

## **Filmes finos de PAH/PAA com nanopartículas de prata como agentes bactericidas no tratamento microbiológico de efluentes industriais para reuso**

**Fabiana Zarpelon, Larissa N. Carli, Janaina S. Crespo, Marcelo Giovaneli**

Universidade de Caxias do Sul, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Laboratório de

Filmes Finos, Caxias do Sul – RS, Brasil

E-mail: mgiovan1@ucs.br

### **Resumo**

O rápido crescimento da Nanotecnologia tem despertado o interesse significativo de vários pesquisadores no âmbito das aplicações dos nanomateriais em questões relacionadas ao meio ambiente. Particularmente, o seu potencial para revolucionar processos convencionais de tratamento de água foi enunciado recentemente. Muitos estudos têm avaliado a eficiência bactericida de nanopartículas de prata (AgNPs), uma vez que as mesmas mostram elevada atividade inibitória contra uma ampla gama de micro-organismos. Neste contexto, sistemas automontados através da técnica layer-by-layer (LBL) são considerados um bom meio para a incorporação de nanopartículas metálicas. Assim, o presente trabalho teve por objetivo preparar e caracterizar filmes finos obtidos a partir de soluções de polieletrólitos fracos (hidrocloreto de polialilamina – PAH, e poliácido acrílico – PAA) com AgNPs e reticulados com glutaraldeído, visando o desenvolvimento de um material que pudesse ser utilizado como agente bactericida no tratamento microbiológico de efluentes. Os ensaios realizados com os filmes produzidos por meio da técnica LBL revelaram que os mesmos apresentam atividade inibitória contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*), além de reduzirem em até 89,6% os coliformes totais presentes em uma amostra de efluente industrial.

Palavras-chave: Nanopartículas de Prata. Filmes Finos. Tratamento de Efluentes.

Área Temática: Águas Residuárias

### ***Thin films of PAH/PAA with silver nanoparticles as bactericidal agents in microbiological treatment of industrial wastewater for reuse***

### **Abstract**

*The rapid growth of Nanotechnology has attracted significant interest from several researchers in the field of applications of nanomaterials in environmental issues. Particularly, the potential to revolutionize conventional treatment processes of water was recently stated. Many studies have evaluated the efficacy of antibacterial silver nanoparticles (AgNPs), since these nanoparticles show high inhibitory activity against a wide range of micro-organisms. In this regard, systems using the layer-by-layer technique (LBL) are considered a good way of incorporating metal nanoparticles. Therefore, the present study aimed to prepare and characterize thin films obtained from solutions of weak polyelectrolytes (polyallylamine hydrochloride – PAH, and polyacid acrylic – PAA) with AgNPs and crosslinked with glutaraldehyde, aiming to develop a material that could be used as a bactericidal agent in the microbiological treatment of effluents. Tests performed with the*

## 4º Seminário Brasileiro de Gestão Ambiental na Agropecuária

Fiema Brasil - Bento Gonçalves – RS, Brasil, 24 e 25 de Abril de 2014

*films produced by LbL technique revealed that they have an inhibitory activity against Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) and Gram-negative (*Escherichia coli*) bacteria, besides reducing in up to 89.6% the total coliforms present in a sample of industrial effluent.*

**Keywords:** *Silver Nanoparticles. Thin Films. Effluents Treatment.*

**Theme Area:** *Wastewater*

### 1 Introdução

A Nanotecnologia, ciência e tecnologia que foca as propriedades especiais dos materiais em escala nanométrica, está se tornando um dos mais promissores campos de pesquisa da atualidade. Em virtude do seu tamanho, os nanomateriais têm demonstrado possuir propriedades distintas (JORTNER e RAO, 2002). Em pouco mais de 15 anos, a “explosão” do nano tem levado ao desenvolvimento de uma vasta gama de novas tecnologias para aplicações domésticas e industriais, que vão desde o reforço na entrega de medicamentos ao organismo humano até novos métodos para o tratamento de água contaminada (CRANE e SCOTT, 2012). Neste contexto, os filmes automontados com polieletrólitos de cargas opostas ganharam um considerável interesse científico, devido às suas inúmeras aplicações (CHENG et al., 2005). Um dos métodos mais utilizados para a fabricação desses materiais baseia-se na automontagem de multicamadas poliméricas diferenciadas por meio da técnica de camada por camada (do inglês “*layer-by-layer*” – LbL).

