

Materiais híbridos contendo nanopartículas de prata utilizados como agentes bactericidas no tratamento microbiológico de efluentes industriais para reuso

Rosa H. Lovatel, Gabriele R. Oliveira, Janaina S. Crespo, Larissa N. Carli, Marcelo Giovanela

Universidade de Caxias do Sul, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Núcleo de Pesquisas em Geoquímica, Caxias do Sul – RS, Brasil
E-mail: mgiovan1@ucs.br

Resumo

Diferentes técnicas têm sido desenvolvidas para eliminar micro-organismos presentes em efluentes industriais. Dentre elas, o uso de nanopartículas de prata (AgNPs) incorporadas em montmorilonita (MMT) têm demonstrado bons resultados. Neste contexto, esse estudo teve por objetivo preparar híbridos de alginato de sódio (ALG) e MMT, decorados com AgNPs, visando sua aplicação na remoção de micro-organismos presentes em efluentes industriais para reuso. As AgNPs foram sintetizadas por redução química de íons prata com boroidreto de sódio, na presença de citrato de sódio. Em seguida, uma suspensão contendo AgNPs, MMT e ALG foi preparada. Os híbridos de MMT-ALG-AgNPs foram obtidos a partir do gotejamento da suspensão em uma solução aquosa de cloreto de cálcio (4,0%, m/v). A avaliação do potencial bactericida desses híbridos foi realizada inicialmente utilizando-se o ensaio de difusão em ágar com dois tipos de micro-organismos (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*). Os testes mostraram a formação de um halo de inibição proeminente para ambas as bactérias. Na sequência, os híbridos foram caracterizados e utilizados no tratamento de um efluente industrial contendo coliformes. Os resultados indicaram uma redução de 98,5% em termos de coliformes totais, em relação à contagem inicial, confirmando o potencial deste material para o objetivo proposto.

Palavras-chave: Materiais Híbridos. Tratamento de Efluentes Industriais. Reuso.

Área Temática: Águas Residuárias

Hybrid materials containing silver nanoparticles used as bactericidal agents in the microbiological treatment of industrial wastewater treatment for reuse

Abstract

Different techniques have been developed for the removal of microorganisms from wastewater. Among them, the use of silver nanoparticles (AgNPs) incorporated in montmorillonite (MMT) has shown good results. In this context, the aim of this study was to prepare hybrids materials of MMT and sodium alginate (ALG) decorated with AgNPs for application in the removal of microorganisms present in industrial wastewater for reuse. The AgNPs were synthesized via chemical reduction of silver ions by sodium borohydride in the presence of sodium citrate. Simultaneously, a suspension containing MMT and ALG was prepared. Then, the AgNPs were incorporated into this suspension. The MMT-ALG-AgNPs

4º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 23 a 25 de Abril de 2014

*hybrids were obtained by dripping of the suspension into an aqueous solution of calcium chloride (4.0%, v/v). The evaluation of the bactericidal potential of the hybrids was performed using the agar diffusion assay against two types of microorganisms (*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*). The tests showed the formation of a prominent halo of inhibition for both bacteria. Then, the hybrids were used in the treatment of an industrial wastewater with coliforms. The results indicated a reduction of up to 98.5% of total coliforms, confirming the potential of these materials for the purpose of this work.*

Keywords: Hybrid Material. Wastewater Treatment. Reuse.

Theme Area: Wastewater

1 Introdução

A crescente preocupação pela preservação do meio ambiente e leis cada vez mais rígidas de responsabilidades sobre o descarte de resíduos têm levado muitos pesquisadores a desenvolverem produtos e processos com menor potencial poluidor. No entanto, em alguns processos industriais, tais como a fabricação de artigos de cutelaria na indústria metalúrgica, a geração de poluentes é inevitável. Assim, o desenvolvimento de estudos específicos para minimizar os impactos ambientais que podem ser causados pelos efluentes gerados neste processo industrial é de primordial importância. O reuso de efluentes industriais tem sido incentivada no Brasil, uma vez que esta prática traz inúmeros benefícios econômicos e ambientais. No entanto, ainda não há no país uma legislação que especifique os parâmetros físico-químicos e microbiológicos aceitáveis para esta prática. Desta forma, esses parâmetros dependerão da aplicação futura do efluente a ser reutilizado (BRASIL, 2012; BRASIL, 2006).

