

POLÍMERO BIODEGRADÁVEL ANTIMICROBIANO ATRAVÉS DA ADITIVAÇÃO COM COMPOSTOS À BASE DE ZINCO**Ana P. Capelezzo^{a,*}, Laura C. Mohr^{a,#}, Francieli Dalcanton^{a,x}, Carolina R. D. M. Barreta^{a,#}, Maria A. P. M. Martins^b, Márcio A. Fiori^{a,#,x} e Josiane M. M. de Mello^{a,#,x}**^aUniversidade Comunitária da Região de Chapecó, Chapecó – SC, Brasil^bDepartamento de Química, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão – SC, Brasil

Recebido em 06/07/2017; aceito em 11/12/2017; publicado na web em 01/02/2018

ANTIMICROBIAL BIODEGRADABLE POLYMER THROUGH ADDITIVATION WITH ZINC BASED COMPOUNDS. Antimicrobial packaging is a promising type of active packaging, which has an antimicrobial agent incorporated into the polymer matrix, capable to eliminate or inhibit deteriorating and/or pathogenic microorganisms. The zinc compounds are antimicrobial agents commonly used to confer this feature. The objective of this work was to evaluate the antimicrobial activity of biodegradable Ecoflex[®] films with 1% and 2% (w/w) zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) and 1% and 2% (w/w) glass microparticles doped with ionic zinc (Zn MCs), against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The sample's biodegradation in soil also were studied. Microbiological results showed that biodegradable polymeric films obtained were effective to inhibit and/or kill *S. aureus* and *E. coli* at the initial concentration of 10⁴ CFU.mL⁻¹ after 24 h of contact. When evaluated the biodegradation of the polymers containing the additives, the results showed that the addition of zinc compounds to the biodegradable polymer did not affect its biodegradability characteristic. The antimicrobial biodegradable films developed have potential application to the food packaging industry.

Keywords: biodegradable polymers; Ecoflex[®]; zinc compounds; antimicrobial activity; biodegradation.**INTRODUÇÃO**

A necessidade de prolongar a vida útil dos alimentos demanda pesquisas e inovações que ofereçam soluções no segmento de embalagens, por isso essa temática apresenta um significativo crescimento e relevância. Tendências atuais sugerem o desenvolvimento de embalagens funcionais contendo agentes antimicrobianos capazes de inibir ou até mesmo causar a morte de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos e embalagens ambientalmente favoráveis às quais possuem um baixo nível de impacto ambiental.¹

O controle dos agentes deteriorantes e/ou patogênicos torna-se indispensável, garantindo que alimentos de qualidade cheguem aos consumidores finais. Assim, o emprego de embalagens antimicrobianas, as chamadas embalagens ativas, apresenta-se como uma alternativa interessante no que diz respeito à preservação dos alimentos. Estas embalagens ativas contribuem para o retardo do processo de deterioração, aumentando a vida útil dos alimentos acondicionados, proporcionando a manutenção da qualidade e segurança alimentar.²⁻⁵

O uso de micropartículas e nanopartículas antimicrobianas tem se mostrado uma alternativa promissora no controle da contaminação de alimentos ocasionada por bactérias e fungos patogênicos. Este controle é de grande interesse para a saúde pública e para mitigar grandes prejuízos econômicos devido ao descarte prematuro dos alimentos contaminados por estes microrganismos nocivos à saúde humana e animal.^{4,6} Deste modo, recomenda-se a incorporação de agentes antimicrobianos à diferentes matrizes poliméricas empregadas na fabricação de embalagens de alimentos, de modo a inibir ou até mesmo matar os microrganismos presentes em alimentos e demais superfícies contaminadas.

Existem diversos tipos de partículas de óxidos metálicos e íons que podem ser aplicados para tal finalidade, como exemplo cita-se

íons ou nanopartículas de prata (Ag), ouro (Au), cobre (Cu), dióxido de titânio (TiO₂), óxido de magnésio (MgO), óxido de cálcio (CaO) e óxido de zinco (ZnO). Tanto na forma de micropartículas, quanto de nanopartículas, ou de espécies iônicas, estas podem ser aplicadas como aditivos antimicrobianos em diferentes materiais poliméricos.^{5,7,8} Especialmente na forma de nanopartículas, podem revelar ou magnificar as propriedades antibacteriana e antifúngica devido, principalmente, ao seu pequeno tamanho e grande área superficial específica.

Em particular, os compostos de zinco têm se mostrado eficientes agentes antimicrobianos e, ainda, têm despertado interesse devido algumas propriedades multifuncionais e características importantes, como o efeito fotocatalítico, a sua atoxicidade em concentrações relativamente elevadas e o seu baixo custo. O ZnO, por exemplo, é classificado em um grupo de agentes antimicrobianos inorgânicos altamente seguros e extremamente estáveis termicamente, quando comparado aos agentes antimicrobianos orgânicos.⁹⁻¹²

Essas espécies interagem com a parede celular bacteriana resultando na destruição da integridade celular, por mecanismos de liberação de íons de zinco (Zn²⁺), diferenças de potencial elétrico relativamente elevadas e a formação de espécies reativas de oxigênio.¹² Na forma de nanopartículas, possui vantagens devido à relação volume/área, o que garante a manutenção da atividade antimicrobiana mesmo na presença de pequena quantidade de espécies.¹³ As microcápsulas de vidro dopadas com zinco iônico, por sua vez, possuem o princípio de ação antimicrobiana atribuído em função do Zn²⁺ e permite excelentes distribuições em diferentes matrizes e elevada atividade antimicrobiana.^{7,8}

Já existem no mercado diversos polímeros convencionais com propriedades antimicrobianas e sendo aplicados em embalagens.^{5,7,8,14-19} Porém, devido à biodegradação lenta pelo meio ambiente dessa classe de polímeros é que se preconiza o estudo e aplicação de polímeros biodegradáveis. A proposta de adicionar compostos antimicrobianos em polímeros biodegradáveis tem como objetivo principal aumentar a vida útil de produtos alimentícios, cosméticos

*e-mail: ana_cap@unochapeco.edu.br

[#]Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais^xPrograma de Pós-Graduação em Tecnologia e Gestão da Inovação

e medicamentos, mas utilizando esta classe de polímeros como um diferencial ambiental. Porém, a ação antimicrobiana deverá ser agregada sem causar prejuízos significativos nas propriedades de biodegradação da matriz polimérica.

