

## PREPARAÇÃO DE COPOLÍMEROS À BASE DE 2-VINILPIRIDINA COM PROPRIEDADES BACTERICIDAS

Aline S. S. Valle, Luciana C. Costa, Mônica R. C. Marques\*, Camila L. P. Silva e Luiz Cláudio de Santa Maria

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier 524, 20559-900 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Fábio Merçon

Departamento de Tecnologia de Processos Bioquímicos, Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier, 524, 20559-900 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Alcino Palermo de Aguiar

Departamento de Engenharia Química, Instituto Militar de Engenharia, Pr. Gal. Tibúrcio, 80, 22290-270 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Recebido em 14/4/10; aceito em 17/11/10; publicado na web em 18/2/11

**SYNTHESIS OF COPOLYMERS BASED ON 2-VINYLPYRIDINE WITH ANTIBACTERIAL PROPERTIES.** We report the development of two copolymers based on 2-vinylpyridine, styrene and divinylbenzene (2Vpy-Sty-DVB) with different porosity degrees. The copolymers were subsequently quaternized with methyl iodide. To prepare charge transfer complexes, the unmodified copolymers and their derivatives quaternized with methyl iodine were impregnated with iodine. The antibacterial properties of the polymers were evaluated in dilutions ranging from  $10^2$  to  $10^7$  cells/mL of the auxotrophic OHd5-K12 *Escherichia coli* strain. It was possible to obtain materials with complete antibacterial activity even in the highest cell concentrations tested.

Keywords: biocidal polymers; 2-vinylpyridine-styrene-divinylbenzene copolymers; iodine.

### INTRODUÇÃO

O processo mais comumente empregado para desinfecção de água contaminada com bactérias e vírus nocivos, especialmente aqueles que se originam de matéria fecal, é o tratamento com agentes oxidantes fortes, mais especificamente o tratamento com cloro e substâncias que o contém. Apesar do método de cloração da água não ser oneroso, a formação de compostos orgânicos clorados, tais como trialometanos (THM), representa um risco grande para a saúde da população, visto que diversos estudos apontam que esses compostos são carcinogênicos. Além disso, esses compostos não sofrem degradação biológica facilmente, possibilitando bioacumulação na cadeia alimentar.<sup>1,2</sup>

Em razão da importância que a água representa para melhoria da qualidade de vida e a manutenção da saúde humana é essencial o desenvolvimento de novas tecnologias, que propiciem alternativas ao tratamento convencional de águas. Dentre os processos alternativos de desinfecção da água, em que a geração de trialometanos é evitada, é possível destacar o uso de ozônio, dióxido de cloro, além da radiação ultravioleta.<sup>3-5</sup>

A ação germicida do ozônio pode ser atribuída aos radicais livres, hidroxila e hidropéroxido, produzidos pela reação com a água. Devido a sua instabilidade, o transporte e o armazenamento de ozônio são dificultados, e ele deve ser gerado *in situ*. A geração de ozônio *in situ* é um processo dispendioso, que envolve descargas elétricas de 20000 volts em ar seco. Além disso, em função desse tempo de vida curto das moléculas de ozônio, a água purificada não possui uma proteção residual que evite uma contaminação futura. Assim como o ozônio, o dióxido de cloro não pode ser estocado, já que é explosivo em elevadas concentrações. A geração de dióxido de cloro *in situ* acontece pela oxidação da sua forma reduzida,  $\text{ClO}_2^-$ , encontrada no sal clorito de sódio. Neste processo são gerados como subprodutos íons

clorito e clorato, além de outras espécies aniônicas. A presença destas espécies na água final também tem causado problemas de saúde. A desinfecção por radiação ultravioleta é dificultada por problemas operacionais como, por exemplo, pequena profundidade do leito a ser desinfetado, além do custo elevado com energia e manutenção. Por esse motivo, este método de desinfecção é recomendado apenas para pequenas instalações de tratamento de água.<sup>3-5</sup>

Copolímeros à base de divinilbenzeno (DVB), mais especificamente copolímeros de estireno-divinilbenzeno (Sty-DVB), vêm sendo extensamente avaliados como suportes para catalisadores e complexantes de metais pesados.<sup>6</sup> Porém, a avaliação desses materiais como suportes para agentes biocidas é relativamente recente.<sup>7-14</sup>

O uso de resinas biocidas no tratamento de água oferece grande vantagem em relação aos agentes antimicrobianos habitualmente utilizados para esse fim. A principal vantagem está relacionada à inativação ou destruição de micro-organismos, sem deixar na solução a ser descontaminada uma quantidade apreciável de resíduos. Por se tratar de materiais infusíveis e insolúveis podem ser utilizados em um processo em colunas e esta ser reutilizada após uma simples regeneração. Desta forma, o elevado custo inicial do material é recuperado em curto prazo, fazendo com que a relação custo/benefício deste processo de tratamento de águas seja economicamente viável.<sup>6</sup>

A síntese de resinas biocidas usualmente consiste na incorporação de um grupo bactericida em um suporte polimérico preparado previamente. Dois métodos podem ser usados para incorporar o grupo biocida na resina polimérica: adsorção física (impregnação) desse grupo no suporte ou incorporação de tal ligante através de ligação covalente na matriz.<sup>2,4,5,8-12</sup> Alternativamente, os monômeros contendo o grupo bactericida podem ser polimerizados e reticulados para a obtenção do polímero biocida.<sup>7,13,14</sup> Embora esta rota de síntese de polímeros biocidas seja mais direta, os monômeros funcionalizados são dispendiosos e é um processo difícil obter pérolas esféricas com morfologia controlada.<sup>6</sup>

\*e-mail: monicamarques@uerj.br

A capacidade antibacteriana de polímeros reticulados depende não apenas da eficiência do grupo bactericida introduzido, mas também do teor desses grupos e da sua acessibilidade pela solução contaminada. O grau de funcionalização desses polímeros e o acesso aos grupos introduzidos estão estritamente relacionados às características morfológicas do suporte polimérico. O teor de poros e o tipo de porosidade são determinantes na distribuição dos sítios ativos bactericidas, influenciando na eficiência desses materiais.<sup>6</sup>

Polímeros contendo grupo amônio quaternário em suas redes macromoleculares apresentam a capacidade de capturar, isolar e inativar bactérias e vírus por meio de interações eletrostáticas.<sup>2,8</sup> Esses materiais são comumente preparados através de clorometilação de copolímeros Sty-DVB, seguida de reação com diferentes aminas, ou fazendo-se a reação de copolímeros Sty-DVB-clorometilostireno com aminas.