O uso de nanopartículas metálicas ancoradas em substratos sólidos tem um grande campo de aplicação (pontos quânticos, baterias solares, catalisadores, photocatalisadores, materiais antibacterianos, sensores, entre outros) (TOKARSKY *et al.*, 2010). Na última década, as nanopartículas de prata (AgNPs) vêm sendo amplamente utilizadas como agentes bactericidas na desinfecção da água e no tratamento microbiológico de efluentes, devido a uma série de vantagens sobre os desinfetantes tradicionais, tais como estabilidade química, segurança para o utilizador e eficiência bactericida (XU *et al.*, 2011).

A estrutura lamelar dos silicatos representa um excelente substrato para a fixação de nanopartículas metálicas e, devido a esta característica, as argilas possuem uma grande área superficial que lhes confere boas propriedades adsorventes (TOKARSKY *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2012). Isso possibilita que a montmorilonita (MMT), por exemplo, possa ser utilizada como material base para a fixação de AgNPs. Além disso, os híbridos à base de MMT e AgNPs podem ser uma alternativa pouco onerosa e muito interessante aos processos convencionais de desinfecção utilizados no tratamento de efluentes para reuso (XU *et al.*, 2011; PRAUS *et al.*, 2010; VALÀSKOVÀ *et al.*, 2010).

A fim de proporcionar uma maior resistência mecânica e uma melhor estabilidade à associação da MMT com as AgNPs, alguns estudos foram realizados utilizando-se matrizes poliméricas de ácido metacrílico, polivinilpirrolidona, nylon 6/6 e polimetilmetacrilato, como materiais de suporte para essas nanopartículas (GANGADHARAN *et al.*, 2010; DALLAS *et al.*, 2011). O alginato, que é um biopolímero extraído principalmente das algas marrons, é uma dessas matrizes poliméricas que tem se destacado nesse cenário, e que vem sendo extensivamente testado na remoção de contaminantes presentes em meio aquoso (LIU *et al.*, 2012).

Dentro deste contexto, o presente trabalho terá por objetivo preparar híbridos de MMT-ALG-AgNPs, visando sua posterior aplicação na remoção de micro-organismos

presentes em efluentes industriais para reuso. Os híbridos foram inicialmente caracterizados por meio de diversas técnicas instrumentais, tais como microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X (DRX), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). O potencial bactericida dos híbridos, por sua vez, foi avaliado em relação a dois tipos de micro-organismos: *Escherichia coli* (bactéria Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram-positiva).

2 Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Todos os produtos químicos utilizados neste trabalho possuem grau analítico: nitrato de prata (AgNO_3 , Merck), cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Merck), boroidreto de sódio (NaBH_4 , Merck), alginato de sódio de média viscosidade (ALG, Vetec) e citrato de sódio tribásico dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, Sigma-Aldrich). A MMT na forma sódica (MMT- Na^+) foi adquirida diretamente da Argel T. As soluções de AgNO_3 , $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, NaBH_4 e CaCl_2 , foram preparadas com água ultrapura (resistividade 18,2MΩ/cm), obtida a partir de um sistema Milli-Q (Millipore).

2.2 Síntese das AgNPs

As AgNPs foram preparadas pela redução química de íons Ag^+ por NaBH_4 na presença de citrato de sódio tribásico dihidratado (estabilizante). Este procedimento foi baseado no método descrito por Jana *et al.* (2001). O processo de preparação das AgNPs foi o seguinte: 100 mL de uma solução contendo 50 mL de AgNO_3 e 50 mL de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, ambas na concentração de 0,25 mmol/L, foram misturadas e mantidas sob agitação durante 30 s. Em seguida, uma solução de NaBH_4 1,00 mmol/L (recém-preparada) foi adicionada à mistura. Finalmente, o sistema foi agitado por mais 60 s e posteriormente armazenado em geladeira. A síntese foi realizada em ambiente climatizado ($23,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) e ao abrigo da luz.