O poli (butileno adipato co-tereftalato) (PBAT) é um polímero biodegradável que vem sendo estudado e sugerido para a fabricação de embalagens. Pertence à classe dos co-poliésteres alifáticos aromáticos chamado comercialmente de Ecoflex®, constituído por dois tipos de dímeros, um de seção rígida formada por uma unidade de repetição de éster que consiste em 1,4 butanodiol e os monômeros de ácido tereftálico; e outro de seção flexível, que consiste em 1,4 butanodiol e monômeros de ácido adípico.²⁰ O PBAT possui propriedades semelhantes ao Polietileno de Baixa Densidade (PEBD) devido a sua alta massa molecular e estrutura química de cadeia longa ramificada. Possui características como elasticidade, resistência à água e à ruptura, processável em plantas de filme soprado convencionais como o Polietileno (PE), imprimíveis, soldáveis e adequados para contato com alimentos.²¹

O polímero biodegradável PBAT vem sendo proposto^{22,23} como um bom polímero biodegradável para uso em embalagens. Porém, como polímero antimicrobiano por aditivação com compostos à base de zinco praticamente não há trabalhos tecnológicos e científicos tratando do tema ainda. Um dos poucos trabalhos relata o desenvolvimento de filmes de PBAT/NPs-ZnO (nanopartículas de óxido de zinco) e avalia as propriedades mecânicas e microbiológicas frente às bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), mas não avalia o efeito na biodegradabilidade.²⁴ A literatura apresenta alguns trabalhos que fazem o uso de outros polímeros biodegradáveis e compostos de zinco para a obtenção de filmes antimicrobianos, porém em um número consideravelmente muito menor do que os polímeros convencionais.²⁵⁻²⁸

Este artigo reporta a preparação, caracterização e comparação de filmes de Ecoflex®/NPs-ZnO e de Ecoflex®/MCs-Zn (microcápsulas de vidro dopadas com zinco iônico) com percentuais de 1 e 2% (m/m) em relação à propriedade antimicrobiana e de biodegradação. Para as avaliações microbiológicas os filmes foram testados com bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

O Ecoflex® possui ponto de fusão de 110-120 °C, densidade de 1,25-1,27 g cm⁻³ e massa molar de 14,2×10⁴ g mol⁻¹ dados estes fornecidos pela BASF. As NPs-ZnO e as MCs-Zn foram gentilmente fornecidas pela *Kher Group*. As NPs-ZnO possuem formato de bastão com diâmetro médio de aproximadamente 20 nm e com diferentes comprimentos que podem atingir valores de até 200 nm. As MCs-Zn são constituídas por micropartículas com dimensões entre 1 mm e 10 mm e formatos irregulares.

Métodos

Atividade antimicrobiana das NPs-ZnO e MCs-Zn

A atividade antimicrobiana das NPs-ZnO e MCs-Zn foi avaliada contra *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 8739) usando o método de halo de inibição conforme as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute*.²⁹ Os testes foram realizados em triplicata. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (marca Quimis, modelo Q316m5) a 37±1 °C por 24 h e posteriormente foram mensurados os diâmetros dos halos de inibição de acordo com a Equação 1.

$$\text{Halo de inibição} = D_{\text{ex}} - D_{\text{in}} \quad (1)$$

sendo: *D*_{ex}: diâmetro externo formado pela ação do agente antimicrobiano sobre os microrganismos (mm) *D*_{in}: diâmetro ocupado pelo agente antimicrobiano (mm).

Os resultados foram submetidos ao teste de *Tukey* de modo a avaliar a existência de diferenças significativas ao nível de significância 5% (*p* < 0,05).

Preparação dos filmes poliméricos biodegradáveis

Os aditivos antimicrobianos, NPs-ZnO e MCs-Zn, foram secos em estufa (marca Cid, modelo 311 cg), sob temperatura de 70 °C durante 1 h. Tanto as NPs-ZnO, quanto as MCs-Zn foram misturadas manualmente com os *pellets* de Ecoflex® em um béquer utilizando um bastão de vidro nas concentrações de 1 e 2% (m/m), até a completa homogeneização. Após, o processamento foi realizado em uma extrusora industrial monorosca (marca Oryzon), que possui sete zonas de aquecimento, sendo que as quatro primeiras foram mantidas à 130 °C e as demais à 145 °C. A velocidade de rotação da rosca foi de 85 rpm.

Atividade antimicrobiana dos filmes poliméricos

As amostras dos filmes poliméricos foram submetidas ao teste de contagem de microrganismos sobreviventes com o tempo (curva de morte), de acordo com a norma internacional JIS Z 2801 (2010).³⁰ O objetivo desta análise foi avaliar a capacidade de inibição do crescimento ou morte das bactérias na superfície das amostras de filmes poliméricos.

As suspenções bacterianas de *S. aureus* e *E. coli* foram cultivadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, marca Himedia) durante 24 h a 37±1 °C e após ajustadas em solução de cloreto de sódio (NaCl, marca Merck) a 0,85% para uma concentração de 10⁴ UFC mL⁻¹. Para tal, utilizou-se um espectrofotômetro (marca Bel photonics, modelo 1105) no comprimento de onda de 619 nm, sendo que para se obter tal concentração de microrganismos a absorbância lida no equipamento deveria estar entre 0,04 e 0,049.

O preparo da amostra consistiu na adição de 40 µL da suspensão bacteriana a cada corpo de prova (4x4 cm) e adição de 1 mL de solução de NaCl a 0,85% ao redor de cada um destes. Uma lâmina de vidro estéril foi colocada sobre cada corpo de prova a fim de espalhar a alíquota de bactérias por toda extensão dos mesmos. Após, as placas foram encaminhadas à estufa bacteriológica à 37±1 °C por um período de tempo de 0, 1, 3, 6 e 24 h.

Em cada tempo retirou-se uma amostra da estufa, e esta foi inserida em um saco de *stomacher* (marca Nazco whirl-pak) juntamente com 10 mL de solução de NaCl a 0,85% e, então, homogeneizada por aproximadamente 1 min (amostra 10⁰). A partir desta foram feitas duas diluições seriadas.

Retirou-se 0,1 mL do saco de *stomacher* e das respectivas diluições que foram semeados em profundidade juntamente com 7 mL caldo *Mueller Hinton* (marca Merck). As placas de petri foram homogeneizadas e incubadas em estufa bacteriológica na posição invertida a 37±1 °C por um período de 24 h. Repetiu-se o procedimento para todos os tempos de análise, sendo que os ensaios foram realizados em triplicata.

Após decorridas as 24 h de incubação, as placas amostradas foram retiradas da estufa bacteriológica para realização da contagem das Unidades Formadoras de Colônias por cm² (UFC cm⁻²). As placas com quantidade de colônias entre 30 e 300 foram submetidas à contagem e o número de bactérias viáveis por cm² foi determinado de acordo com a Equação 2.

$$N = \frac{C * D * V}{A} \quad (2)$$

sendo: *N*: número de bactérias viáveis por cm², *C*: número de colônias

(UFC cm⁻²), D: fator de diluição (adimensional); V: volume (mL) de solução de NaCl a 0,85% usada para lavagem da amostra (10 mL) e A: área superficial (16 cm²).