Copolímeros 2-vinilpiridina-estireno-divinilbenzeno (2Vpy-Sty-DVB) podem ter as unidades piridina quaternizadas com haletos de alquila ( $S_N2$ ) ou com acrilonitrila (adição de Michael).<sup>5</sup> No entanto, a capacidade biocida desses materiais não tem sido suficientemente estudada. A introdução de grupos quaternários em copolímeros 2Vpy-Sty-DVB também pode ser feita fisicamente, por meio de impregnação com iodo. Jandrey demonstrou em seus trabalhos que copolímeros 2Vpy-Sty-DVB impregnados com iodo (complexos de transferência de carga) apresentam ação bactericida através de células *E. coli*.<sup>4,10,12</sup>

Este trabalho teve como objetivos: avaliar a capacidade bactericida de copolímeros 2Vpy-Sty-DVB quaternizados com iodeto de metila contra suspensões de *Escherichia coli*, avaliar se a quaternização química das unidades piridina altera a capacidade biocida dos copolímeros 2Vpy-Sty-DVB impregnados com iodo e estabelecer uma correlação entre as características morfológicas dos suportes poliméricos, o grau de funcionalização e a capacidade biocida dos produtos.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Reagentes e soluções

Os monômeros divinilbenzeno (DVB) e 2-Vinilpiridina (2Vpy) foram doados pela Nitriflex Ind. e Com. S.A. (Rio de Janeiro/Brasil), já o estireno (Sty) foi fornecido pela Petroflex Ind. e Com. S.A. (Rio de Janeiro/Brasil). 2-Hidroxietilcelulose foi doada pela Union Carbide (New Jersey, USA). Todos os outros reagentes e solventes foram adquiridos da Vetec Química Fina Ltda. (Rio de Janeiro/Brasil). Tanto os monômeros quanto os reagentes foram usados como recebidos.

Para os ensaios microbiológicos foram utilizados os meios de cultura LB (Luria Bertani) líquido e sólido. Os reagentes para o preparo desses meios foram obtidos da Himedia Laboratories PVT Limited (Mumbai/India). Todos os meios foram autoclavados por 20 min a 120 °C.

A bactéria *Escherichia coli* OHd5-K12 foi obtida de P. Howard-Flanders (Yale University, New Haven, CT).

### Síntese dos copolímeros de estireno-divinilbenzeno-2-vinilpiridina (2Vpy-Sty-DVB)

Os copolímeros 2Vpy-Sty-DVB foram sintetizados por meio de polimerização em suspensão aquosa, em balão de fundo redondo tritubulado equipado com agitador mecânico, termômetro e condensador de refluxo acoplado a um selo de silicone.

A fase aquosa foi preparada dissolvendo-se 2-hidroxietilcelulose, gelatina e fosfato de sódio (todos a uma concentração de 0,5% m/v) em água. Preparou-se a fase orgânica pela adição de  $5 \times 10^{-3}$  mol do

iniciador (AIBN) a uma solução constituída dos monômeros 2-Vpy (0,35 mol), Sty (0,05 mol) e DVB (0,1 mol) e de uma mistura diluente composta por tolueno e n-heptano em duas proporções, 70/30 e 50/50 respectivamente (1:1 v/v em relação à quantidade total de monômeros). A relação volumétrica entre as fases aquosa e orgânica foi 5:1 (v/v).

Transferiu-se a fase aquosa para o balão reacional sob agitação mecânica a uma velocidade de 300 rpm. Adicionou-se também a fase orgânica, de forma lenta e contínua. Após 15 min de contato, o sistema reacional foi aquecido a 70 °C em banho termostatizado, sob agitação por 24 h. As pérolas de copolímeros produzidas foram separadas por filtração e lavadas com água à temperatura de 60 °C e, posteriormente, com acetona em extrator de Soxhlet. Os copolímeros foram secos em estufa a 60 °C por 24 h.<sup>4,5</sup>

### Reação de quaternização dos copolímeros 2Vpy-Sty-DVB com iodeto de metila

A reação de modificação química dos copolímeros com iodeto de metila foi conduzida utilizando a razão molar entre 2VP e iodeto de metila de 1:10. Em um sistema constituído por um balão tritubulado de 500 mL, equipado com agitador mecânico, termômetro e um condensador de refluxo acoplado a um selo de silicone, foram adicionados 6 g de pérolas do copolímero a ser modificado e 40 mL de metanol. Após 24 h de contato, foi adicionada ao recipiente determinada quantidade de iodeto de metila. A mistura reacional foi mantida sob refluxo e agitação mecânica por 24 h. Os copolímeros modificados foram separados por filtração a vácuo e purificados através de lavagem com água aquecida a 60 °C e acetona. Por fim, os materiais foram secos em estufa a 60 °C por 24 h.<sup>5</sup>

### Impregnação de iodo nos copolímeros 2Vpy-Sty-DVB e de seus derivados quaternizados

A metodologia de impregnação dos copolímeros 2Vpy-Sty-DVB e seus derivados quaternizados com iodeto de metila foi baseada no trabalho de Jandrey e colaboradores.<sup>4</sup> Os copolímeros foram impregnados com iodo através de duas metodologias distintas:

Metodologia I – Impregnação na presença de solvente: foi preparada uma solução metanólica de iodo a 2%. Um volume de 50 mL desta solução foi deixado em contato com 1 g de pérolas de copolímero durante 72 h sob agitação em *shaker*. Após este tempo, o copolímero impregnado foi lavado com 3000 mL de água a 60 °C. Após lavagem as pérolas foram mantidas em estufa a 100 °C até peso constante.

