

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

Fernanda Morgana Machado

AVALIAÇÃO DO USO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
PARA TRATAMENTO DE ÁGUAS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência dos Alimentos, do Centro
de Ciências Agrárias, da
Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito final para
a obtenção do título de Mestre em
Ciência dos Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Cleide
Rosana Werneck Vieira, PhD.

Florianópolis
2012

Fernanda Morgana Machado

AVALIAÇÃO DO USO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
PARA TRATAMENTO DE ÁGUAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa
Catarina, para obtenção do grau de Mestre em Ciência dos
Alimentos.

Florianópolis, 16 de abril de 2013.

Professor Dr. (Coordenador do curso)

Banca Examinadora:

Universidade Federal de Santa Catarina
Orientador

Universidade Federal de Santa Catarina
MEMBRO

Universidade Federal de Santa Catarina
MEMBRO

Para as pessoas mais importantes da minha vida:
minha mãe Vilma Ehrhardt e minha avó Irma Probst.

AGRADECIMENTOS

À professora Cleide Rosana Werneck Vieira, símbolo de conhecimento e sabedoria, pela orientação, parceria e compreensão durante todo o mestrado.

Aos membros da banca, Roberta Juliano Ramos, Paulo Franchin e Gabriel Benedet Dutra, pela colaboração.

Ao professor Cesar Vítório Franco pela contribuição em todo o processo.

À toda equipe da empresa TechNano Solution (TNS), Raphael Serafim, Gabriel Dutra e Gabriel Nunes, pela parceria e contribuição para este trabalho. Em especial a André Nogueira, sempre presente com palavras de incentivo.

À minhas amigas e colegas de laboratório Andréia Cirolini, Cristhiane Cattani, Marília Miotto, Franciele Silva, pela grande amizade que construímos, pelas horas de trabalho juntas e pela cumplicidade.

À toda equipe do Numical/UFSC pela grande ajuda e parceria: Helen Silvestre, Andressa Baseggio, Norton Komora, Karin de Medeiros e Luciana Herrera da Silva.

Aos amigos do Laboratório de extensão pela amizade, carinho e pelo esclarecimento de várias dúvidas: Pedro Ivo Fuchs, Tatiana Hertel, Daiane Bobermin, Bianca Grandi, Fernanda Ambrosini, Eduardo Figueiredo, dona Mirian, Aloísio de Jesus Souza e Melina Noschwang.

Aos amigos do departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, que fizeram parte da rotina de trabalho, tornando-a mais agradável: Professora Elane S. Prudêncio, Professora Alcília de Francisco e Sr Bento Acácio e ao melhor secretário de todos, Sérgio de Souza.

À Daniela Mariana de Lima Bragion e Maria de Lourdes Lima Bragion, amigas que me ajudaram nesta etapa importante do trabalho, com seu conhecimento e apoio.

À toda a equipe do MIP/CCB/UFSC que me permitiram conciliar meu trabalho com meus estudos: Professor Carlos Roberto Zanetti, Professor André L. B. Báfica, Iraci Tosin Fernando Spiller, Daniel Mansur, Alexandre Nogueira, Marcelo Pires, Clarice Ligocki Pinto Pedro, Maria do Carmo Nascimento, Luan Aires, Luiza Petters Garcia, Marilene G. de Souza, Marcelo Cidade Gruschinske, Saionara Juliana Voltolini.

A todos os meus amigos que me apoiaram e incentivaram nestes últimos meses de sufoco: Vanderléia Lopes, Sandra Platt, Dete, Thiele Schwerz, Jéssica de Bona Ceolim, Cesar Murilo Barbi Junior, Marilusa da Rosa, Alexandre Diniz.

Ao povo brasileiro, que por meio da CAPES, financiou minha bolsa de mestrado.

A meu tio, Nilson Frederico Probst, pelo exemplo de responsabilidade, grande sabedoria e caráter.

A toda minha família, em especial minhas primas e amigas, pela compreensão e ajuda em todos os momentos.

A minha mãe Vilma Ehrhardt e minha avó, Irma Probst, pelo amor concedido nos momentos mais difíceis, companheirismo, carinho infindáveis e pelo papel mais do que especial na minha vida.

Agradeço a Deus e a meus anjos da guarda, que se fazem presente em tudo.

Tenha coragem e vá em frente!
Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los independentemente das circunstâncias. Devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.