Esses sistemas automontados são considerados um bom meio para nanopartículas. A incorporação dessas espécies que possuem elevada área superficial pode afetar significativamente as propriedades dos filmes finos (LI et al., 2006).

Uma classe de grande interesse para a fabricação de nanocompósitos poliméricos são as nanopartículas de metais nobres, sintetizadas por via aquosa (CRESPILHO et al., 2006). A grande maioria dos estudos está relacionada às nanopartículas de prata (AgNPs), uma vez que as mesmas apresentam ação contra uma ampla faixa de micro-organismos como bactérias, fungos e vírus.

A aplicação de nanopartículas no tratamento de água é uma área emergente. Os recentes avanços na nanotecnologia oferecem oportunidades de desenvolver sistemas de abastecimento ou tratamento de água de última geração. Os processos altamente eficientes, modular e multifuncional ativados por nanotecnologia, estão previstos para proporcionar alto desempenho, água a preços mais acessíveis e soluções de tratamento de águas residuais que dependem cada vez menos de grandes infraestruturas (QU et al., 2013). Além disso, a utilização da nanotecnologia no tratamento de água e de efluentes promete não só superar os principais desafios enfrentados pelas tecnologias de tratamento existentes, mas também fornecer novas possibilidades de tratamento que poderiam permitir a utilização econômica dos recursos hídricos não convencionais, visando expandir o abastecimento de água (QU et al., 2013).

Dentro deste contexto, este trabalho teve por objetivo preparar e caracterizar filmes finos obtidos a partir de soluções de polieletrólitos fracos (hidrocloreto de polialilamina – PAH, e poliácido acrílico – PAA) com AgNPs e reticulados com glutaraldeído, visando o desenvolvimento de um material que pudesse ser utilizado como agente bactericida no tratamento microbiológico de efluentes.

## 2 Metodologia

### 2.1 Preparação dos Filmes Finos

As lâminas de vidro foram inicialmente imersas em uma solução aquosa de PAH  $1,0 \cdot 10^{-2}$  mol/L ( $M_w = 70\,000$  g/mol, Aldrich-Sigma) durante 15 min sendo, em seguida, retiradas da solução e lavadas por imersão em água deionizada durante 2, 1, e 1 min, respectivamente. Na sequência, as lâminas foram imersos em outra solução aquosa de PAA de mesma concentração ( $M_w = 90\,000$  g/mol, Polysciences) durante 15 min, sendo lavados em água deionizada de maneira análoga ao que foi descrito anteriormente.

As multicamadas foram obtidas com soluções aquosas compostas por  $(PAH_x/PAA_y)_i$ , onde  $x$  e  $y$  são os valores de pH das soluções do policátion e do polianion durante a montagem dos filmes finos, respectivamente; e  $i$  é o número de camadas. Os filmes finos foram preparados para a combinação de experimento  $(PAH_{8,0}/PAA_{4,0})_{20}$ . A escolha do pH das soluções e da quantidade de camadas foi feita com base em trabalhos anteriores (MACHADO et al., 2011) em que se observou que para filmes produzidos com os mesmos polieletrólitos, e em condições semelhantes, nanopartículas de ouro concentravam-se preferencialmente na superfície dos mesmos.

### 2.2 Síntese das AgNPs

As nanopartículas de prata foram preparadas em meio aquoso pela redução química de uma solução de nitrato de prata por boroidreto de sódio, na presença de citrato de sódio (agente estabilizante), sob agitação, ao abrigo da luz e a 23 °C. Este procedimento foi realizado com base no método proposto por Jana et al. (2001).

Na preparação, 250 mL de  $AgNO_3$  0,25 mmol/L foram adicionados a 250 mL de citrato de sódio 0,25 mmol/L por 30 s, sob agitação magnética vigorosa. Imediatamente após a mistura dessas duas soluções, uma alíquota de 10 mL de  $NaBH_4$  1,00 mmol/L foi adicionada a esse sistema (PINTO et al., 2010). Após a formação das AgNPs, o sistema foi mantido sob agitação durante mais 1 min e a solução resultante foi imediatamente utilizada para se realizar a incorporação das mesmas nos filmes finos.