Metodologia II – Impregnação em fase vapor: o sistema de impregnação a vapor foi constituído por um tubo de vidro de duas bocas, no qual foi acoplada a uma das bocas uma coluna de vidro sinterizado e na outra, uma mangueira com saída de nitrogênio. Ao final da coluna foi conectada uma mangueira com funil de vidro, o qual foi colocado sobre um bécquer contendo solução de tiosulfato de sódio a 1%. Ao tubo de vidro foi adicionado o iodo (3 g) e à coluna, os copolímeros (1 g). O fluxo de nitrogênio teve como objetivo forçar a passagem dos vapores de iodo do tubo até a coluna. Este sistema foi mantido em aquecimento por aproximadamente 4 h. Posteriormente, as pérolas foram purificadas com 3000 mL de água aquecida e secas em estufa a 100 °C até peso constante.

### Caracterização dos copolímeros 2Vpy-Sty-DVB e de seus derivados quaternizados

A caracterização da estrutura porosa dos copolímeros foi realizada através de medidas de densidade aparente, usando o método do cilin-

dro graduado.<sup>15</sup> Área específica, volume e diâmetro médio de poros por adsorção de nitrogênio aplicando as Equações de BET e BJH, respectivamente (Micromeritics, ASAP 2010 apparatus). Determinação da capacidade de inchamento em metanol, análise morfológica através de microscopia ótica (Olympus Bx60) e eletrônica de varredura (Philips XL-30). Além disso, os copolímeros foram caracterizados por espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (Spectrum One), aplicando o método de pastilhamento com KBr, análise elementar (PerkinElmer CHNS/O Analyser 2400 Serie II) e análise termogravimétrica (TG) (TA Instruments - modelo Q50 V6.4 Build 193) com uma taxa de aquecimento de 20 °C/min, faixa de temperatura de 30-700 °C.

As reações de modificação dos copolímeros foram acompanhadas qualitativamente por meio das técnicas de FTIR e TG. O teor de iodo incorporado aos materiais foi quantificado por gravimetria.

### Avaliação da capacidade bactericida dos materiais produzidos

Em ambiente estéril, foram pipetados 100 µL de cultura pré-preparada de *Escherichia coli* e transferida para um Erlenmeyer contendo 10 mL de meio LB líquido. A mistura foi deixada sob agitação a 120 rpm a 37 °C, até a fase exponencial de crescimento de cerca de  $1-2 \times 10^9$  células/mL. Foram transferidos 100 µL da cultura de pernoite em solução salina estéril (0,9% p/v). A partir desta nova suspensão foram feitas diluições para obter concentrações de  $10^3-10^7$  células/mL. Através de colunas recheadas com cerca de 200 mg de copolímero foram eluídas alíquotas de 500 µL de solução salina 0,9% e, posteriormente, as alíquotas das suspensões de células. Os eluídos foram recolhidos em tubos de ensaio, diluídos até a concentração de  $10^3$  células/mL e plaqueados em meio nutritivo sólido. O processo de incubação foi realizado em estufa a 37 °C por 24 h. Após esse período as unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas manualmente.

A fim de determinar o mecanismo de ação biocida dos polímeros produzidos, foram também realizados testes de estabilidade: através das colunas preenchidas foram eluídos 450 µL de solução salina estéril. Ao eluído foram adicionados 50 µL de suspensão bacteriana com concentração de  $10^4$  células/mL. Após o tempo de contato de 3 min, uma alíquota de 100 µL dessa suspensão foi plaqueada.

A ação bactericida dos copolímeros foi estimada pelo decréscimo de unidades formadoras de colônia (UFC). Os resultados obtidos foram tratados por análise estatística usando o teste t-Student e análise de variância (ANOVA).<sup>4,5</sup>

$$\text{Ação} = 100 \times (\text{UFC}_i - \text{UFC}_f) / \text{UFC}_i$$

onde: Ação = redução do número de células viáveis (%);  $\text{UFC}_i$  = unidades formadoras de colônias antes da eluição pelos copolímeros;  $\text{UFC}_f$  = unidades formadoras de colônias após a eluição pelos copolímeros.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Síntese e caracterização dos copolímeros 2Vpy-Sty-DVB

A rota mais comum de produção de polímeros biocidas consiste na inserção do grupo biocida na matriz polimérica preparada previamente (suporte).<sup>2,4,5,8-12</sup> A capacidade bactericida desses polímeros está estritamente relacionada com as características morfológicas do suporte. Os suportes poliméricos mais usados são os copolímeros de estireno-divinilbenzeno (Sty-DVB) preparados por polimerização em suspensão aquosa, na presença de um diluente e um iniciador. Os diluentes são fundamentais na formação da estrutura porosa dos

polímeros. Diluentes solvatantes apresentam afinidade pelas cadeias poliméricas em formação e produzem uma rede gel expandida, que acaba por resultar em um material com baixo grau de porosidade (do tipo gel). Diluentes não solvatantes não apresentam afinidade pelo polímero e produzem estruturas com elevada porosidade.<sup>6</sup>

Neste trabalho foram sintetizados dois copolímeros 2Vpy-Sty-DVB através da técnica de polimerização em suspensão aquosa usando a razão molar 70/10/20 entre os monômeros, grau de diluição igual a 100% e variando-se a composição da mistura diluente. Essa variação teve como objetivo avaliar a influência do grau de porosidade dos materiais poliméricos sobre sua capacidade bactericida. A mistura diluente foi constituída de tolueno e n-heptano, solventes solvatante e não solvatante, respectivamente, para as cadeias poliméricas em formação.<sup>16</sup> A incorporação dos monômeros, sobretudo da 2Vpy, à estrutura polimérica foi confirmada qualitativamente por espectroscopia de infravermelho – FTIR (Figura 1).

