bactérias mais comuns em UTIs brasileiras. 12/07/2017. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/equilibrioesaude/2017/07/1900591-superbacterias-avancam-no-brasil-e-levam-autoridades-de-saude-a-correr-contra-o-tempo.shtml>> Acessado em: 02/12/2017.
- Zhang, J. Ge, X. Wang, M. Yang, J. Wu, Q. Wu, M. Xu. D. (2011) Colloidal silver deposition onto functionalized polystyrene microspheres. *Polymer Chemistry*, **2**, 970-974.