2.3 Caracterização das AgNPs

As AgNPs foram caracterizadas por meio das técnicas de espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

A solução de 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 com caminho óptico de 10 nm. O equipamento foi zerado com um branco, anteriormente ao registro do espectro da solução de AgNPs.

A análise de MET foi realizada em um microscópio Jeol JEM-1200 Ex II, operando em uma voltagem de 80 kV. Para tanto, 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 48 h, sendo finalmente analisada no microscópio.

2.4 Preparação dos Híbridos de MMT-ALG-AgNPs

A metodologia utilizada na preparação dos híbridos de MMT-ALG-AgNPs baseou-se no método proposto por Liu *et al.* (2012). Inicialmente, a MMT (5,0 g) foi misturada a 100 mL de uma solução de AgNPs durante 12 h. Em seguida, adicionou-se à suspensão o

4º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 23 a 25 de Abril de 2014

ALG (1,0 g), sendo o sistema mantido sob agitação por mais 12 h. Ao término desse procedimento, a mistura foi lentamente gotejada com o auxílio de uma seringa em uma solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4,0%, m/v). Os híbridos formados foram deixados nessa solução por mais 48 h, em geladeira e ao abrigo da luz, sendo finalmente lavados várias vezes com água deionizada para remover o excesso da solução de cloreto de cálcio, sendo novamente armazenados a 10°C até o momento dos ensaios microbiológicos.

2.4.1 Caracterização dos Híbridos de MMT-ALG-AgNPs

Os híbridos foram caracterizados por meio das técnicas de MEV e MET.

A análise de MEV foi realizada em um microscópio Shimadzu SSX-550, operando a uma voltagem de 15 kV. Previamente à análise, as amostras foram recobertas com ouro durante 2,5 min.

A análise de MET foi realizada em um microscópio Jeol JEM-1200 Ex II, operando em uma voltagem de 80 kV. Para tanto, os híbridos foram previamente dispersos em água deionizada (1 gota da solução dos híbridos 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 48 h, sendo finalmente analisada no microscópio.

2.5 Ensaios Microbiológicos

2.5.1 Avaliação da Ação Bactericida dos Híbridos de MMT-ALG-AgNPs

Para avaliar a ação bactericida dos híbridos de MMT-ALG-AgNPs, foram selecionados dois micro-organismos: a *Escherichia coli* e o *Staphylococcus aureus*. Um método adequado para avaliar a eficiência de um agente bactericida consiste em medir o tamanho relativo à zona de inibição ao redor do agente testado (VALÀSKOVÀ *et al.*, 2010; GANGADHARAN *et al.*, 2010). Um inóculo padrão de cada micro-organismo foi esfregado sobre a superfície de uma placa de ágar nutritivo, onde os híbridos de MMT-ALG-AgNPs foram depositados. Em seguida, as placas foram incubadas durante 48 h e a 37°C em uma estufa bacteriológica, e as zonas de inibição formadas ao redor dos híbridos foram então medidas (VALÀSKOVÀ *et al.*, 2010).

2.5.2 Tratamento do Efluente Industrial com os Híbridos de MMT-ALG-AgNPs

Após a realização dos ensaios microbiológicos preliminares, os híbridos de MMT-ALG-AgNPs foram utilizados no tratamento de um efluente industrial para reuso proveniente de uma indústria metalúrgica com uma contagem inicial de coliformes totais de 730 UFC/mL. O ensaio consistiu em agitar (~ 150 rpm) cerca de 100 mL da amostra do efluente com 100 mg de híbrido por períodos de 5, 10, 15, 30, 45, 60, 70, 80 e 90 min. No final de cada uma destas etapas, a contagem de coliformes totais foi realizada novamente em todos os sistemas.