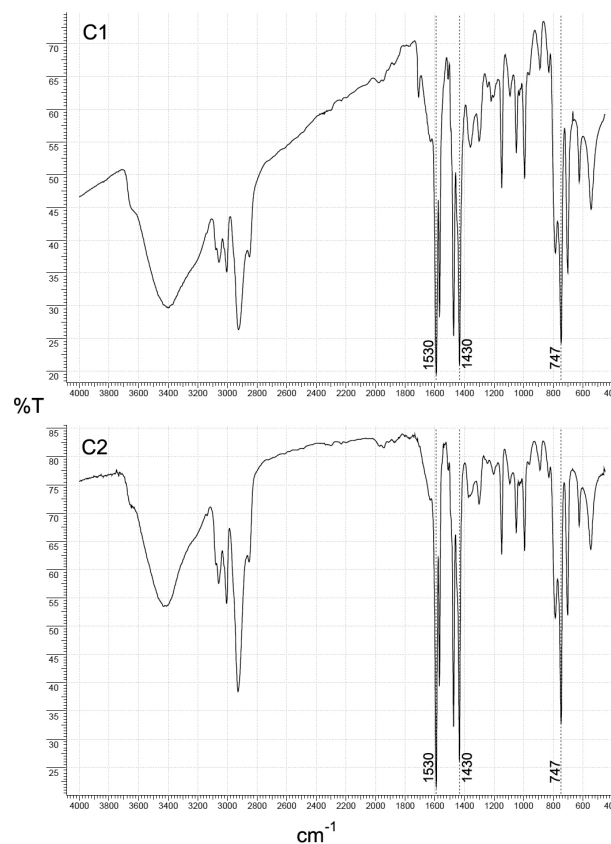


Figura 1. Espectro de FTIR dos copolímeros C1 e C2

Os espectros dos copolímeros de partida (Figura 1) apresentam bandas de absorção de deformação angular fora do plano, em  $747 \text{ cm}^{-1}$ , referente às unidades de piridina substituída na posição *orto*, bem como bandas de deformação axial na região entre  $1600$  e  $1430 \text{ cm}^{-1}$ , características de  $\text{C}=\text{C}$  e  $\text{C}=\text{N}$  de anel aromático, indicando a incorporação da 2Vpy aos copolímeros sintetizados.<sup>17</sup>

Os graus de incorporação do monômero 2Vpy aos copolímeros 2Vpy-Sty-DVB foram obtidos quantitativamente por análise elemental. A Tabela 1 apresenta os teores de nitrogênio teórico e experimental desses copolímeros, o rendimento percentual das reações de polimerização, bem como as características morfológicas desses dois materiais.

É possível constatar, analisando a Tabela 1, que os teores de nitrogênio teórico e experimental são similares, indicando elevado grau de incorporação do monômero 2Vpy aos copolímeros 2Vpy-Sty-DVB.

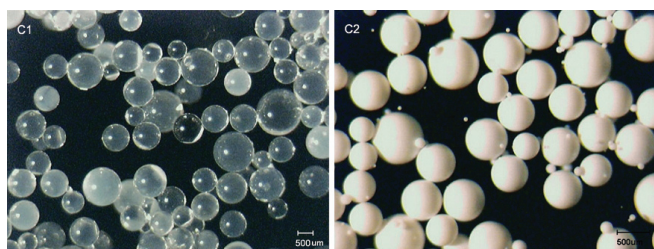
**Tabela 1.** Caracterização física dos copolímeros 2Vpy-Sty-DVB

Copolímero	Tol/Hep <sup>a</sup>	$d_{ap}^b$ (g/cm <sup>3</sup> )	$S^c$ (m <sup>2</sup> /g)	$V_{pi}^d$ (cm <sup>3</sup> /g)	$I_m^e$ (%)	NT <sup>f</sup> (mmol/g)	NE <sup>g</sup> (mmol/g)	Rendimento <sup>h</sup> (%)
C1	70/30	0,66	0,14	0,007	120	6,67	6,32	90
C2	50/50	0,35	40,41	0,304	33	6,67	6,32	96

a) Razão tolueno/heptano na mistura diluente; b) densidade aparente; c) área superficial específica; d) volume poros fixos; e) grau de inchamento em metanol; f) teor de nitrogênio teórico; g) teor de nitrogênio experimental determinado por análise elementar; h) rendimento da polimerização

As reações de polimerização ocorreram com elevados rendimentos, o que evidencia uma escolha adequada dos agentes de suspensão.

A redução do poder solvatante da mistura diluente conduziu à formação de copolímeros mais porosos (Tabela 1). O copolímero C1, sintetizado com a mistura diluente tolueno/heptano na proporção 70/30, apresentou área superficial da ordem de 0,1 m<sup>2</sup>/g e volume não mensurável de poros fixos, o que indica que esse material não apresenta poros no estado seco. Em contrapartida, o copolímero C2, sintetizado com a mistura diluente tolueno/heptano na proporção 50/50, apresentou uma área bem maior e um volume de poros fixos mensurável. As micrografias de microscopia ótica (Figura 2) e eletrônica de varredura (Figura 1S, material suplementar) revelam a dimensão do acréscimo de porosidade provocado pelo aumento do teor de n-heptano na mistura diluente. O aspecto ótico dos copolímeros mudou de transparente com leve opacidade para totalmente opaco, sem brilho, confirmando que o copolímero C2 contém uma estrutura mais porosa, capaz de causar refração da luz. Comparando-se as micrografias de microscopia eletrônica de varredura da superfície desses dois materiais (Figura 1S), é possível perceber que o aumento do teor de n-heptano favoreceu a formação de uma estrutura mais heterogênea, caracterizando a presença de poros.