Os resultados foram submetidos ao teste de *Tukey* de modo a avaliar a existência de diferenças significativas ao nível de significância 5% ($p < 0,05$). Estes foram expressos em quantidade normalizada de colônias bacterianas por cm² de amostra.

Teste de Biodegradação

O ensaio de biodegradação foi realizado conforme as normas da *American Society for Testing and Materials* através da ASTM D-5988-12 (*Standard Test Method for Determining Aerobic Biodegradation of Plastic Materials in Soil*)³¹ e ASTM D 5338-11 (*Standard test method for determining aerobic biodegradation of plastic materials under controlled composting conditions, incorporating thermophilic temperatures*)³² com adaptações propostas por *Mariani et al.*³³

O solo utilizado no ensaio de biodegradação foi de uma floresta, caracterizado como latossolo, localizado na região da cidade de Chapecó – SC, no mês de outubro de 2016. A coleta foi realizada na profundidade de 10 cm em relação à camada superficial. Este solo foi peneirado para uma granulometria de 2 mm, e sua umidade foi determinada em estufa (marca Quimis, modelo Q314M252) à uma temperatura de 105 °C por 72 h (até obtenção de massa constante), utilizando-se 50 g de amostra, sendo que este ensaio foi realizado em triplicata. A umidade do solo foi ajustada para 60% da capacidade máxima de retenção (CRA) e a metodologia utilizada para determinação da capacidade máxima de retenção foi a ISO 17512-2,³⁴ sendo este ensaio também realizado em triplicata. A determinação de nitrogênio, carbono orgânico e relação C/N foi realizada pelo laboratório de solos da Epagri – SC.

Dentro de cada frasco de vidro de 3 L foram colocadas porções de 200 g de solo *in natura*, juntamente com uma amostra de cada filme polimérico (2x2 cm) enterrados na porção de solo, um frasco de vidro *snap cap* contendo 10 mL de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH, marca Merck) 0,5 mol L⁻¹ e outro contendo 30 mL de água destilada. Os frascos de vidro foram vedados utilizando um filme de PVC (Poli cloreto de vinila), de modo a não haver interferência do gás carbônico (CO₂) do ar. O ensaio de biodegradação foi realizado com os dois filmes poliméricos aditivados com NPs-ZnO (1 e 2%), os dois filmes poliméricos aditivados com MCs-Zn (1 e 2%) e com o filme polimérico sem aditivo. Frascos de vidro contendo apenas solo foram usados como branco. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os frascos de vidro foram incubados em uma estufa incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO, marca Dist) a uma temperatura de 28±2 °C e na ausência de luz.

A cada 3 dias os recipientes de vidro foram retirados da estufa e 1 mL de uma solução de Cloreto de bário (BaCl₂, marca Dinâmica) 0,5 mol L⁻¹ foi adicionado em cada um dos respectivos *snap caps*, que continham NaOH. Este procedimento proporcionou a precipitação do carbonato de bário resultante da reação do carbonato formado com o bário adicionado, possibilitando desta forma a quantificação do CO₂ gerado no processo de biodegradação, sem nenhum interferente. Os *snap caps* foram retirados do interior dos recipientes de vidro e aguardado um período de 30 minutos para a decantação do carbonato de bário. O NaOH remanescente, que não reagiu com o CO₂, foi titulado com ácido clorídrico (HCl, marca Vetec) 0,5 mol L⁻¹, padronizado conforme descrito por *Morita e Assumpção*,³⁵ utilizando como indicador a fenolftaleína 1%. A solução de NaOH foi repostada nos *snap caps*, e estes foram novamente inseridos nos recipientes de vidro, fechados com filme de PVC e levados novamente a estufa incubadora DBO.

Através da relação estequiométrica foi possível calcular a quantidade de CO₂ produzida no processo de biodegradação dos materiais poliméricos, conforme mostra a Equação 3.

$$m_{CO_2} = (V_{HCl,gasto\ para\ titular\ o\ branco} - V_{HCl,gasto\ para\ titular\ a\ amostra}) * 0,5 * 22 \quad (3)$$

sendo: m_{CO₂}: massa de CO₂ produzido no processo de biodegradação (mg); V_{HCl}: volume de ácido clorídrico gasto na titulação (mL); 0,5: normalidade do HCl; 22: equivalente grama do CO₂.

Para garantir que a umidade do solo ficasse acima de 60% durante todo o experimento, após decorridos 30 dias adicionou-se 2 mL de água destilada no solo a cada 6 dias, sendo este procedimento realizado até os 90 dias de ensaio. A comparação da quantidade de CO₂ produzida pelos diferentes filmes poliméricos foi avaliada empregando o método estatístico de *Tukey* com significância de 5% ($p < 0,05$).

No instante inicial e após 90 dias de ensaio de biodegradação uma amostra de cada filme polimérico, mantida nas mesmas condições dos demais testes, foi analisada por microscopia óptica (MO), utilizando um estereoscópio (marca Tecnival, modelo binocular SQZDS4B170) com aumento de 50 vezes. Após 90 dias de ensaio de biodegradação as amostras foram lavadas com água destilada e secas naturalmente, e posteriormente analisadas por microscopia óptica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade antimicrobiana das NPs-ZnO e MCs-Zn

Os ensaios de inibição microbiológica mostraram atividade antimicrobiana por difusão em meio sólido dos aditivos NPs-ZnO e MCs-Zn, com a formação de halos de inibição para ambos, conforme pode ser observado na Figura 1. Com as NPs-ZnO frente à *S. aureus* e *E. coli* os halos de inibição foram de 7,3±0,6 mm e 2,0±1,0 mm, respectivamente. Com as MCs-Zn o valor dos halos de inibição foram de 7,0±1,0 mm e 4,7±2,1 mm, respectivamente.

É possível constatar que tanto para as NPs-ZnO quanto para as MCs-Zn os maiores halos de inibição são observados para a bactéria gram-positiva *S. aureus*, resultado já esperado, pois as células bacterianas gram-positivas possuem apenas uma camada exterior como membrana plasmática, o que facilita a penetração de compostos antimicrobianos e a interação com o citoplasma bacteriano, tornando as gram-positivas mais susceptíveis quando comparadas as gram-negativas. As bactérias gram-negativas possuem uma membrana adicional, formando uma estrutura de bicamada fosfolipídica mais resistente que aumenta a proteção citoplasmática de agentes antimicrobianos, a exemplo da bactéria *E. coli*.³⁶

A maior resistência da bactéria *E. coli*, em relação a *S. aureus*, pode também ser possivelmente atribuída à diferença na polaridade da membrana celular, uma vez que a membrana da *S. aureus* tem carga negativa menor quando comparada à membrana da *E. coli*.³⁷ Com diferenças menores de carga é possível maiores fluxos de penetração de radicais livres, tais como radicais hidroxila, superóxido e íons peróxido, para o citoplasma. Este efeito conduz com maior facilidade a morte celular das bactérias *S. aureus* em relação a *E. coli*.³⁸

Além disso, vários fatores podem afetar a atividade antimicrobiana, entre os quais o tamanho das nanopartículas e, desta forma, a área de superfície, bem como a sua atividade em sinergia com outros agentes antimicrobianos.⁴ Quando comparados os diferentes aditivos antimicrobianos frente à mesma bactéria, observou-se com análises estatísticas, que não houve diferença significativa entre ambos. Ou seja, um efeito antimicrobiano muito semelhante é observado para as NPs-ZnO e MCs-Zn quando estudada a mesma estirpe bacteriana.