### 2.3 Espectroscopia de Absorção Molecular na Região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis)

A solução contendo as AgNPs foi analisada em um espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution 60 na faixa de comprimento de onda situada entre 200 e 800 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 10 mm. O branco foi medido com uma amostra de água Milli-Q, previamente ao registro do espectro da solução coloidal de prata.

### 2.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As AgNPs foram previamente dispersas em água deionizada (1 gota da solução coloidal de prata em 20 mL desse solvente) utilizando um ultrassom (Unique USC 1400) por 30 min. Em seguida, uma gota dessa nova solução foi depositada sobre um *grid* de cobre com filme de Formvar (300 mesh) e deixada secar por 24 h. Finalmente, a análise de MET foi realizada em um microscópio Jeol JEM-1200 Ex II, operando em uma voltagem de 80 kV.

### 2.5 Incorporação das AgNPs nos Filmes Finos e Reticulação com Glutaraldeído

Após a preparação dos filmes finos, os mesmos foram imersos em uma solução de AgNPs por um período de 1, 2 e 4 h, sendo em seguida enxaguados em água deionizada durante 30 s. A incorporação das AgNPs foi realizada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, assim como a secagem dos mesmos, por um período de 24 h.

## 4º Seminário Brasileiro de Gestão Ambiental na Agropecuária

Fiema Brasil - Bento Gonçalves – RS, Brasil, 24 e 25 de Abril de 2014

Visando minimizar a solubilidade dos filmes finos em meio aquoso, os mesmos foram reticulados com o auxílio de uma solução aquosa de glutaraldeído 2,5% (v/v) por 30 min, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, sendo em seguida enxaguados em água deionizada durante 30 s e posteriormente secos por 24 h.

### 2.6 Ensaio Microbiológico

Os ensaios microbiológicos foram realizados em placas de Petri com ágar nutritivo (HIMEDIA). A eficácia antimicrobiana foi testada sobre a inibição do crescimento de *Escherichia coli* (ATCC – 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC – 25923).

As amostras das culturas dessas duas bactérias foram inicialmente diluídas em uma solução salina peptonada 0,1% (m/v). Em seguida, foram adicionadas alçadas de cada micro-organismo em tubos separados, cada um contendo uma solução salina, até se obter uma turvação compatível à escala 0,5 de McFarland, de densidade celular bacteriana em torno de  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro.

As suspensões das duas bactérias foram então espalhadas de forma homogênea no meio de cultura de cada placa de Petri para que os filmes finos pudessem ser depositados na parte superior do ágar, sendo posteriormente incubados a uma temperatura de 37°C, por 48 h, em uma estufa bacteriológica (Quimis Q-317B). Após o período de incubação, as placas foram analisadas com o objetivo de se avaliar o efeito inibitório do crescimento bacteriano nas amostras, através da formação de um halo de inibição ao redor, sob e sobre os filmes finos.

Os ensaios microbiológicos preliminares foram realizados em ágar estoque, com filmes finos de 20 camadas, de acordo com o esquema apresentado na Tabela 1, utilizando-se apenas a cultura de *Escherichia coli*, e um tempo de imersão na solução coloidal de prata de 1 h. Aqui neste trabalho, está sendo apresentado e discutido apenas o sistema que apresentou o melhor resultado em termos de inibição (assinalado em “verde” na Tabela 1).

Tabela 1 – Descrição dos sistemas utilizados nos ensaios microbiológicos.