**Figura 2.** Micrografias de microscopia ótica dos copolímeros C1 e C2

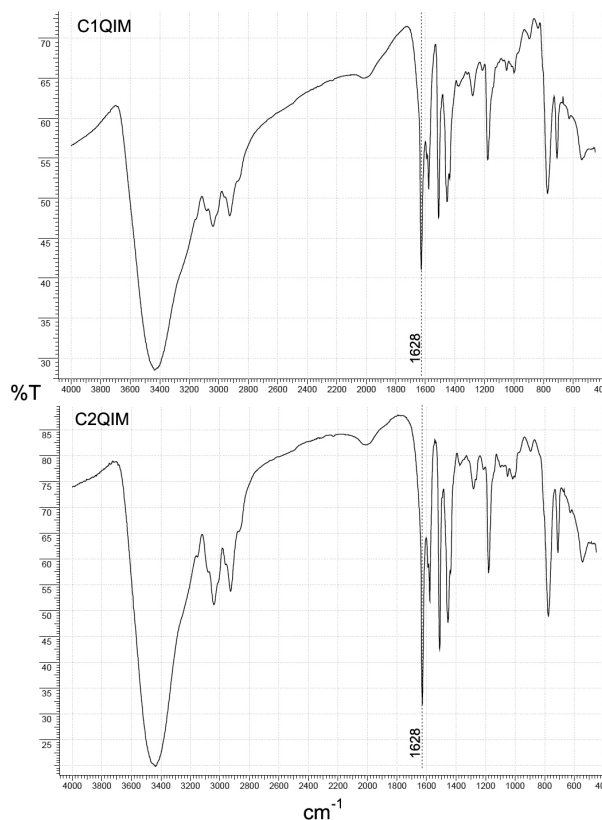
De acordo com a teoria do parâmetro de solubilidade de Hildebrand,<sup>16</sup> metanol não é um bom solvente para copolímeros de Sty-DVB. Entretanto, os copolímeros de 2Vpy-Sty-DVB apresentaram capacidade de inchamento em metanol (Tabela 1). Este comportamento pode ser explicado considerando que os copolímeros 2Vpy-Sty-DVB apresentam 70% de 2Vpy. Os parâmetros de solubilidade do metanol e da polivinilpiridina são similares. Provavelmente os parâmetros de solubilidade do metanol e dos copolímeros 2Vpy-Sty-DVB também são parecidos.

O copolímero C1 apresentou uma capacidade de inchamento em metanol superior ao copolímero C2. A capacidade de inchamento de copolímeros reticulados é atribuída, sobretudo, à expansão da fase colapsada (fase gel), que promove variação de volume.<sup>18</sup> O copolímero C2 possui maior grau de porosidade e, por isso, menor teor de massa colapsada, o que explica a sua menor capacidade de inchamento em metanol.

#### Quaternização dos copolímeros 2Vpy-Sty-DVB com iodeto de metila

Com objetivo de quaternizar o nitrogênio das unidades piridina, os copolímeros 2Vpy-Sty-DVB C1 e C2 foram reagidos com iodeto

de metila. A reação de quaternização das unidades de piridina foi acompanhada por espectrometria na região do infravermelho - FTIR (Figura 3).

**Figura 3.** Espectro de FTIR dos copolímeros C1QIM e C2QIM (C1 e C2 quaternizados com iodeto de metila)

Os espectros de FTIR dos copolímeros modificados indicam a ocorrência da reação de quaternização do nitrogênio presente nas unidades de piridina. Percebe-se uma alteração na posição e intensidade da banda de deformação angular fora do plano referente à vibração C-H do anel de piridina, em 747 cm<sup>-1</sup>, que pode ser explicada em função da maximização do efeito indutivo nessa ligação provocada pela redução da carga eletrônica no átomo de nitrogênio. Além disso, a formação do íon piridínio é evidenciada pelo aparecimento da banda de absorção de deformação axial em 1628 cm<sup>-1</sup>. O aumento da intensidade da banda de deformação axial característica de O-H indica que o copolímero quaternizado absorve maior umidade do que o copolímero de partida.<sup>17</sup> Essa alteração reflete a introdução de cargas positivas na matriz polimérica do copolímero quaternizado.

Os copolímeros C1 e C2 quaternizados foram submetidos à análise termogravimétrica (TGA) não só para verificar sua estabilidade térmica, mas também para confirmar a ocorrência da reação de quaternização (Figura 2S, material suplementar). As curvas de TGA e DTG dos copolímeros quaternizados (C1QIM e C2QIM) apresentaram diferentes perfis em relação aos copolímeros não modificados

(matriz). Os copolímeros matriz possuem apenas um patamar de degradação, enquanto os copolímeros quaternizados possuem dois estágios de decomposição. O primeiro estágio de decomposição pode ser relacionado à degradação dos grupos metilênicos e o segundo, à queima da cadeia carbônica.<sup>6,19</sup>

### Síntese dos complexos de transferência de carga com iodo

Os copolímeros 2Vpy-Sty-DVB não modificados e os copolímeros quaternizados com iodeto de metila foram impregnados com iodo, seguindo duas metodologias distintas: impregnação na presença de solvente (Metodologia I) e impregnação em fase vapor (Metodologia II).<sup>4</sup> Para verificar quais copolímeros tiveram maior teor de iodo incorporado foi realizada a análise gravimétrica. Os resultados do teor de incorporação de iodo nos copolímeros de partida e em seus derivados quaternizados são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Grau de impregnação de iodo e inchamento em água dos copolímeros 2Vpy-Sty-DVB e de seus derivados quaternizados