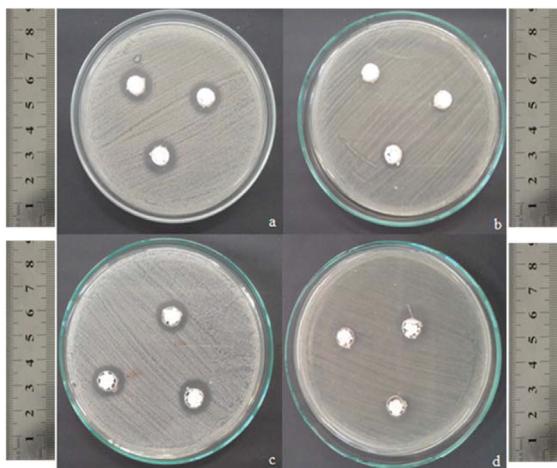


Figura 1. Resultados dos testes de difusão em meio sólido a partir de orifício para as NPs-ZnO e MCs-Zn. (a) NPs-ZnO/*S. aureus*, (b) NPs-ZnO/*E. coli*, (c) MCs-Zn/*S. aureus*, (d) MCs-Zn/*E. coli*

Atividade antimicrobiana dos filmes poliméricos

As Figuras 2 e 3 apresentam os resultados microbiológicos obtidos com curvas de morte, para as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente, para os filmes poliméricos de Ecoflex® aditivados com 1 e 2% (m/m) de NPs-ZnO. O filme polimérico de Ecoflex® puro também foi submetido a este ensaio microbiológico.

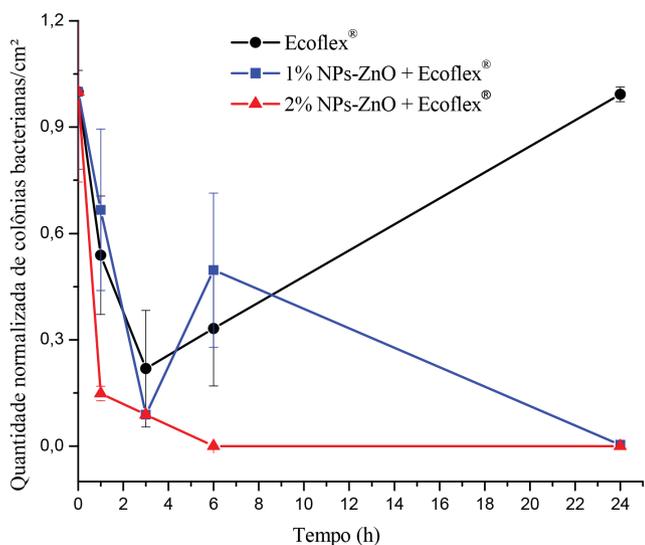


Figura 2. Curva de morte obtida com os filmes poliméricos de Ecoflex® aditivados com 1 e 2% (m/m) de NPs-ZnO e para o filme polimérico de Ecoflex® puro frente a bactéria *S. aureus*

Os resultados apresentados na Figura 2 comprovam que os filmes poliméricos aditivados apresentaram atividade antimicrobiana contra a bactéria *S. aureus*. Verifica-se que com a maior concentração de aditivo (2% m/m), a partir de 6 h de contato com os microrganismos, ocorre a redução de 100,0±0% das bactérias. Com o filme polimérico aditivado com 1% (m/m) de NPs-ZnO a redução é de 99,7±0,5% após 24 h, o que também pode ser considerado um ótimo desempenho antibacteriano.

A partir da análise estatística verifica-se que não há diferenças significativas da atividade antibacteriana após 24 horas entre os filmes aditivados com as duas concentrações de nanopartículas. Notoriamente observa-se que o filme puro de Ecoflex® não apresenta atividade antibacteriana.

Os filmes aditivados com 1% de NPs-ZnO proporcionaram desvio relativamente grande para os resultados de curva de morte, possivelmente associados à pequena quantidade de nanopartículas, à dispersão não homogênea ao longo da matriz polimérica e à formação de aglomerados. A atividade antimicrobiana dos filmes poliméricos aditivados com diferentes percentuais de NPs-ZnO pode ser prejudicada devido a uma possível aglomeração das NPs-ZnO ao longo da matriz polimérica, que pode promover a formação de *clusters* localizados em regiões específicas das amostras.⁸

Para o Ecoflex® puro a quantidade de bactérias após 24 h de análise é muito semelhante à quantidade inicial, mostrando que este polímero sem a aditivação não apresenta propriedade antibacteriana. Porém, nas primeiras horas de contato das bactérias com o filme polimérico houve uma redução da contagem de células bacterianas, possivelmente devido à adaptação das mesmas no filme polimérico, que gera um estresse levando algumas células à morte. Esse comportamento pode ser visualizado nas Figuras 2 a 5.

A Figura 3 mostra as curvas de morte obtidas com a bactéria *E. coli*. Os resultados indicam uma queda brusca na quantidade de colônias bacterianas próximas de zero nas primeiras horas de contato com o filme polimérico. Após 24 horas, a redução atinge valores percentuais de redução próximo a 77,5±1,8% para os filmes poliméricos aditivados com 1% (m/m) de NPs-ZnO e de 99,1±1,2% para os filmes aditivados com 2% (m/m) de NPs-ZnO. Com o percentual de aditivação avaliado não foi possível causar a morte da totalidade das células bacterianas, possivelmente por se tratar de bactérias gram-negativas e por isso serem mais resistentes que *S. aureus*.³⁶