Sistema	AgNPs	pH da solução de AgNPs	Reticulação com glutaraldeído
PAH <sub>4,0</sub> /PAA <sub>4,0</sub>	Não	–	Não
PAH <sub>4,0</sub> /PAA <sub>4,0</sub>	Não	–	Sim
PAH <sub>4,0</sub> /PAA <sub>4,0</sub>	Sim	3,0	Não
PAH <sub>4,0</sub> /PAA <sub>4,0</sub>	Sim	3,0	Sim
PAH <sub>4,0</sub> /PAA <sub>4,0</sub>	Sim	6,0	Não
PAH <sub>4,0</sub> /PAA <sub>4,0</sub>	Sim	6,0	Sim
PAH <sub>8,0</sub> /PAA <sub>4,0</sub>	Não	–	Não
PAH <sub>8,0</sub> /PAA <sub>4,0</sub>	Não	–	Sim
PAH <sub>8,0</sub> /PAA <sub>4,0</sub>	Sim	3,0	Não
PAH <sub>8,0</sub> /PAA <sub>4,0</sub>	Sim	3,0	Sim
PAH <sub>8,0</sub> /PAA <sub>4,0</sub>	Sim	6,0	Não
PAH <sub>8,0</sub> /PAA <sub>4,0</sub>	Sim	6,0	Sim

### 2.7 Tratamento do Efluente

As lâminas de vidro contendo os filmes finos para a combinação (PAH<sub>8,0</sub>/PAA<sub>4,0</sub>)<sub>20</sub>, imersas em solução de prata por 4 h e reticuladas com glutaraldeído, foram mergulhadas em 250 mL de um efluente de reuso industrial com concentração de coliformes de 900 UFC/mL em agitação de 180 rpm por 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240, e 360 min. Após o término desse procedimento, procedeu-se à contagem total de coliformes remanescentes nesses nove sistemas.

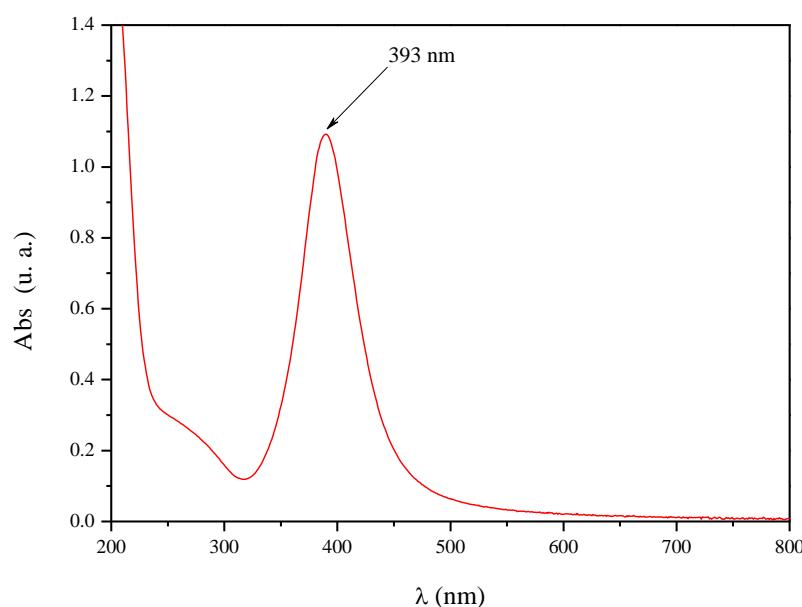
### 3 Resultados

#### 3.1 UV-Vis e MET das AgNPs

O espectro da solução coloidal de AgNPs obtido em pH = 6,0 (Figura 1) evidenciou a presença de uma única banda de absorção centrada em 393 nm.

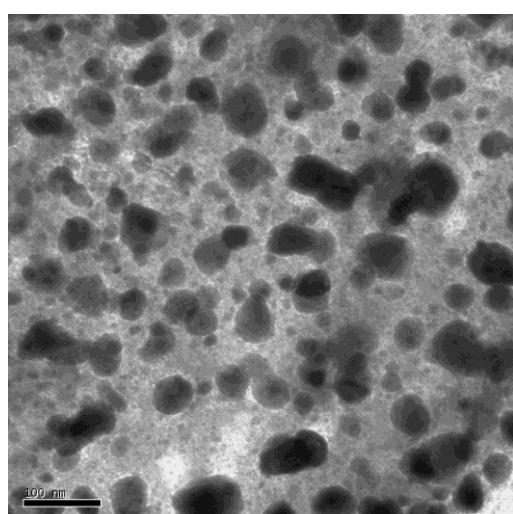
De acordo com a literatura, espectros de absorção molecular na região do UV-Vis podem fornecer informações importantes a respeito do tamanho e da geometria das nanopartículas estudadas (PAL et al., 2007). Geralmente, uma banda em torno de 400 nm indica a presença de AgNPs de formato esférico (NOGUEZ, 2007). Essa constatação foi corroborada pela análise de TEM, onde foi possível observar nanopartículas com esse formato.