Dalai Lama

RESUMO

O presente estudo abordou os problemas relacionados com a qualidade da água e as novas tecnologias para sua desinfecção. No primeiro capítulo foi realizada uma revisão bibliográfica sobre a água e sua nova legislação, nanotecnologia, nanopartículas de prata, métodos de caracterização de nanopartículas, além de técnicas microbiológicas para avaliação destas. O segundo capítulo teve como objetivo principal a impregnação de nanopartículas de prata em suporte inorgânico (sílica) e EVA (etileno vinil acetato) e a avaliação da atividade antimicrobiana. A preparação das nanopartículas de prata foi feita por meio da adição lenta de um agente redutor, nesse caso o NaBH_4 , à solução de um sal de prata com um estabilizante. A caracterização das nanopartículas foi realizada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Espectrofotometria de UV-Visível. Os testes mostraram a eficácia da impregnação de nanopartículas em sílica e EVA. O último capítulo teve como objetivo a avaliação da atividade antimicrobiana dos pellets com nanopartículas de prata frente a três tipos de água: água ultrapura, água subterrânea (de poço artesiano) e água de processo de uma indústria de alimentos. Os micro-organismos testados foram *Staphylococcus aureus* ATCC 3825, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Enterococcus faecalis* ATCC 4200 e *Escherichia coli* ATCC 8739. Os ensaios microbiológicos foram baseados no Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Immobilized Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions (ASTM E-2149). Foram utilizados 10g e 20g de pellets de EVA com nanopartículas de prata nos tempos de 1 minuto (tempo zero), 1 hora, 12 horas e 24 horas. Para avaliar a necessidade de contato entre o micro-organismo e a prata foi construído um modelo de filtro para desinfecção de água. Dessa forma foi adaptada a metodologia da ASTM E-2149 para a utilização nesse filtro, neste caso sem o contato dinâmico entre a nanopartículas e o micro-organismo. Foram realizados os testes de lixiviação de prata também nas amostras de água. Os resultados microbiológicos foram avaliados por análise estatística, utilizando o teste de Tukey e regressão linear. Em geral observou-se que as

nanopartículas de prata foram efetivas na redução dos microorganismos, no entanto ocorreu lixiviação de prata na água acima do estabelecido pela legislação. Frente a isso, as nanopartículas de prata mostraram desempenhar um importante papel nas aplicações relacionadas a desinfecções, por sua, eficácia, durabilidade e liberação controlada de íons prata com especial atenção focada na solução do problema de purificação de água.

Palavras-chave: Água. Atividade antimicrobiana. Nanopartículas de prata.

ABSTRACT

The present study addressed the problems related to water quality and new technologies for disinfection. The first chapter is a review about water and its new legislation, nanotechnology, silver nanoparticles, nanoparticle characterization methods and microbiological techniques for these evaluations. The second chapter describes the impregnation of silver nanoparticles in inorganic support (silica) and EVA (ethylene vinyl acetate) and antimicrobial activity. The preparation of silver nanoparticles was performed by slow addition of a reducing agent, in this case the NaBH_4 , the solution of a silver salt with a stabilizer. The characterization of nanoparticles was performed by Transmission Electron Microscopy (TEM), Scanning Electron Microscopy (SEM), Dynamic Light Scattering (DLS) and UV-Visible spectrophotometry. Tests have shown effectiveness of silica impregnation nanoparticles and EVA. The silver leaching test, however, showed the necessity of improving the matrix stability, since leaching of silver was above the prescribed by law. The last chapter describes the evaluation of silver nanoparticles pellets antimicrobial activity against three types of water: ultrapure water, groundwater (artesian) and food industry processed water. The micro-organisms tested were *Staphylococcus aureus* ATCC 3825, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Enterococcus faecalis* ATCC 4200 and *Escherichia coli* ATCC 8739. The microbiological assays were based on Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Immobilized Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions (ASTM E-2149). The amount of 10g and 20g of EVA pellets were used in silver nanoparticles in times of 1 minute (time zero), 1 hour, 12 hours and 24 hours. To assess the need for contact between the microorganism and silver a filter model for water disinfection was built. Thus methodology was adapted from ASTM E-2149 for this filter, in this case no dynamic contact between the nanoparticles and the micro-organism. Were also performed on samples of water leach tests silver. Microbiological results were evaluated through statistical analysis using Tukey test and linear regression. In brief it was observed that silver nanoparticles were effective in reducing micro-organisms, but silver leaching into the water was above the established by law. With this, the silver nanoparticles showed

play an important role in applications related to disinfection, in, efficiency, durability and controlled release of silver ions with special attention focused on solving the problem of water purification.