3 Resultados Preliminares

3.1 Caracterização das AgNPs

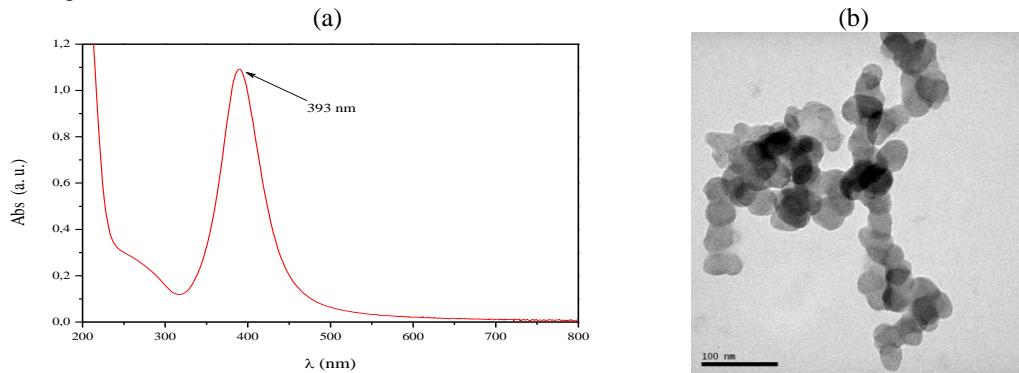
A Figura 1 (a) mostra o espectro de absorção molecular na região do UV-Vis da solução de AgNPs. Como pode ser observado, o espectro apresenta um máximo em 393 nm. De acordo com a literatura, esses espectros podem fornecer informações importantes sobre o tamanho e geometria das nanopartículas estudadas (JANA *et al.*, 2001). Geralmente, uma banda bem definida em torno de 400 nm indica a presença de AgNPs com formato esférico

4º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 23 a 25 de Abril de 2014

(PAL *et al.*, 2007). Esta constatação foi corroborada pela análise de MET (Figura 1 (b)), onde foi possível observar nanopartículas com diâmetros médios da ordem de 35 nm.

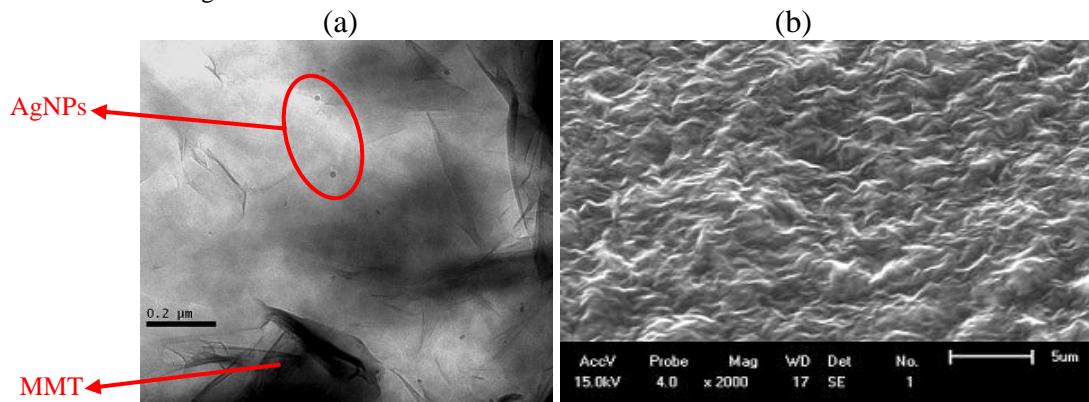
Figura 1 – (a) Espectro de absorção molecular na região do UV-Vis da solução de AgNPs; (b) Imagem de MET das AgNPs.



3.2 Caracterização dos Híbridos de MMT-ALG-AgNPs

A Figura 2 (a) mostra a imagem de MET do híbrido de MMT-ALG-AgNPs, onde é possível identificar a presença de AgNPs (esferas) e MMT (folhas). A imagem de MEV (Figura 2 (b)) permitiu a visualização da organização da superfície do híbrido. Os contornos de grão do ALG e da MMT desapareceram, dando lugar a uma estrutura desordenada, formada por flocos de alto e baixo relevo (NOGUEZ *et al.*, 2007).

Figura 2 – (a) Imagem de MET do híbrido de MMT-ALG-AgNPs; (b) Imagem de MEV do híbrido de MMT-ALG-AgNPs.