Figura 1 – Espectro de UV-Vis das AgNPs em pH = 6,0



A Figura 2 apresenta a imagem de TEM das AgNPs. Como pode ser observado, as AgNPs apresentaram formato esférico e um diâmetro médio da ordem de 35 nm.

Figura 2. Imagem de TEM das AgNPs sintetizadas.

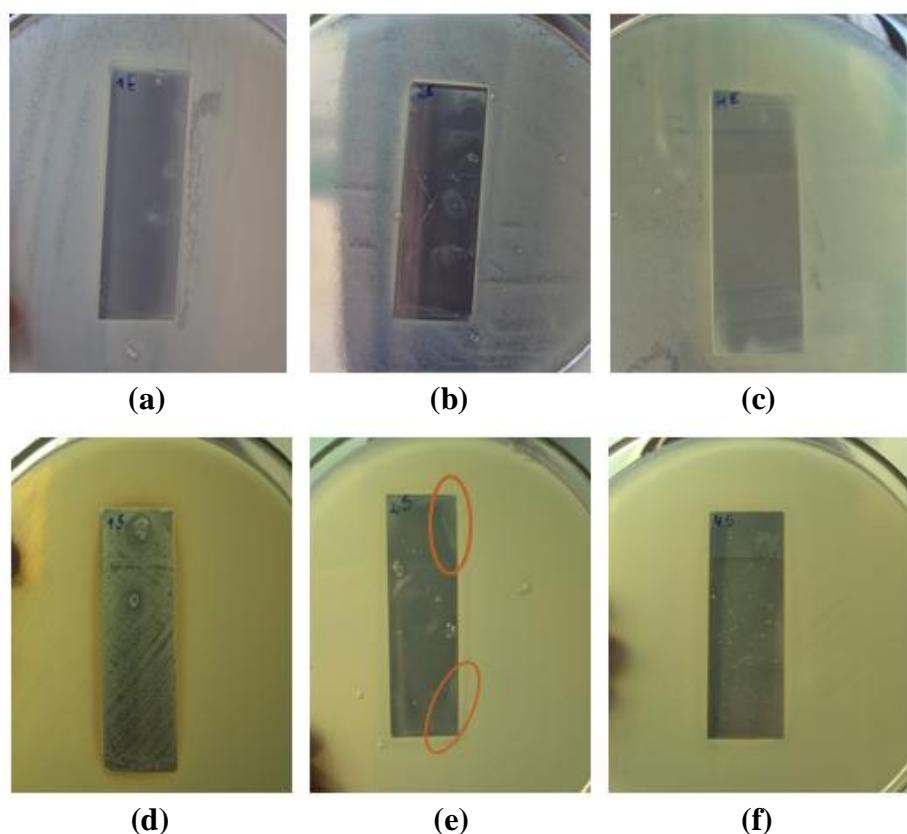


### 3.2 Ensaios Microbiológicos

Os ensaios microbiológicos mostraram que os filmes finos com AgNPs apresentam ação inibitória contra bactérias Gram-positivas (como é o caso do *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas, (como é o caso da *Escherichia coli*). De modo geral, a maior atividade de inibição foi observada nos filmes testados contra a bactéria *Escherichia coli*, uma vez que micro-organismos Gram-negativos apresentam uma camada de peptidoglicanos a nível de parede celular muito menos espessa do que os micro-organismos Gram-positivos, o que acaba facilitando a entrada e consequentemente a incorporação das AgNPs nas primeiras, aumentando a eficiência de inibição (DURÁN et al., 2010). Ainda que os *halos* nas placas de Petri sejam pequenos, uma vez que a área de contato das lamínulas de vidro com o ágar é reduzida devido à fina espessura das mesmas, foi possível observar que o crescimento bacteriano sob e sobre os slides foi muito pequeno ou não aconteceu.