Keywords: Antimicrobial activity. Silver nanoparticles. Water.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da atividade antimicrobiana da prata.....	44
Figura 2 - Espectro de UV-Vis da reação conduzida com 600 RPM.....	63
Figura 3 - Distribuição dos tamanhos das nanopartículas obtidas na reação conduzida com 600 RPM.....	63
Figura 4 - Imagem de MET das nanopartículas obtidas na reação conduzida com 600 RPM (magnificação de 300.000)	64
Figura 5 - Microscopia eletrônica de transmissão da sílica pura	65
Figura 6 - Microscopia eletrônica de transmissão da sílica impregnada com as nanopartículas de prata (80 ml de solução de nanopartículas para cada grama de sílica).....	66
Figura 7 - Modelo de filtro	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano.....	39
Tabela 2 - Concentração média de Ag nas amostras de água utilizadas no teste de lixiviação baseada na norma, obtidas por análise de ICP-MS.	67
Tabela 3 – Staphylococcus aureus - Ensaio microbiológicos em água ultrapura artificialmente contaminada conforme a norma ASTM E-2149 – % da média de redução em UFC/mL e desvio padrão.....	81
Tabela 4 - <i>Klebsiella pneumoniae</i> - Ensaio microbiológicos em água ultrapura artificialmente contaminada conforme a norma ASTM E-2149 – % da média em UFC/mL e desvio padrão.....	82
Tabela 5 - <i>Escherichia coli</i> - Ensaio microbiológicos em água ultrapura artificialmente contaminada conforme a norma ASTM E-2149 – % média em UFC/mL e desvio padrão.....	83
Tabela 6 - <i>Enterococcus faecalis</i> - Ensaio microbiológicos em água ultrapura artificialmente contaminada conforme a norma ASTM E-2149 – % média e desvio padrão.....	84
Tabela 7 - Ensaio microbiológicos em água subterrânea (de poço artesiano) conforme a norma ASTM E-2149 – Ensaio 3...	85
Tabela 8 - Ensaio microbiológicos em água subterrânea (de poço artesiano) conforme a norma ASTM E-2149 – % média e desvio padrão.....	86
Tabela 9 - Ensaio microbiológicos em água de processo da indústria de alimentos - % média em UFC/mL e desvio padrão	87
Tabela 10 - <i>Klebsiella pneumoniae</i> - Ensaio microbiológicos em água ultrapura artificialmente contaminada conforme a norma ASTM E-2149 – % média e em UFC/mL e desvio padrão.....	88
Tabela 11 - <i>Staphylococcus aureus</i> - Ensaio microbiológicos em água ultrapura artificialmente contaminada conforme a norma ASTM E-2149 – % média em UFC/mL e desvio padrão.....	89
Tabela 12 - <i>Enterococcus faecalis</i> - Ensaio microbiológicos em água ultrapura artificialmente contaminada conforme a norma ASTM E-2149 – % média em UFC/mL e desvio padrão.....	90
Tabela 13 - <i>Escherichia coli</i> - Ensaio microbiológicos em água ultrapura artificialmente contaminada conforme a norma ASTM E-2149 – % média em UFC/mL e desvio padrão.....	91