Copolímeros	Teor de iodo incorporado (%)		Grau de inchamento (%)
	Metodologia I (solução)	Metodologia II (vapor)	
C1	54	49	10
C2	48	57	0
C1QMI <sup>a</sup>	95	94	30
C2QMI <sup>b</sup>	82	84	15

a) Copolímero C1 quaternizado com iodeto de metila; b) copolímero C2 quaternizado

Os resultados apresentados na Tabela 2 demonstram que todos os copolímeros foram capazes de impregnar iodo e a porcentagem de iodo incorporado não variou de acordo com o tipo de metodologia de impregnação adotada. Esse resultado é um pouco diferente do verificado por Jandrey e colaboradores.<sup>10</sup> No trabalho de Jandrey foi reportado que o método de impregnação em fase vapor foi mais eficiente que o método de impregnação em fase líquida, e o copolímero com maior grau de porosidade foi impregnado em maior extensão. Neste trabalho a impregnação dos copolímeros com iodo em fase líquida foi feita em metanol. Como comentado anteriormente, o copolímero C1, com baixo grau de porosidade, apresentou uma capacidade de inchamento em metanol superior ao copolímero C2 (Tabela 1). Assim, esperava-se que esse copolímero também apresentasse um grau de incorporação de iodo maior em fase líquida, por conta da capacidade de inchamento em metanol. No entanto, essa variação foi apenas discreta. Esperava-se também que o copolímero C2 apresentasse maior grau de incorporação de iodo que o copolímero C1 em fase vapor, em função desse material conter poros fixos, que favoreceriam a difusão do iodo através da matriz polimérica. Todavia, para esses dois copolímeros, C1 e C2, a variação do teor de iodo incorporado também foi pequena.

Os copolímeros quaternizados com iodeto de metila (C1QIM e C2QIM) apresentam maior grau de incorporação do que seus respectivos copolímeros de partida (C1 e C2). Provavelmente, a introdução de cargas positivas na matriz dos copolímeros modificados favoreceu a interação desses materiais com o iodo. Analisando a Tabela 2, é possível verificar que entre os copolímeros C1QIM e C2QIM não é possível traçar uma tendência de comportamento, com relação à variação do teor de iodo e morfologia do copolímero.

Piridina reage com iodo para formar complexos moleculares estáveis do tipo  $n-\sigma$ , denominados complexos de transferência de carga (CTC).<sup>4,20</sup> A taxa de formação desses complexos de transferência

de carga é resultado de três contribuições: difusão dos reagentes e produtos através de um filme que circunda a partícula polimérica (difusão de camada de Nernst); difusão dos reagentes e solventes através da massa do polímero e, reação química entre o iodo e a piridina.<sup>21</sup> Provavelmente para o copolímero C1, do tipo gel, a taxa de formação do complexo em fase vapor foi controlada pela difusão do filme, que limitou a reação à superfície da partícula. Já para o copolímero C2, a difusão de vapor de iodo no interior da matriz polimérica deve ter sido mais lenta que a reação com piridina, provavelmente porque esse copolímero contém poros estreitos e o iodo possui elevado volume. Dessa forma, a formação dos complexos pode ter ocorrido antes que as moléculas de iodo tenham conseguido acessar a estrutura interna do polímero e tenha se limitado, também, a uma fina camada na superfície deste material. Em função disso, não foi possível perceber uma variação significativa entre os teores de iodo incorporados aos dois copolímeros em fase vapor. Já em fase líquida, é provável que a taxa de formação do complexo também tenha sido controlada pela difusão intrapartícula, uma vez que a acessibilidade do iodo é prejudicada pelo efeito de solvatação. Como consequência, a reação de impregnação, assim como em fase vapor, deve ter se limitado à superfície externa dos copolímeros.

### Avaliação da capacidade bactericida dos polímeros

Inicialmente fez-se a avaliação de capacidade bactericida dos copolímeros 2Vpy-Sty-DVB não modificados e dos copolímeros quaternizados contra suspensões de *E. coli*. Os ensaios microbiológicos foram realizados em triplicata. Os dados obtidos passaram por tratamento estatístico, foi feita a análise de variância (ANOVA) e teste t-Student ao nível de 5% de significância.

O acesso das bactérias aos grupos biocidas ou a difusão do agente biocida no meio são controlados pelas características de porosidade dos suportes poliméricos, aliadas à capacidade de inchamento desses materiais em água, pois as suspensões bacterianas são preparadas em meio aquoso.<sup>22</sup> Dessa forma, antes da avaliação biocida os copolímeros não modificados e os copolímeros quaternizados foram submetidos ao teste de inchamento em água, a fim de se avaliar o comportamento das pérolas de copolímero nesse solvente (Tabela 2).

Como já comentado, copolímeros Sty-DVB apresentam uma restrita capacidade de inchamento em solventes termodinamicamente ruins para as cadeias poliméricas como, por exemplo, a água. A presença de uma grande proporção de piridina, um monômero polar, torna os copolímeros 2Vpy-Sty-DVB mais polares como um todo e favorece a expansão das cadeias poliméricas por solventes desse tipo.<sup>16</sup> Analisando os dados de grau de inchamento em água (Tabela 2) é possível observar que os copolímeros quaternizados com iodeto de metila apresentaram maior grau de inchamento que os copolímeros não funcionalizados. Esse comportamento pode estar relacionado à presença de cargas positivas na rede polimérica dos copolímeros modificados, que resulta no aumento da capacidade de interação desses materiais com a água. O copolímero C1 (tipo gel) e seu derivado quaternizado C1QIM apresentaram maior capacidade de inchar em água que o copolímero C2 e seu derivado quaternizado C2QIM. Isso pode ser explicado considerando que copolímeros do tipo gel apresentam uma grande proporção de massa colapsada. É essa fração a maior responsável pela capacidade de inchamento desses materiais.