Finalmente, os ensaios microbiológicos mostraram igualmente que o tempo de difusão das AgNPs interfere diretamente na atividade bactericida dos mesmos. Um maior tempo de imersão em solução coloidal de prata potencializa a ação bactericida, devido a uma maior adesão de nanopartículas nos filmes finos. O teste realizado após a incorporação das AgNPs por 4 h apresentou uma maior transparência em relação àqueles de 1 e 2 h, tanto para *Escherichia coli* (Figuras 3a, 3b e 3c) como para *Staphylococcus aureus* (Figuras 3d, 3e e 3f), praticamente não evidenciando crescimento de nenhuma cepa bacteriana sob e sobre o slide.

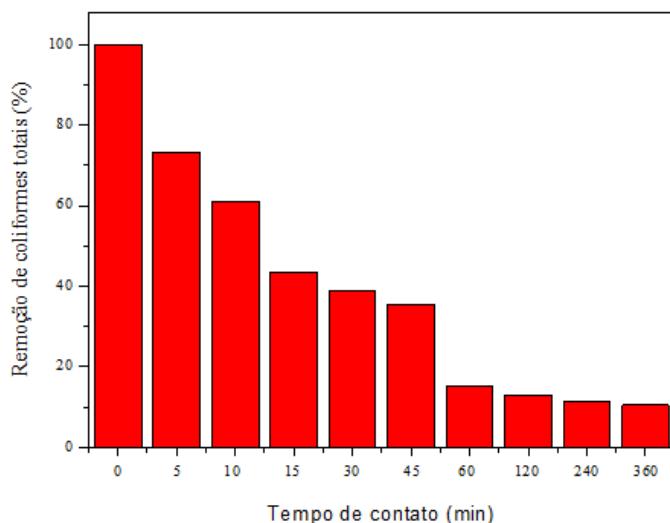
Figura 3 – Resultado do ensaio microbiológico para o filme  $(\text{PAH}_{8,0}/\text{PAA}_{4,0})_{20}$  com AgNPs e reticulado com glutaraldeído: (a) imersão por 1 h em solução de AgNPs contra *Escherichia coli*; (b) imersão por 2 h em solução de AgNPs contra *Escherichia coli*; (c) imersão por 4 h em solução de AgNPs contra *Escherichia coli*; (d) imersão por 1 h em solução de AgNPs contra *Staphylococcus aureus*; (e) imersão por 2 h em solução de AgNPs contra *Staphylococcus aureus*; (f) imersão por 4 h em solução de AgNPs contra *Staphylococcus aureus*.



### 3.3 Tratamento do Efluente

Os filmes produzidos para a combinação (PAH<sub>8,0</sub>/PAA<sub>4,0</sub>)<sub>20</sub> foram imersos em 250 mL de um efluente para reuso, proveniente de uma indústria de cutelaria, por diferentes tempos. No final de cada tempo, procedeu-se à contagem dos coliformes totais. A influência do tempo de contato dos filmes com as amostras do efluente na contagem de coliformes totais pode ser visualizada na Figura 4. É possível observar que após 5 min de contato do efluente com os filmes finos ocorreu uma redução de aproximadamente 27% dos coliformes totais presentes na amostra inicial. Após 15 min de contato, mais da metade dos micro-organismos foram eliminados e, após 360 min, em torno de 89,6% dos coliformes foram removidos.

Figura 4 – Influência do tempo de contato na contagem de coliformes totais do efluente.



### 4 Conclusões

Os filmes de PAH/PAA com AgNPs e reticulados com glutaraldeído, mostraram ação inibitória contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, com maior atividade de inibição contra a segunda bactéria. Além disso, o tempo de incorporação das AgNPs nos filmes finos interferiu diretamente na atividade bactericida dos mesmos. Um maior tempo de imersão em solução coloidal de prata potencializa a ação bactericida, devido a uma maior incorporação de nanopartículas nos filmes finos. O tratamento do efluente com o filme (PAH<sub>8,0</sub>/PAA<sub>4,0</sub>)<sub>20</sub> reduziu em torno de 90% dos coliformes totais presentes na amostra inicial.