Tabela 14 - Análise físico-química de água ultrapura, subterrânea e de processo industrial	92
Tabela 15 - Análise de ICP-MS avaliando-se o micro-organismo <i>S.aureus</i>	93
Tabela 16 - Análise de ICP-MS avaliando-se o micro-organismo <i>Klebsiella pneumoniae</i>	93
Tabela 17- Análise de ICP-MS avaliando-se o micro-organismo <i>Escherichia coli</i>	94
Tabela 18- Análise de ICP-MS avaliando-se o micro-organismo <i>Enterococcus faecalis</i> (µg/L).....	94
Tabela 19 - Teste de Tukey com nível 10 g. (Erro padrão: 2.94)96	
Tabela 20 - Teste de Tukey com nível 20 g. (Erro padrão: 2.94)96	
Tabela 21 - Teste de Tukey com Micro-organismos. (Erro padrão: 2.94)	97
Tabela 22 - Teste de Tukey com Micro-organismos. (Erro padrão: 2.94)	97
Tabela 23 – Regressão linear com micro-organismos	97
Tabela 24: Teste TuKey para níveis dentro de tempo.	98
Tabela 25 - Regressão linear ($Y_i =$; $X_{i=}$)	99
Tabela 26 - Teste TuKey para níveis dentro de tempo	99
Tabela 27 - Teste Tukey com nível 10 g. (Erro padrão: 2.94)..	100
Tabela 28 - Teste Tukey com nível 20 g. (Erro padrão: 2.94)..	100
Tabela 29 - Teste de Tukey com Micro-organismos. (Erro padrão: 2.94)	101
Tabela 30 - Teste de Tukey com Micro-organismos. (Erro padrão: 2.94)	101
Tabela 31 – Regressão linear com Micro-organismos	102
Tabela 32 – Análise de Variância	103
Tabela 33 - Teste de Turkey	103
Tabela 34 - Análise de Variância	104
Tabela 35 - Desdobramentos de locais dentro de micro-organismos - Independente de Tempo.....	105
Tabela 36 - Desdobramentos de micro-organismos dentro de local - Independente de tempo	105
Tabela 37 - Desdobramento de Locais dentro de cada tempo - Independente de micro-organismo	106
Tabela 38 - Regressão linear ($Y_i =$; $X_{i=}$)	106
Tabela 39 - Desdobramento de Micro-organismos dentro de cada tempo - Independente de local	106
Tabela 40 - Regressão linear ($Y_i =$; $X_i =$)	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EVA	Etileno vinil acetato
NPsAg	Nanopartículas de prata
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>K.pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ppm	Partes por milhão
FWHM	Full width at half maximum
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
RPM	Rotações por minuto
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	25
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
1.1 ÁGUA.....	29
1.1.1 Métodos convencionais e alternativos no tratamento da água	30
1.1.2 Água de consumo	32
1.1.3 Água subterrânea – de poço artesiano.....	33
1.1.4 Água de processo da indústria de alimentos	34
1.1.5 Legislação	35
1.1.6 Controle microbiológico.....	38
1.2 NANOTECNOLOGIA.....	40
1.2.1 Nanopartículas de prata	41
1.2.1.1 Avaliação da Atividade Antimicrobiana.....	43
1.2.2 Técnicas de Caracterização de Nanopartículas	44
1.2.2.1 Microscopia Eletrônica	44
1.2.2.2 Espalhamento de luz dinâmica (DLS).....	45
1.2.2.3 Espectrometria de massa atômica de plasma acoplado indutivamente – ICP – MS.....	46
1.2.2.4 Espectroscopia de UV-Vis	46
1.2.3 Matrizes para impregnação de nanopartículas de prata	47
1.2.3.1 Sílica.....	47
1.2.3.2 EVA	47
1.3 REFERÊNCIAS	48
CAPÍTULO 2 - SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E IMPREGNAÇÃO EM SÍLICA E PELLETS DE ETILENO ACETATO DE VINILA (EVA)	57
2.1 INTRODUÇÃO	59
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	60
2.2.1 Síntese de nanopartículas de prata	60
2.2.2 Impregnação das nanopartículas de prata em sílica ...	61
2.2.3 Impregnação das nanopartículas de prata em pellets de EVA.	61
2.2.4 Estabilidade das Nanopartículas.....	61
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62

2.4 CONCLUSÕES	67
2.5 REFERÊNCIAS	68

CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA IMPREGNADAS EM SÍLICA E EVA..... 71

3.1 INTRODUÇÃO	73
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	74
3.2.1 Amostras.....	74
3.2.2 Avaliação da atividade antimicrobiana de pellets com NPsAg por metodologia de contato dinâmico.....	75
3.3.2.1 Preparo dos meios de cultura	75
3.3.2.2 Preparo do inóculo	76
3.3.2.3 Análise microbiológica	76
3.3.2.4 Análise físico-química	78
3.3.2.5 Teste de lixiviação de prata	78
3.3.2.6 Análise estatística	79
3.2.3 Análise da atividade antimicrobiana de pellets de NPsAg por metodologia sem contato dinâmico.....	79
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
3.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana de pellets com NPsAg por metodologia de contato.....	81
3.3.1.1 Água ultrapura artificialmente contaminada	81
3.3.1.1.1 <i>Água ultrapura artificialmente contaminada por Staphylococcus aureus</i>	81
3.3.1.1.2 <i>Água ultrapura artificialmente contaminada por Klebsiella pneumoniae</i>	82
3.3.1.1.3 <i>Água ultrapura artificialmente contaminada por Escherichia coli</i>	83
3.3.1.1.4 <i>Água ultrapura artificialmente contaminada por Enterococcus faecalis</i>	84
3.3.1.1.5 <i>Água subterrânea – de poço artesiano</i>	85
3.3.1.1.6 <i>Água de processo da indústria de alimentos</i>	87
3.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana de pellets com NPsAg por metodologia sem contato.....	87
3.3.2.1 Água ultrapura artificialmente contaminada	87
3.3.2.1.1 <i>Água ultrapura artificialmente contaminada - Klebsiella pneumoniae</i>	87
3.3.2.1.2 <i>Água ultrapura artificialmente contaminada - Staphylococcus aureus</i>	89