A ação bactericida dos copolímeros C1 e C2 e de seus derivados quaternizados com iodeto de metila foi avaliada através do ensaio de eluição em coluna. Os resultados são apresentados na Tabela 3.

Os resultados apresentados na Tabela 3 demonstraram que os copolímeros de origem (C1 e C2) não apresentaram atividade bactericida para nenhuma das concentrações avaliadas. Entretanto, seus derivados quaternizados com iodeto de metila (C1QIM e C2QIM)

**Tabela 3.** Ação bactericida dos copolímeros C1 e C2 e de seus derivados quaternizados com iodeto de metila contra suspensão de *E. coli*

Concentração inicial (células/mL)	Ação bactericida (%) <sup>a</sup>			
	Copolímero C1	Copolímero C2	Copolímero C1QIM <sup>b</sup>	Copolímero C2QIM <sup>c</sup>
2,5 x 10 <sup>3</sup>	0	0	47	29
2,3 x 10 <sup>4</sup>	0	0	44	17
2,9 x 10 <sup>5</sup>	0	0	29	6
2,1 x 10 <sup>6</sup>	0	0	20	2
2,3 x 10 <sup>7</sup>	0	0	19	3
Teste de estabilidade <sup>d</sup>	0	0	0	0
Redução (%)				

Desvio padrão relativo = 5% UFC; ação bactericida significativa > 14%; a) média de triplicatas; b) copolímero C1 quaternizado; c) copolímero C2 quaternizado; d) concentração inicial da suspensão de *E. coli* = 2 x 10<sup>3</sup> células/mL

apresentaram atividade. O copolímero C1QIM apresentou ação bactericida significativa para todas as concentrações de células, enquanto que o copolímero C2QIM se mostrou eficiente apenas para baixas concentrações de células (até 10<sup>4</sup> células/mL). Esse resultado pode estar associado ao maior grau de inchamento do copolímero C1QIM, quando em contato com a suspensão bacteriana (Tabela 2). Era esperado que o copolímero C2QIM apresentasse maior ação bactericida, em função da presença de poros fixos, porque o acesso da suspensão bacteriana aos sítios ativos mais internos seria favorecido para esse material. Entretanto, apesar do copolímero C2QIM possuir porosidade verdadeira e o copolímero C1QIM (tipo gel) não apresentar área mensurável no estado seco, no estado inchado muito provavelmente C1QIM apresentou maior área de contato que C2QIM, devido à expansão da rede polimérica quando em contato com o meio aquoso (Tabela 1). O aumento da área de contato favoreceu o acesso da suspensão bacteriana aos sítios ativos mais internos da rede macromolecular, resultando em uma ação bactericida mais eficiente.

Em adição, os dados de estabilidade demonstraram que os dois copolímeros quaternizados são desinfetantes de contato: não foi observada redução do número de células de *E. coli* adicionadas a soluções salinas eluídas através das colunas contendo os copolímeros, o que está de acordo com a literatura.<sup>2,8</sup>

Na Tabela 4 são apresentados os dados de ação bactericida dos complexos de transferência de carga (CTC) obtidos a partir da impregnação dos copolímeros C1 e C2 e seus derivados quaternizados com iodo.

A impregnação com iodo acarretou em um aumento considerável da atividade biocida de todos os materiais. Analisando os dados de

atividade bactericida para os complexos de transferência de carga C1-I, C1-II, C2-I e C2-II (Tabela 4) é possível observar que, de forma geral, os complexos de transferência de carga oriundos do mesmo copolímero apresentaram perfis de ação bactericida semelhantes. Esses materiais mostraram eficiência bactericida máxima para a concentração de até 10<sup>5</sup> células/mL e eficiência intermediária para a concentração de 10<sup>6</sup> células/mL. A ação equivalente, possivelmente, está relacionada com a semelhança no teor de iodo incorporado (Tabela 2).

Os complexos de transferência de carga obtidos a partir dos copolímeros quaternizados (C1QIM-I, C1QIM-II, C2QIM-I e C2QIM-II) apresentaram excelente atividade bactericida (Tabela 4), tendo um desempenho melhor que os complexos de transferência de carga obtidos a partir dos copolímeros não modificados e impregnados com iodo. Esse comportamento pode ser atribuído ao maior teor de iodo incorporado por esses materiais quaternizados (Tabela 2), indicando que a reação de quaternização com iodeto de metila acarreta em um aumento da eficiência bactericida dos complexos de transferência de carga.

Comparando o desempenho dos complexos de transferência de carga obtidos a partir dos copolímeros quaternizados, é possível inferir que, de forma geral, os produtos derivados do copolímero C1 apresentaram melhor ação bactericida. A maior ação desses materiais pode estar associada à maior capacidade de inchamento em água, o que favoreceu a difusão de iodo ou o acesso das bactérias aos centros ativos, tornando esses materiais mais eficientes.

De forma contrária ao observado por Jandrey,<sup>4,14,16</sup> os testes de estabilidade demonstraram que os complexos de transferência de carga com iodo são agentes de liberação de demanda, a maior parte dos complexos liberou iodo no meio capaz de matar as células *E. coli*. Contudo, esse fato não pode ser encarado como prejudicial à proposta do material sintetizado, uma vez que a concentração de iodo no meio é ínfima e ocorre de forma gradativa. O teor de iodo liberado é insuficiente para formação dos subprodutos da desinfecção, entretanto suficiente para matar as células patogênicas adicionadas.<sup>5</sup>

## CONCLUSÃO

Copolímeros 2Vpy-Sty-DVB foram quaternizados com iodeto de metila e impregnados com iodo para obtenção de complexos de transferência de carga. Os copolímeros não modificados não apresentaram ação bactericida significativa contra *E. coli*. Entretanto, a quaternização desses materiais com iodeto de metila acarretou em ação bactericida da ordem de 30-50% para baixas concentrações de *E. coli*. A impregnação com iodo causou um aumento considerável da atividade biocida de todos os copolímeros. Os complexos de transferência de carga derivados dos copolímeros quaternizados