Finalmente, considerando-se a facilidade de aplicação, o baixo impacto ambiental, os custos reduzidos e a ação inibidora satisfatória, os filmes finos desenvolvidos neste trabalho apresentam um grande potencial bactericida para serem utilizados como auxiliares no tratamento de efluentes.

### Referências

CHENG, Y.; WANG, X.; CHENG, J.; SUN, L.; XU, W.; ZHAO, B. "Structure and Phase Transition in Self-Assembled Films of an Anti-Ferroelectric Liquid Crystal Studied by Two-Dimensional Correlation FTIR Spectroscopy". **Spectrochimica acta. Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 61, n. 5, Março de 2005, pg. 905-911.

CRANE, R.A.; SCOTT, T.B. "Nanoscale zero-valent iron: Future prospects for an emerging water treatment technology". **Journal of Hazardous Materials**, v. 211-212, Abril de 2012, pg. 112-125.

## 4º Seminário Brasileiro de Gestão Ambiental na Agropecuária

Fiema Brasil - Bento Gonçalves – RS, Brasil, 24 e 25 de Abril de 2014

CRESPILHO, F.N.; ZUCOLLOTO, V.; BRET, C.M.A.; OLIVEIRA, O.N.; NART, F.C. “Enhanced charge transport and incorporation of redox mediators in layer-by-layer films containing PAMAM-encapsulated gold nanoparticles”. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 35, Setembro de 2006, pg. 17478-17483.

DECHER, G. “Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites”. **Science**, v. 277, n. 5330, Agosto de 1997, pg. 1232-1237.

DURÁN, N.; MARCATO, P.D.; DE CONTI, R.; ALVES, O.L; COSTA, F. T. M.; BROCCHI, M. “Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action”. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 6, Junho de 2010, pg. 949-959.

JANA, N.R.; GEARHEART, L.; MURPHY, C.J. “Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratio”. **Chemical Communications**, n. 7, Março de 2001, pg. 617-618.

JORTNER, J.; RAO, C.N.R. “Nanostructured advanced materials. Perspectives and directions”. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 9, Fevereiro de 2002, pg. 1491-1506.

LI, Z.; LEE, D.; SHENG X.; COHEN, R.E.; RUBNER, M.F. “Two-level antibacterial coating with both release-killing and contact-killing capabilities”. **Langmuir**, v. 22, n. 24, Novembro de 2006, pg. 9820-9823.

MACHADO, G.; FEIL, A.F.; MIGOWSKI, P.; ROSSI, L.; GIOVANELA, M.; CRESPO, J.S.; MIOTTI, L.; SORTICA, M.A.; GRANDE, P.L.; PEREIRA, M.B.; CORREIA, R.R.B. “Structural control of gold nanoparticles self-assemblies by layer-by-layer process”. **Nanoscale**, v. 3, n. 4, Março de 2011, pg. 1717-1723.

NOGUEZ, C. “Surface plasmons on metal nanoparticles: the influence of shape and physical environment”. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 111, n. 10, Março de 2007, pg. 3806-3819.

PAL, S.; TAK, Y.K.; SONG, J.M. “Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*”. **American Society for microbiology: Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, Março de 2007, pg. 1712-1720.

PINTO, V.V.; FERREIRA, M.J.; SILVA, R.; SANTOS, H.A.; SILVA, F.; PEREIRA, C.M. “Long time effect on the stability of silver nanoparticles in aqueous medium: effect of the synthesis and storage conditions”. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 364, n. 1-3, Julho de 2010, pg. 19-25.

QIN, S.; QIN, D.; FORD, W.T.; ZHANG, Y.; KOTOV, N.A. “Covalent cross-linked polymer/single-wall carbon nanotube multilayer films”. **Chemistry of Materials**, v. 17, n. 8, Abril de 2005, pg. 2131-2135.

QU, X.; ALVAREZ, P. J. J.; LI, Q. “Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment”. **Water Research**, v. 47, n. 12, Agosto de 2013, pg. 3931-3946.

SÓWKA, E.; LEONOWICZ, M.; ANDRZEJEWSKI, B.; POMOGAILO, A.D.; DZHARDIMALIEVA, G.I. “Processing and properties of composite magnetic powders containing Co nanoparticles in polymeric matrix”. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 423, n. 1-2, Outubro de 2006, pg. 123-127.