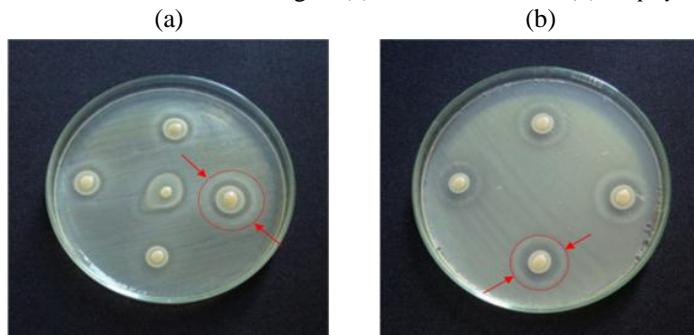


3.3 Ensaios Microbiológicos e Tratamento do Efluente Industrial com os Híbridos de MMT-ALG-AgNPs

As Figuras 3 (a) e 3 (b) apresentam os resultados obtidos nos ensaios microbiológicos para os micro-organismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente. Como pode ser constatado, os dois sistemas avaliados mostraram a presença de halos de inibição bastante nítidos ao redor dos híbridos de MMT-ALG-AgNPs, o que indica que os mesmos apresentam atividade bactericida em relação às duas bactérias testadas. Além disso, o tamanho desses halos de inibição foi menor para o *Staphylococcus aureus* (17-21 mm) do que para o *Escherichia coli* (23-29 mm). A *Escherichia coli*, por ser uma bactéria Gram-negativa, apresenta uma camada de peptidoglicanos (a nível de parede celular) menos espessa do que a *Staphylococcus aureus* (que é Gram-positiva), o que acaba facilitando a entrada e

consequentemente a difusão das AgNPs nas primeiras, aumentando a eficiência de inibição (SARIER, 2010).

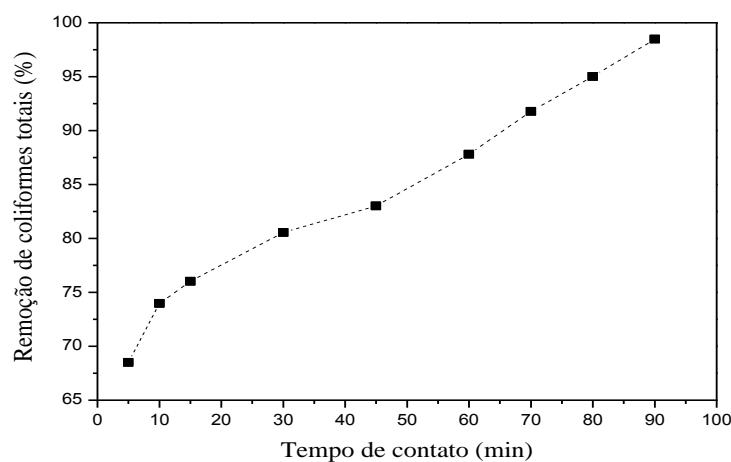
Figura 3 – Ensaios de difusão em ágar: (a) *Escherichia coli*; (b) *Staphylococcus aureus*.



Após a realização dos testes microbiológicos preliminares, os híbridos de MMT-ALG-AgNPs foram utilizados no tratamento de um efluente industrial para reuso proveniente de uma indústria metalúrgica com uma contagem de coliformes totais de 730 UFC/mL.

A Figura 4 mostra o efeito do tempo de contato dos híbridos de MMT-ALG-AgNPs com o efluente na contagem de coliformes totais. Como pode ser observado, a capacidade de remoção foi bastante efetiva nos primeiros 5 min, sendo o percentual de remoção de coliformes de 68,5%. Ao final do ensaio (90 min), a contagem total de coliformes foi reduzida para 11,0 UFC/mL. Os resultados obtidos neste experimento indicaram uma redução de até 98,5% de coliformes totais em relação à contagem total inicial (efluente sem tratamento).

Figura 4 – Efeito do tempo de contato em relação à remoção de coliformes no efluente industrial testado.