3.2.2.1.3	Água ultrapura artificialmente contaminada - <i>Enterococcus faecalis</i>	90
3.2.2.1.4	Água ultrapura artificialmente contaminada - <i>Escherichia coli</i>	91
3.3.3	Análise físico-química	92
3.3.4	Teste de lixiviação de prata	93
3.3.5	Análise estatística	95
3.3.5.1	Análise da atividade antimicrobiana de pellets de NPsAg por metodologia de contato.....	95
3.3.5.2	Análise da atividade antimicrobiana de pellets de NPsAg por metodologia sem contato (filtro).....	100
3.3.5.3	Comparação de variáveis	103
3.4	CONCLUSÕES	108
3.5	REFERÊNCIAS	109

INTRODUÇÃO

A água é o recurso natural mais abundante na Terra, com um volume estimado de 1,36 bilhões de quilômetros cúbicos, recobrando dois terços da superfície do planeta sob a forma de oceanos, calotas polares, rios e lagos. É essencial à vida, o que significa que todos os organismos vivos, incluindo o homem, dependem dela para sobrevivência. É fundamental, entretanto, que os recursos hídricos apresentem condições físicas, químicas e microbiológicas adequadas para utilização (ZANCUL, 2006; HURLEY, SADIQ, MAZUMDER, 2012).

Antes de chegar à maioria das residências, a água deve receber um tratamento de desinfecção para assegurar a sua qualidade e segurança. No entanto, estudos recentes indicam que existe no mundo em torno de 1 bilhão de pessoas sem acesso a água potável. Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU, 2010), a cada oito segundos morre uma criança no planeta vítima de doenças relacionadas ao consumo de água contaminada, extimando-se que mais pessoas morrem devido ao consumo de água contaminada do que por violência no mundo. Cerca de 17 milhões de brasileiros ainda não têm acesso à água potável e segundo a UNICEF (2010), na América Latina e no Caribe cerca de 20 mil crianças morrem antes de completarem cinco anos de idade devido a diarreias agudas, o que poderia ser evitado mediante o acesso a condições de higiene adequadas, infraestrutura de saneamento e água potável.

O mesmo cenário desolador se verifica no Brasil que ainda vive um momento em que muitos brasileiros não têm acesso à água proveniente de uma estação de tratamento. Em função de sua posição socioeconômica, muitos utilizam água de poços artesanais, rios e outras fontes alternativas, agravando ainda mais o quadro da saúde pública no Brasil. O quadro é particularmente grave nas áreas rurais, onde o percentual de domicílios particulares permanentes não abastecidos com água da rede geral era de 82,2%, enquanto que nas áreas urbanas era de 10,9%. O Nordeste urbano (14,7%) era a região com o segundo pior percentual, atrás apenas do Norte (37%). Já no meio rural apenas 18,3% da população tinha acesso à rede geral de abastecimento, situação pior no Ceará (8%) e na Paraíba (10,3%) (REYMAO; SABER, 2007).

Visando a oferecer soluções seguras e de grande alcance no meio da população carente, um número significativo de iniciativas tem lançado mão da nanotecnologia como ferramenta efetiva e de baixo custo para endereçar esse grande desafio do século XXI.

Métodos de tratamento de água de consumo com base em processos catalíticos potencializados com o uso da nanotecnologia podem ser alternativas de baixo custo e de alta eficiência para os métodos tradicionais, em particular em regiões carentes e de acesso limitado a outras técnicas, como nas regiões do semi-árido brasileiro (ORTIZ-IBARRA, 2007).

Estudos foram conduzidos com prata impregnada em filtros de carbono e foi verificada a sua capacidade de reduzir a atividade bacteriana (LE PAPE, 2002; LE PAPE, 2004; ORTIZ-IBARRA, 2007).

Filtros de cerâmica impregnados com nanop prata foram usados em laboratório para testar o tratamento de água de uso domiciliar. Os filtros removeram 97.8% a 100% da quantidade inicial de *E. coli*. Estes resultados mostraram que o uso de filtros de cerâmica impregnados com nanop prata são efetivos e sustentáveis quando aplicados na tecnologia de tratamento de água (OYANEDEL-CRAVERAND, 2008).

Em consonância com as soluções ilustradas, pretende-se utilizar nanopartículas de prata como agente antimicrobiano na desinfecção da água.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ÁGUA

A importância da água denota da Grécia antiga, em que a consideravam como sendo um dos elementos fundamentais da matéria. Aristóteles achava que a água fosse um dos quatro elementos fundamentais. Por muito tempo pensou-se que a água era um elemento; somente no século XVIII é que experimentos evidenciaram que a água era um composto molecular, formado por hidrogênio e oxigênio, cuja fórmula é H_2O (CHANG, 2006).