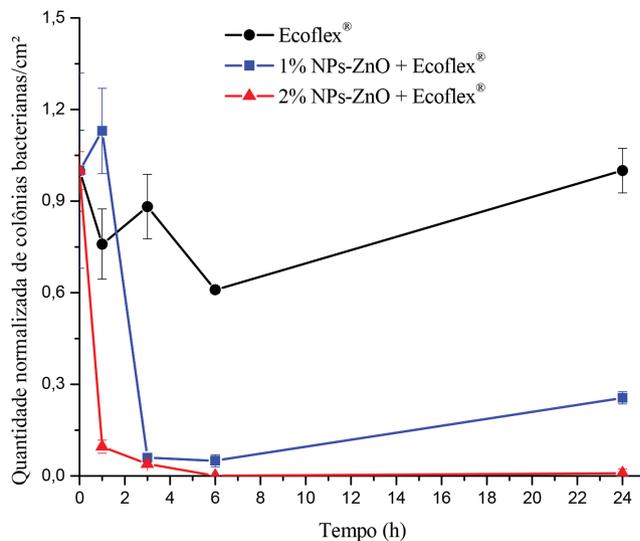


Figura 3. Curva de morte obtida com os filmes poliméricos de Ecoflex® aditivados com 1 e 2% (m/m) de NPs-ZnO e para o filme polimérico de Ecoflex® puro frente a bactéria *E. coli*

A partir da análise estatística verificou-se que o efeito antimicrobiano do filme de Ecoflex® puro diferiu estatisticamente dos filmes aditivados com 1 e 2% (m/m) de NPs-ZnO e que houve diferença estatisticamente significativa entre os percentuais de aditivos. Logo, quando avaliada a propriedade antibacteriana frente à bactéria *E. coli* é necessária uma quantidade de aditivo maior para inibir o crescimento das células bacterianas acima de 99,0%, efeito observado com a menor concentração de aditivo quando estudada a bactéria *S. aureus*.

Kirschner *et al.*⁸ estudaram a incorporação do *masterbatch* de PEBD preparados com NPs-ZnO em Poliamida 6 (PA6) e testaram sua atividade antimicrobiana frente a *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) e *S. aureus*. Os autores verificaram que a atividade antibacteriana foi eficiente, porém foi observada uma elevada dispersão

para os valores medidos. A alta dispersão pode ser associada a uma possível falta de homogeneização na matriz da PA6-PEBD/NPs-ZnO. As nanopartículas formaram aglomerados e dessa forma a distribuição das mesmas ficou prejudicada, impossibilitando que a atividade antimicrobiana fosse verificada em toda a extensão da placa.

As Figuras 4 e 5 apresentam as curvas de morte obtidas para os filmes poliméricos de Ecoflex® aditivados com 1 e 2% (m/m) de MCs-Zn, com as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente, além do filme polimérico de Ecoflex® puro (branco).

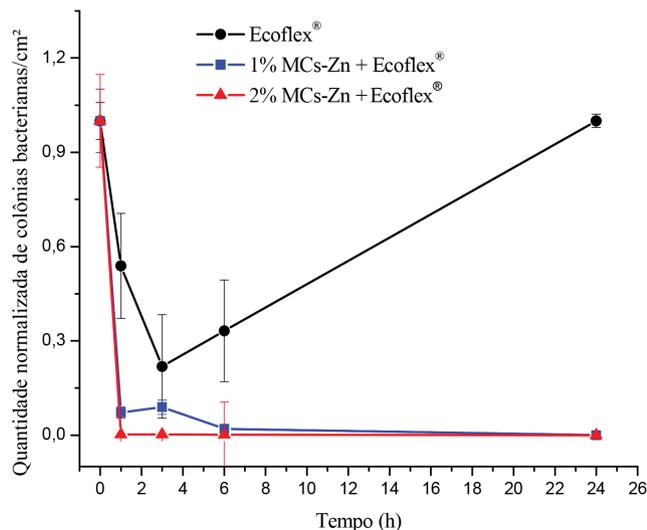


Figura 4. Curva de morte obtida com os filmes poliméricos de Ecoflex® aditivados com 1 e 2% (m/m) de MCs-Zn e para o filme polimérico de Ecoflex® puro frente a bactéria *S. aureus*

Os filmes aditivados com 1% (m/m) de MCs-Zn, após 6 horas, reduzem consideravelmente a quantidade de colônias bacterianas de *S. aureus*, sendo que em 24 h ocorre a inibição total. Com os filmes aditivados com 2% (m/m) de MCs-Zn observa-se, após 1 hora, a inibição total das colônias bacterianas. O valor percentual de aditivo demonstrou ser um fator positivo na redução do tempo de morte bacteriana quando avaliada a bactéria *S. aureus*. A análise estatística mostrou que há diferença significativa entre o filme de Ecoflex® puro e os filmes obtidos com diferentes percentuais de MCs-Zn após 24 h de análise e que não há diferença estatística entre os aditivos antimicrobianos após 24 h de análise.

Através da Figura 5 foi possível verificar que tanto para 1% (m/m) quanto para 2% (m/m) de MCs-Zn após 24 h de contato do filme polimérico com a bactéria *E. coli* ocorreu 100±0% da morte celular, mostrando-se como potencial agente antimicrobiano. Novamente, o efeito antimicrobiano foi menor ao longo do tempo para *E. coli* quando comparado a *S. aureus*, fato este já esperado devido a diferença na parede celular dessas bactérias. Verificou-se, ainda, um grande desvio padrão amostral para o filme polimérico aditivado com 1% de MCs-Zn. Este fato deve-se, possivelmente, à inibição não uniforme dos microrganismos na superfície do filme.

A partir da análise estatística verificou-se que há diferença significativa para o efeito antibacteriano entre o filme de Ecoflex® puro e os filmes obtidos com diferentes percentuais de MCs-Zn após 24 h de análise, e que não há diferença significativa entre os aditivos antimicrobianos quando testados frente à bactéria gram-negativa *E. coli*. Kirschner *et al.*⁸ estudaram a incorporação do *masterbatch* de PEBD/microcápsulas de vidro dopadas com zinco iônico em PA6 e testaram sua atividade antimicrobiana frente à *S. typhimurium* e *S. aureus*. Quando avaliada a atividade antimicrobiana do *masterbatch* de PEBD/microcápsulas de vidro dopadas com zinco iônico em PA6