**Tabela 4.** Ação bactericida dos complexos de transferência de carga (CTC) contra suspensão de *E. coli*

Concentração inicial (células/mL)	Ação bactericida (%) <sup>a</sup>							
	C1-I <sup>b</sup>	C1-II <sup>c</sup>	C2-I <sup>b</sup>	C2-II <sup>c</sup>	C1QIM-I <sup>b</sup>	C1QIM-II <sup>c</sup>	C2QIM-I <sup>b</sup>	C2QIM-II <sup>c</sup>
2,6 x 10 <sup>3</sup>	100	100	100	100	100	100	100	100
2,1 x 10 <sup>4</sup>	100	100	100	100	100	100	100	100
2,5 x 10 <sup>5</sup>	98	100	100	72	100	100	100	100
2,4 x 10 <sup>6</sup>	19	61	60	33	100	100	100	100
2,1 x 10 <sup>7</sup>	18	20	0	0	100	100	16	28
Teste de Estabilidade <sup>d</sup>	95	92	100	40	100	100	100	80
Redução (%)								

Desvio padrão relativo = 5% UFC; ação bactericida significativa > 14%; a) média de triplicatas; b) impregnação na presença de solvente; c) impregnação em fase vapor; d) concentração inicial da suspensão de *E. coli* = 2 x 10<sup>3</sup> células/mL

mostraram-se mais eficientes que os complexos obtidos a partir dos copolímeros não modificados. O fator morfológico que contribuiu mais significativamente para aumento da atividade biocida foi a capacidade de inchamento em meio aquoso. De forma geral, os complexos de transferência de carga oriundos do copolímero C1 (tipo gel), com maior capacidade de inchamento em água, apresentaram maior eficiência bactericida do que aqueles originados do copolímero C2 (poroso). Os complexos de transferência de carga com iodo mostraram-se agentes de liberação de demanda.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

Disponível em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, à FAPERJ e à CAPES/PRODOC pelo apoio financeiro; à Nitriflex Ind. e Com. S.A. e Petroflex Ind. e Com. S.A. pela doação dos monômeros.

## REFERÊNCIAS

1. Hu, F. X.; Neoh, K. G.; Cen L.; *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, *89*, 474.
2. Jiang, S.; Wang, L.; Yu, H.; Chen, Y.; *React. Funct. Polym.* **2005**, *62*, 209.
3. Santos, C. L.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 1989.
4. Jandrey, A. C.; *Tese de Doutorado*, Instituto Militar de Engenharia, Brasil, 2007.
5. Valle, A. S. S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, 2008.
6. Coutinho, F. M. B.; Cunha, L.; Gomes, A. S.; *Polímeros: Ciência e Tecnologia* **2004**, *14*, 31; Gomes, V. T.; Coutinho, F. M. B.; Gomes A. S.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 754; Cunha, L.; Gomes, A. S.; Coutinho, F. M. B.; Teixeira, V. G.; *Polímeros: Ciência e Tecnologia* **2007**, *17*, 145; Cunha, L.; Coutinho, F. M. B.; Teixeira, V. G.; de Jesus, E. F. O.; Gomes, A. S.; *Polym. Bull.* **2008**, *61*, 319; Costa, P. A.; Teixeira, V. G. J.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, *116*, 3070.
7. Cheng, Z.; Zhu, X.; Shi, Z. L.; Neoh, K. G.; Kang, E. T.; *Ind. Eng. Chem. Res.* **2005**, *44*, 7098.
8. Gelman, M. A.; Weisblum, B.; Lynn, D. M.; Gellman, S. H.; *Org. Lett.* **2004**, *6*, 557.
9. Chen, Y.; Worley, S. D.; Huang, T. S.; Weese, J.; Kim, J.; Wey, C-I.; Williams, J. F.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, *92*, 368.
10. Jandrey, A. C.; Santa Maria, L. C.; Aguiar, A. P.; Aguiar, M. R. M. P.; Mazzei, J. L.; Felzenszwalb, I.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, *93*, 972.
11. Iconopoulou, S. M.; Andreopoulou, A. K.; Soto, A.; Kallitsis, J. K.; Voyiatzis, G. A. J.; *Controlled Release* **2005**, *102*, 223.
12. Jandrey, A. C.; Aguiar, A. P.; Aguiar, M. R. M. P.; Santa Maria, L. C.; Mazzei, J. L.; Felzenszwalb, I.; *Eur. Polym. J.* **2007**, *43*, 4712.
13. Kenawy, E. R.; Worley, S. D.; Broughton, R.; *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1359.
14. Adelman, R.; Mennicken, M.; Popescu, D.; Heine, E.; Keul, H.; Moeller, M.; *Eur. Polym. J.* **2009**, *45*, 3093.
15. ASTM D 1895-69, *Annual Book of ASTM*, Philadelphia, 1975.
16. Grulke, E. A. Em *Polymer Handbook*; Brandrup, J.; Immergut E. H.; Grulke, E. A., eds.; John Wiley & Sons Inc: New Jersey, 1999, cap. 11.
17. Colthup, N. B.; Daly, L. H.; Wiberley, S. E.; *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*, Academic Press: New York, 1964.
18. Teixeira, V. G.; Coutinho, F. M. B.; Petrocínio, F. R. M.; Gomes, A. S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 951.
19. Lucas, E. F.; Soares, B. G.; Monteiro, E.; *Caracterização de polímeros. Determinação de peso molecular e análise térmica*, E. Papers: Rio de Janeiro, 2001.
20. Stankovic, R. I.; Lenz, R. W.; Karasz, F. E.; *Eur. Polym. J.* **1990**, *26*, 359.
21. Chakrabarti, A.; Sharma, M. M.; *React. Polym.* **1993**, *20*, 1.