Desde a antiguidade há registros sobre a forte relação entre problemas de saúde e a vida em comunidade, destacando-se as questões ligadas à obtenção de água e alimento, bem como a melhoria do ambiente físico (DIMITROV, 2000).

Segundo Amson et. al, 2006, as doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são causadas por agentes biológicos, químicos ou físicos, os quais penetram no organismo humano pela ingestão de água ou alimentos contaminados. Vários são os agentes causadores de doenças, dentre eles *Escherichia coli* (*E.coli*).

Como resultado dos baixos índices de tratamento, 65% das internações hospitalares no país são devidos às doenças transmitidas pela água. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2010), mais de cinco milhões de pessoas morrem por ano no mundo (número equivalente a toda a população de um país como a Finlândia) devido às doenças transmitidas pela água.

Freitas et al. (2001) estudaram a importância da análise de água para a saúde pública alertando que em países em desenvolvimento, principalmente, a água ainda é um dos principais responsáveis por doenças de veiculação hídrica. Este estudo mostrou que a qualidade da água de poço e de rede, consumidas em duas micro-regiões dos municípios de Duque de Caxias e São Gonçalo, estava fora dos padrões de potabilidade, podendo representar possíveis riscos à saúde das populações dessas regiões.

Vários estudos têm demonstrado, por meio de análises bacteriológicas de amostras de água, que, principalmente em zonas rurais e periféricas, é alto o índice de amostras de água consideradas inadequadas ao consumo humano, evidenciando os efeitos indesejáveis da falta de saneamento, ou seja, da falta de cobertura da rede de abastecimento de água e esgoto,

somando-se a esse fato a pobreza, a baixa qualidade de vida e o nível educacional da população (D'ÁGUILA et al., 2000).

Além de trabalhos que demonstram a preocupação com a qualidade da água consumida, encontram-se também na literatura científica, relatos de pesquisas que associam o inadequado armazenamento de água e os possíveis riscos à saúde, principalmente em decorrência da carência de saneamento ambiental em áreas ocupadas desordenadamente, como as favelas (OLIVEIRA; VALLA, 2001).

Observada a importância do controle de qualidade microbiológico da água para evitar o aparecimento de doenças, verificam-se os usos mais comuns e frequentes dos recursos hídricos para realizar esse controle: água de consumo, para uso doméstico, irrigação, uso industrial, principalmente na indústria de alimentos e hidroeletricidade (TUNDISI, 2003).

Como observado, sempre houve grande dependência dos recursos hídricos para o desenvolvimento econômico. A água funciona como fator de desenvolvimento, pois ela é utilizada para inúmeros usos diretamente relacionados com a economia regional, nacional e internacional (TUNDISI, 2003).

1.1.1 Métodos convencionais e alternativos no tratamento da água

A legislação classifica a água de acordo com a sua finalidade. De acordo com a Portaria MS no. 2.914/2011, a água potável é definida como: água para consumo humano cujos parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e radioativos atendam ao padrão de potabilidade e que não ofereça riscos à saúde (BRASIL, 2011).

Apesar de diferenças nas técnicas utilizadas, tanto as legislações internacionais como nacionais preconizam a qualidade da água para o consumo humano, conforme a Diretiva 98/83 da União Europeia que prevê o dever do Estado em garantir que a água destinada ao consumo humano seja salubre e limpa. Para tanto, entende-se que a água não contenha micro-organismos, parasitas nem quaisquer substâncias em quantidades ou concentrações que constituam um perigo potencial para a saúde humana.

Nas estações de tratamento, e na produção de filtros domésticos de purificação de água, os métodos convencionais nem sempre conseguem eliminar todos os micro-organismos necessários e satisfazer a legislação. (BRASIL, 2011).

Nas estações de tratamento o método mais utilizado na desinfecção da água envolve a oxidação dos organismos nela presentes pela adição de compostos de cloro. Esse tratamento, no entanto, depende de uma disponibilidade do agente químico que é consumido no processo e, além disso, leva à formação de compostos indesejados e nocivos ao homem e ao ambiente (DROSTE, 1997).

Já os filtros domésticos de purificação de água têm utilizado várias técnicas acopladas para atingir o seu objetivo, como a utilização de membranas de diversos tipos, carvão ativado e lâmpadas ultravioleta (UV) (JUNIOR, 2004).