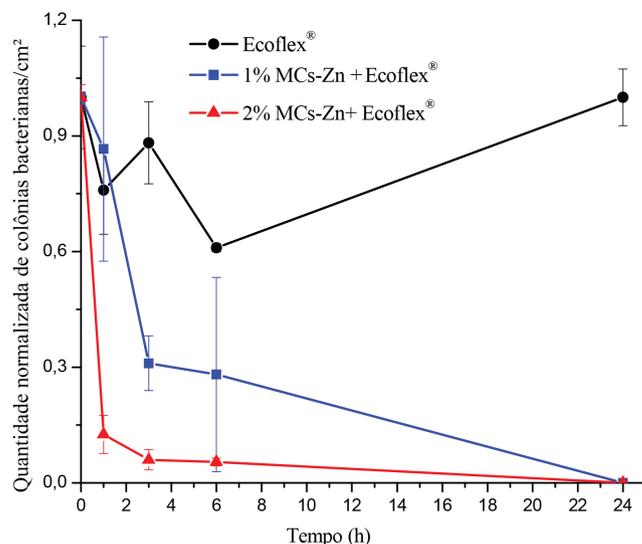


Figura 5. Curva de morte obtida com os filmes poliméricos de Ecoflex® aditivados com 1 e 2% (m/m) de MCs-Zn e para o filme polimérico de Ecoflex® puro frente a bactéria *E. coli*

frente à *S. typhimurium* verificou-se que para o maior percentual de *masterbatch* (4%) os efeitos antibacterianos foram mais pronunciados. Para *S. aureus* a análise mostrou que a placa de PA6-PEBD/microcápsulas de vidro dopadas com zinco iônico tem excelente atividade antimicrobiana em ambos os percentuais de *masterbatch* testados (2 e 4%). Os autores concluíram que mesmo em pequenos percentuais do *masterbatch*, o efeito antibacteriano foi significativo frente a *S. aureus*, sendo que um maior percentual era necessário para causar o mesmo efeito contra *S. typhimurium*, corroborando o fato da diferença na parede celular dessas bactérias, haja vista que *S. typhimurium* é uma estirpe gram-negativa, análoga à *E. coli*.

Ainda, através da análise estatística, verificou-se que para a bactéria *S. aureus* não houve diferença significativa entre os aditivos, bem como entre os diferentes percentuais de aditivos avaliados no tempo de 24 h. Para *E. coli*, o percentual de 1% (m/m) de NPs-ZnO diferiu estatisticamente de 2% (m/m) de NPs-ZnO e 1 e 2% (m/m) de MCs-Zn no tempo de 24 h, apresentando-se com um efeito de inibição ou morte menos pronunciado quando comparado aos demais.

Logo, para a inibição da bactéria gram-positiva *S. aureus* após 24 h é indiferente o aditivo antimicrobiano e o percentual de massa utilizado. Desta forma, pode-se optar pela menor concentração de aditivo que é de 1% (m/m), o que é menos custoso e pelas MCs-Zn, que possuem a vantagem de não ser obtidas pela tecnologia nano, que possuem um pré-conceito em torno da sua forma de obtenção. Para a bactéria gram-negativa *E. coli*, pode-se optar também pela utilização de 1% (m/m) de MCs-Zn em virtude de que após 24 h de contato com o filme polimérico, estas ocasionaram a morte de 100% das bactérias, mesmo efeito observado para 2% (m/m) e, também por este ser mais eficiente quando comparado as NPs-ZnO. Ainda, as MCs-Zn distribuem-se mais uniformemente na matriz polimérica quando comparadas às NPs-ZnO, que formam aglomerados prejudicando desta forma a atividade antimicrobiana, conforme pode ser observado na Figura 6.

A Figura 6a mostra detalhes de um filme de Ecoflex® contendo 1% (m/m) de MCs-Zn. Nas regiões R1 e R2 são mostrados detalhes de aglomerados com dimensões de 5 a 10 micrometros formados com as microcápsulas. Ao longo do filme é possível observar as micropartículas distribuídas na superfície do Ecoflex®, com dimensões de aproximadamente 1-2 micrometros. Também são observadas

estruturas orientadas na forma de bastões, distribuídas ao longo da superfície do filme.

A formação de aglomerados constituídos por NPs-ZnO é evidente na micrografia apresentada na Figura 6c. Ao longo do filme de Ecoflex® são formados aglomerados de dimensões variadas entre 5 e 10 micrometros, porém em maior quantidade que nos filmes de Ecoflex® contendo MCs-Zn, regiões de R3-R6. Com a incorporação das NPs-ZnO não são formadas as estruturas organizadas ao longo da superfície do filme, o que demonstra que a presença das NPs-ZnO influencia na cristalinidade do Ecoflex®.

A Figura 6b mostra detalhes do filme de Ecoflex® contendo MCs-Zn. São observadas em detalhes as estruturas cristalinas do Ecoflex® na forma de bastões e a ausência de defeitos significativos no filme. Na Figura 6d são observados detalhes dos aglomerados constituídos por NPs-ZnO e a formação de defeitos no filme de Ecoflex® devido a presença destes aglomerados.

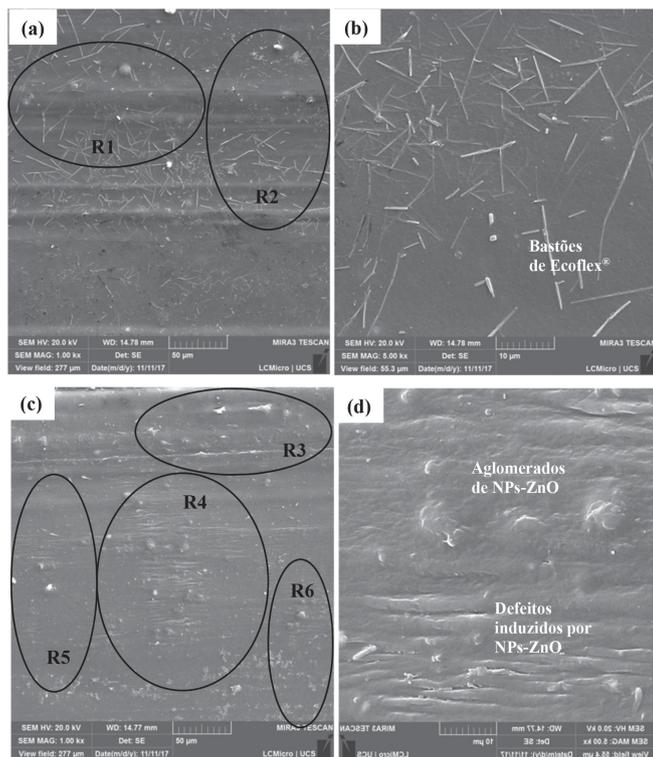


Figura 6. Micrografias obtidas com microscopia eletrônica de varredura FEG. (a) Filme de Ecoflex® contendo 1% (m/m) de MCs-Zn (b) detalhes de bastões de Ecoflex® formados nos filmes contendo MCs-Zn, (c) Filme de Ecoflex® contendo 1% (m/m) de NPs-ZnO (d) detalhes dos aglomerados formados pelas NPs-ZnO e defeitos induzidos no filme de Ecoflex®.

Biodegradação

O solo utilizado no ensaio de biodegradação apresentou as seguintes especificações: umidade de $25,91 \pm 0,13\%$, capacidade de retenção de água do solo atual $67,7 \pm 0,12\%$, nitrogênio $0,20\%$, carbono orgânico $1,68\%$ e relação C/N de 8.