4 Conclusões

De um modo geral, os híbridos apresentaram uma elevada atividade bactericida em relação aos dois micro-organismos testados (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*). Os resultados obtidos nos ensaios microbiológicos com o efluente testado indicaram uma redução de até 98,5% de coliformes totais em relação à contagem total inicial (efluente sem tratamento).

Além disso, esses novos materiais parecem ser muito promissores como auxiliares no tratamento microbiológico de efluentes industriais para reuso.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES pelo apoio financeiro.

Referências

- BRASIL. Conselho Nacional de Recursos Hídricos, **Moção nº 61 de 10 de julho de 2012**. Recomenda promoção de ações de ciência e tecnologia para melhoria de técnicas de monitoramento e de tratamento de água de abastecimento e de efluentes, visando à remoção de micropoluentes emergentes e eliminação de micro-organismos patogênicos emergentes. Diário Oficial da União, 14 ago. 2012.
- BRASIL. Conselho Nacional de Recursos Hídricos, **Resolução CNRH nº54 de 28 de novembro de 2005**. Estabelece modalidades, diretrizes e critérios gerais para a prática de reúso direto não potável de água, e dá outras providências. Diário Oficial da União, 09 mar. 2006.
- TOKARSKY J.; CAPKOVÀ P.; KLEMM V.; RAFAJA D.; KUKUTSCHOVÁ J. **Adhesion of Silver Nanoparticles on the Montmorillonite Surface**. Journal of Physics and Chemistry of Solids, 71, p. 634-637, 2010.
- XU G.; QIAO X.; QIU X.; CHEN J. **Preparation and Characterization of Nano-silver Loaded Montmorillonite with Strong Antibacterial Activity and Slow Release Property**. J. Mater. Sci. Technol., 27, p. 685-690, 2011.
- LIU L.; WAN Y.; XIE Y.; ZHAI R.; ZHANG B.; LIU J. **The Removal of Dye from Aqueous Solution Using Alginate-Halloysite Nanotube Beads**. Chemical Engineering Journal, 187, p. 210-216, 2012.
- PRAUS P.; TURICOVÀ M.; MACHOVIC V.; STUDENTOVÀ S.; KLEMENTOVÀ M. **Characterization of Silver Nanoparticles Deposited on Montmorillonit**. Applied Clay Science, 49, p. 341-345, 2010.
- VALÀSKOVÀ M.; HUNDÀKOVÀ M.; KUTLÀKOVÀ K. M.; SEIDLEROVÀ J.; CAPCOVÀ P.; PAZDZIORA E.; MATEJOVÀ K.; HERMANÈK M.; KLEMM V; RAFAJA D. **Preparation and Characterization of Antibacterial Silver/Vermiculites and Silver/Montmorillonites**. Geochimica et Cosmochimica Acta, 74, p. 6287-6300, 2010.
- GANGADHARAN D.; HARSHWARDAN K.; GNANASEKAR G.; DIXIT D.; POPAT K. M.; ANAND P. S. **Polymeric Microspheres Containing Silver Nanoparticles as a Bactericidal Agent for Water Disinfection**. Water Research, 44, p. 5481-5487, 2010.
- DALLAS P.; SHARMA V. K.; ZBORIL R. **Silver Polymeric Nanocomposites as Advanced Antimicrobial Agents: Classification, Synthetic Paths, Applications, and Perspectives**. Advances in Colloid and Interface Science, 166, p. 119-135, 2011.
- JANA N. R.; GEARHEART L.; MURPHY C. J. **Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratio**. Chemical Communications, 37, p. 617-618, 2001.

4º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 23 a 25 de Abril de 2014

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, 73, p. 1712-1720, 2007.

NOGUEZ C. Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: The Influence of Shape and Physical Environment. The Journal of Physical Chemistry, 11, p. 3806-3819, 2007.

SARIER N.; ONDER E.; ERSOY S. The Modification of Na-Montmorillonite by Salts of Fatty Acids: An Easy Intercalation Process. Physicochemical and Engineering Aspects, 371, p. 40-49, 2010.