Na indústria de alimentos utilizam-se recursos adicionais, como membranas porosas, para desinfecção da água proveniente das estações de tratamento. A utilização de água de abastecimento de boa qualidade é condição essencial para um controle higiênico-sanitário. Assim, se a fonte de abastecimento da indústria se apresenta contaminada por matéria fecal, o risco da introdução de micro-organismos patogênicos é muito alto. Além disso, a água apresenta uma microbiota natural, composta de micro-organismos não-patogênicos, mas que se constituem em importantes agentes de deterioração, em virtude de suas atividades proteolíticas e lipolíticas (JUNIOR, 2004).

Visando oferecer soluções seguras e de grande alcance a todos, um número significativo de iniciativas tem lançado mão da nanotecnologia como ferramenta efetiva e de baixo custo para esse grande desafio do século XXI.

Nanopartículas de prata estão sendo utilizadas em diversos estudos para a desinfecção de água. Na Índia, país que enfrenta problemas de abastecimento de água semelhante ao do Brasil, foi divulgada a utilização de princípios de nanotecnologia para purificação de água direcionada à população carente. Trata-se de um filtro, chamado de *swach*, desenvolvido pelo Grupo Tata (2010), que usa cinzas de casca de arroz impregnadas com nanopartículas de prata.

Em vários outros países do terceiro mundo, a organização não governamental *Potters for Peace* (2010) tem auxiliado, desde 1998, a produção de purificadores de água cerâmicos a

base de prata coloidal. Experiência de campo e testes clínicos tem mostrado que estes filtros eliminam acima de 99,9% de agentes patogênicos presentes na água.

1.1.2 Água de consumo

A água destinada ao consumo humano deve atender a certos requisitos de qualidade, os quais variam de acordo com diferentes realidades. Naturalmente a água contém impurezas que podem ser caracterizadas como de ordem física, química ou biológica e os teores dessas impurezas devem ser limitados até um nível não prejudicial ao ser humano, sendo estabelecidos pelos órgãos de saúde pública, como padrões de potabilidade (HELLER, 1997).

Em consonância com a nova legislação outorgada em 2011 (BRASIL, 2011), Andrade (1986), já dizia que a água potável é aquela que não contém agentes patogênicos nem substâncias químicas além dos limites de tolerância, é própria para o consumo humano; por isso o seu uso deve ser entendido fundamentalmente como fator contributivo no controle de doenças, no aumento de vida média e, sobremaneira, na diminuição da mortalidade infantil.

A contaminação do sistema público de abastecimento de água, por esgotos, geralmente é detectada pela presença de coliformes na água: trata-se de um grupo de bactérias, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, o qual representa a maior e mais heterogênea coleção de bacilos Gram-negativos, sendo considerados os principais anaeróbios facultativos presentes no intestino grosso. O gênero *Escherichia* consiste em cinco espécies e a *Escherichia coli* é a mais comum e clinicamente importante, por se tratar de um bactéria termotolerante, de origem exclusivamente fecal, utilizada como um indicador de contaminação da água por fezes de animais (D'ÁGUILA et al., 2000).

Certamente o melhor método de assegurar a água adequada para o consumo consiste em formas de proteção, evitando-se contaminação por dejetos animais e humanos, os quais podem conter grande variedade de bactérias, vírus, protozoários e helmintos. Falhas na proteção e tratamento

efetivo, expõem a comunidade a riscos de contaminação por doenças intestinais e outras infecciosas (HELLER, 1997).

Os principais agentes biológicos encontrados nas águas contaminadas são as bactérias patogênicas, responsáveis pelos numerosos casos de enterites, diarreias infantis e doenças epidêmicas, como a febre tifoide e a cólera, com resultados frequentemente letais; e os vírus, que são mais comumente encontrados nas águas contaminadas por dejetos humanos, com destaque para os da poliomielite e da hepatite infecciosa. Dentre os parasitas que podem ser ingeridos através da água, destaca-se a *Entamoeba histolytica*, causadora da amebíase, em alguns casos com complicações hepáticas (D'ÁGUILA et al., 2000). Alguns insetos vetores, como o *Aedes aegypti*, utilizam a água como meio de proliferação, ou seja, local onde completam seu ciclo biológico.

1.1.3 Água subterrânea – de poço artesiano

Água subterrânea é toda a água que existe abaixo da superfície da Terra, preenchendo poros, vazios intergranulares das rochas sedimentares, e fraturas, falhas e fissuras das rochas compactas. As águas subterrâneas cumprem uma fase do ciclo hidrológico, uma vez que constituem uma parcela da água precipitada (BORGUETTI et al., 2004).

Ana (2002) aponta as seguintes vantagens das águas subterrâneas:

- São mais protegidas da poluição;
- Baixo custo de sua captação e distribuição. A captação sendo próxima da área consumidora torna viável o processo de distribuição;
- Dispensa o uso de tratamento, sendo vantajoso economicamente, e mais seguro para a saúde humana;
- Poços podem ser perfurados à medida que aumente a necessidade, dispensando grandes investimentos de uma única vez.