A quantidade de CO₂ total produzida por cada filme polimérico obtido (com e sem aditivos), bem como a quantidade de CO₂ produzida para uma amostra controle, que corresponde somente ao solo (sem adição do polímero), após 90 dias de teste de biodegradação, estão apresentadas nas Figuras 7 e 1S.

Ao analisar as Figuras 7 e 1S (material suplementar) verifica-se que todos os filmes poliméricos e o branco (solo sem polímero) produziram uma quantidade muito semelhante de CO₂. Através da

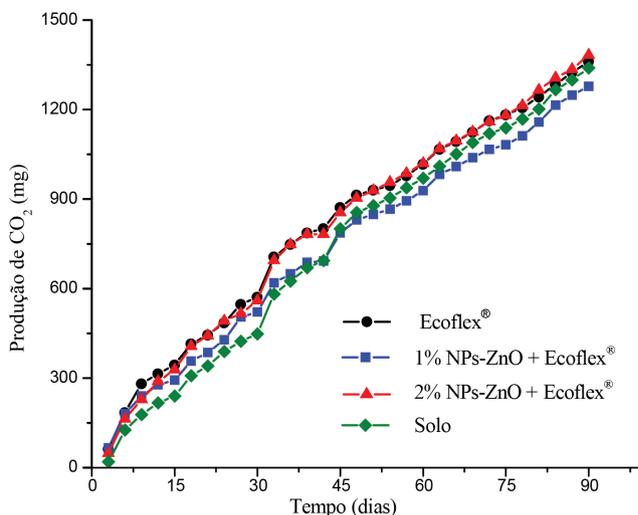


Figura 7. Evolução da quantidade de CO₂ gerada durante os 90 dias de análise para os polímeros obtidos com e sem NPs-ZnO

análise estatística verificou-se que os filmes poliméricos não diferem entre si quanto à produção de CO₂, inferindo que a adição de diferentes concentrações de NPs-ZnO e de MCs-Zn não afetaram na biodegradação do Ecoflex®. Também se verificou que os filmes poliméricos com e sem aditivo não diferiram quanto à quantidade de CO₂ produzida quando comparados ao solo sem o polímero.

Casarin *et al.*³⁹ avaliaram o processo de biodegradação em solo do Ecoflex® e verificaram após 90 dias uma perda de massa de $3,27 \pm 0,21\%$. Šerá *et al.*⁴⁰ estudaram a biodegradação do Ecoflex® puro em solo sob condições aeróbicas a 25 °C, sendo que o referido polímero apresentou uma biodegradação muito limitada, atingindo um nível geral de mineralização de cerca de 7% após 100 dias de incubação. Saadi *et al.*⁴¹ obtiveram 10% degradação do PBAT após 75 dias de incubação em solo à 30 °C inferindo que em condições muito semelhantes às utilizadas no presente estudo o Ecoflex® não sofre degradação, sendo necessárias condições muito específicas, como por exemplo, a compostagem, para que de fato esse polímero se degrade em um curto espaço de tempo. De acordo com a BASF, o Ecoflex® atinge mais de 90% de conversão de carbono em CO₂ depois de apenas 80 dias de análise em compostagem.

De acordo com Mohanty e Nayak,⁴² o PBAT sofre biodegradação sob condições de compostagem, atingindo 80% de biodegradação em 180 dias. Muniyasamy *et al.*⁴³ observaram um comportamento de degradação semelhante, onde a taxa de biodegradação foi cerca de 90% em um período de 180 dias sob condições de compostagem.

Na Figura 2S (material suplementar) encontram-se as imagens dos filmes poliméricos obtidas com auxílio de um estereomicroscópio com aumento de 50 vezes em 0 dias (a) e após 90 dias de ensaio de biodegradação (b).

Ao analisar a Figura 2S (material suplementar) é possível perceber que não há diferenças entre os filmes poliméricos nos tempos de 0 e 90 dias de ensaio, corroborando o fato de que não ocorreu a biodegradação dos mesmos nas condições estudadas. É perceptível a presença de alguns pontos escuros nos filmes poliméricos aditivados com 1 e 2% (m/m) de MCs-Zn, sendo possivelmente as microcápsulas distribuídas na matriz do polímero biodegradável, já que esse fato não é observado para os filmes aditivados com as NPs-ZnO. Ainda, percebem-se claramente as linhas de orientação de máquina, entretanto, nenhum indicativo de degradação, como fissuras, trincas ou ranhuras são observados.

O presente trabalho foi realizado sem aeração, sob temperatura próxima à ambiente e sem umidade do ar e do solo controladas,

logo, as taxas de biodegradação são menores e, consequentemente, o tempo de 90 dias foi insuficiente para que a mineralização de toda a amostra acontecesse.

CONCLUSÕES

Através deste estudo pode-se concluir que pela adição das NPs-ZnO e das MCs-Zn ao polímero biodegradável Ecoflex® foi possível agregar a atividade antimicrobiana aos filmes poliméricos sem comprometer sua degradabilidade. Dentre os aditivos antimicrobianos e os percentuais destes estudados, pode-se optar pela concentração de 1% (m/m), visto que esta apresenta resultados estatisticamente semelhantes após 24 horas de contato do filme poliméricos com as bactérias à concentração de 2% (m/m), diminuindo desta forma custos para a obtenção dos filmes antimicrobianos, e pela utilização das MCs-Zn devido à vantagem de não serem sintetizadas pela tecnologia nano, a qual possui um pré-conceito em torno da sua forma de obtenção e pelo fato de não se saber ao certo quais os possíveis danos por elas causados nos organismos vivos e ainda, pela distribuição mais homogênea na matriz polimérica se comparadas às NPs-ZnO.

MATERIAL SUPLEMENTAR

No material suplementar, disponível gratuitamente em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de PDF, estão apresentados, a Figura 1S que mostra a evolução da quantidade de CO₂ gerada durante os 90 dias do ensaio de biodegradação para os polímeros obtidos com e sem MCs-Zn, bem como as imagens dos filmes poliméricos obtidas com auxílio de um estereomicroscópio com aumento de 50 vezes em 0 dias (a) e após 90 dias de ensaio de biodegradação (b) (Figura 2S).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Unochapecó pela estrutura disponibilizada para a realização deste trabalho. Agradecem também à CAPES pelo suporte financeiro. À BASF e Kher Group pelo fornecimento dos materiais utilizados na pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Sharma, C.; Dhiman, R.; Rokana, N.; Panwar, H.; *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1.
- Appendini, P.; Hotchkiss, J. H.; *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* **2002**, *3*, 113.
- Soares, N. F. F.; Silva, W. A.; Pires, A. C. S.; Camilloto, G. P.; Silva, P. S.; *Rev. Ceres* **2009**, *56*, 370.
- Espitia, P. J. P.; Soares, N. F. F.; Coimbra, J. S. R.; Andrade, N. J.; Cruz, R. S.; Medeiros, E. A. A.; *Food Bioprocess Technol.* **2012**, *5*, 1447.
- Droval, G.; Aranberri, I.; Germán, L.; Ivano, E.; Dimitrova, E.; Kotsilkova, R.; Verelst, M.; Ghys, J. D.; *J. Thermoplast. Compos.* **2014**, *27*, 268.
- Sirelkhatim, A.; Mahmud, S.; Seeni, A.; Kaus, N. H. M.; Ann, L. C.; Bakhori, S. K. M.; Hasan, H.; Mohamad, D.; *Nano Micro Lett.* **2015**, *7*, 219.
- Santos, M. F.; Machado, C.; Tachinski, C. G.; Fiori Júnior, J.; Piletti, R.; Peterson, M.; Fiori, M. A.; *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *39*, 403.
- Kirschner, M. R. C.; Rippel, T.; Ternus, R. Z.; Duarte, G. W.; Riella, H. G.; Dal Magro, J.; Mello, J. M. M.; Silva, L. L.; Fiori, M. A.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, *134*, 1.
- Dagostin, V. S.; Golçalves, D. L.; Pacheco, C. B.; Almeida, W. B.; Thomé, I. P.; Pich, C. T.; Paula, M. M. S.; Silva, L.; Angioletto, E.; Fiori, M. A.; *Mater. Sci. Eng. C* **2010**, *30*, 705.
- Xie, Y.; He, Y.; Irwin, P. L.; Jin, T.; Shi, X.; *Appl. Environ. Microb.* **2011**, *77*, 2325.
- Moezzi, A.; McDonagh, A. M.; Cortie, M. B.; *Chem. Eng. J.* **2012**, *185–186*, 1.
- Doumbia, A. S.; Vezin, H.; Ferreira, M.; Campagne, C.; Devaux, E.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, *132*, 1.
- Smijs, T. G.; Pavel, S.; *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2011**, *4*, 95.
- Tankhiwale, R.; Bajpai, S. K.; *Colloids Surf. B* **2012**, *90*, 16.
- Othman, S. H.; Salam, N. R. A.; Zainal, N.; Basha, R. K.; Talib, R. A.; *Int. J. Photoenergy* **2014**, *2014*, 1.
- Emamifard, A.; Mohammadzadeh, M.; *Food Technol. Biotechnol.* **2015**, *53*, 488.
- Beigmohammadi, F.; Peighambari, S. H.; Hesari, J.; Azadmard-Damirchi, S.; Peighambari, S. J.; Khosrowshahic, N. K.; *LWT - Food Sci. Technol.* **2015**, *66*.
- Esmailzadeh, H.; Sangpour, P.; Shahraz, F.; Hejazi, J.; Khaksar, R.; *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *1*, 1058.
- Marcous, A.; Rasouli, S.; Ardestani, F.; *Journal of Particle Science and Technology* **2017**, *3*, 1.
- Kijchavengkul, T.; Auras, R.; Rubino, M.; Selke, S.; Ngouajio, M.; R. Fernandez, T.; *Polym. Degrad. Stabil.* **2010**, *95*, 241.
- http://www.plasticsportal.net/wa/plasticsEU~ru_RU/portal/show/content/products/biodegradable_plastics/ecoflex, acessada em janeiro de 2018.
- Ma, P.; Jiang, L.; Yu, M.; Dong, W.; Chen, M.; *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2016**, *4*, 6417.
- Venkatesan, R.; Rajeswari, N.; *Polym. Adv. Technol.* **2017**, *28*, 1699.
- Venkatesan, R.; Rajeswari, N.; *Polym. Adv. Technol.* **2017**, *28*, 20.
- Diez-Pascual, A. M.; Diez-Vicente, A. L.; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 3729.
- Castro-Mayorga, J. L.; Fabra, M. J.; Lagaron, J. M.; *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* **2016**, *33*, 524.
- Rodríguez-Tobías, H.; Morales, G.; Ledezma, A.; Romero, J.; Saldívar, R.; Langlois, V.; Renard, E.; Grande, D.; *J. Mater. Sci.* **2016**, *51*, 8593.
- Marra, A.; Silvestre, C.; Duraccio, D.; Cimmino, S.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *88*, 254.
- Clinical and Laboratory Standards Institute; *Performance standards for antimicrobial disk susceptible tests*; Approved standard – Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, Pennsylvania, **2012**.
- JIS Z 2801:2010. *Antibacterial products - Test for antibacterial activity and efficacy*, **2010**.
- American Society for Testing and Materials; ASTM D-5988-12. Standard Test Method for Determining Aerobic Biodegradation of Plastic Materials in Soil, **2012**.
- American Society for Testing and Materials; ASTM D5338 – 11 - Standard test method for determining aerobic biodegradation of plastic materials under controlled composting conditions, incorporating thermophilic temperatures, **2011**.
- Mariani, P. D. S. C.; Vinagre Neto, A. P.; da Silva Jr., J. P.; Cardoso, E. J. B. N.; Esposito E.; Innocentini-Mei, L. H.; *J. Polym. Environ.* **2007**, *15*, 19.
- International Organization for Standardization; *Determination of the water-holding capacity*. ISO 17512. Geneva, Switzerland: ISO, **2011**.
- Morita, T.; Assumpção, R. M. V.; *Manual de solução, reagentes e solventes: padronização, preparação, purificação*, Edgard Blucher: São Paulo, **2005**.
- Muñoz-Bonilla, A.; Fernández-García, M.; *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 281.
- Sonohara, R.; Muramatsu, N.; Ohshima, H.; Kondo, T.; *Biophys. Chem.* **1995**, *55*, 273.
- Gordon, T.; Perlstein, B.; Houbara, O.; Felner, I.; Banin, E.; Margel, S.; *Colloids Surf. A* **2011**, *374*, 1.

39. Casarin, S. A.; Agnelli, J. A. M.; Malmonge, S. M.; Rosário, F.; *Polímeros* **2013**, *23*, 115.
40. Šerá, J.; Stloukal, P.; Jančová, P.; Verney, V.; Pekařová, S.; Koutný, M.; *J. Agr. Food Chem.* **2016**, *64*, 5653.
41. Saadi, Z.; Cesar, G.; Bewa, H.; Benguigui, L.; *J. Polym. Environ.* **2013**, *21*, 893.
42. Mohanty, S.; Nayak, S. K.; *J. Polym. Environ.* **2012**, *20*, 195.
43. Muniyasamy, S.; Reddy, M. M.; Misra, M.; Mohanty, A.; *Ind. Crop. Prod.* **2013**, *43*, 812.