As águas de superfícies, proveniente de rios e riachos, estão sujeitas a toda espécie de impurezas, por receber, durante

os períodos de chuva, águas de enxurradas que carregam substâncias poluidoras. Além disso, recebem águas residuais de indústrias, despejos de vilarejos e esgotos urbanos. Como consequência é necessário um tratamento adequado para o seu aproveitamento industrial. (JUNIOR, 2004).

Este tipo de água pode ser observada na Resolução nº 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), para águas da classe 1 – “especial”, que se destinam ao abastecimento humano, com desinfecção (BRASIL, 2005).

A água subterrânea, por exemplo, além de ser um bem econômico, é considerada mundialmente uma fonte imprescindível de abastecimento para consumo humano, para as populações que não têm acesso à rede pública de abastecimento ou para aqueles que, tendo acesso a uma rede de abastecimento, têm o fornecimento com frequência irregular (FREITAS, BRILHANTE, ALMEIDA, 2001)

As águas subterrâneas são adquiridas por meio de poços. Nestes, a água subirá até atingir o nível da linha piezométrica (superfície que representa o nível de pressão do aquífero). Se a piezométrica estiver acima do terreno, a água jorrará. Caso contrário, estando a piezométrica abaixo do nível do terreno, a água não jorrará. Para alguns, o poço é artesiano apenas quando ele jorra e, sendo não-jorrante, ele é semi-artesiano (FREITAS, BRILHANTE, ALMEIDA, 2001).

1.1.4 Água de processo da indústria de alimentos

A água é um dos principais componentes de diversas operações em indústrias de alimentos. É usada como veículo para aquecimento e resfriamento, assim como para limpeza e sanitização de equipamentos. A água é usada, ainda como um ingrediente ou veículo para incorporar ingredientes a alimentos (LEITE et al., 2003).

O controle da qualidade da água industrial deve ser realizado sistematicamente, visando a atender aos padrões e recomendações exigidas pela legislação. Assim, auxilia na garantia da qualidade sensorial e microbiológica dos alimentos produzidos, na segurança nos processos industriais, na maior eficiência das soluções de limpeza e sanitização e na redução de problemas operacionais devido à formação de depósitos,

incrustações e corrosão em superfícies e metais. Além disso, contribui para a redução dos custos de produção em função da maior vida útil de equipamentos e utensílios. (CASTRO, 2006).

Em relação à qualidade microbiológica, a água pode atuar como veículo de micro-organismos patogênicos e deteriorantes, constituindo um risco à qualidade do alimento e à saúde do consumidor (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

A utilização de água pela indústria pode ocorrer de diversas formas, tais como: incorporação ao produto; lavagens de máquinas, tubulações e pisos; águas de sistemas de resfriamento e geradores de vapor; águas utilizadas diretamente nas etapas do processo industrial ou incorporadas aos produtos; esgotos sanitários dos funcionários. Exceto pelos volumes de águas incorporados aos produtos e pelas perdas por evaporação, as águas tornam-se contaminadas por resíduos do processo industrial ou pelas perdas de energia térmica, originando assim os efluentes líquidos (CASTRO, 2006).

Frente a todos esses fatores, observa-se a necessidade de maior atenção ao controle microbiológico da água da indústria de alimentos.

1.1.5 Legislação

A legislação classifica a água de acordo com a sua finalidade. Desde 1934, no Brasil a água é assunto amplamente discutido na legislação, porém sem grandes avanços reais.

Em 2000, o Ministério da Saúde, em parceria com a Representação no Brasil da OMS, coordenou o processo de revisão e atualização da legislação brasileira sobre potabilidade da água, resultando na publicação da Portaria MS nº 1469/2000, que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade (BRASIL, 2000a).

Recentemente em 2011, a Portaria MS nº 2.914/2011 revogou a Portaria MS nº. 518/2004 e demonstrou maiores avanços.

Pode-se observar, em ordem decrescente, o desenrolar da legislação federal acerca do tema:

- PORTARIA MINISTÉRIO DA SAÚDE Nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011 - Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. (BRASIL, 2011).
- PORTARIA FUNASA Nº 177 de 21 de março de 2011 - Estabelece as diretrizes, competências e atribuições do programa nacional de apoio ao controle da qualidade da água para consumo humano (BRASIL, 2011).
- DECRETO Nº 5.440, de 4 de maio de 2005 - Estabelece definições e procedimentos sobre o controle de qualidade da água de sistemas de abastecimento e institui mecanismos e instrumentos para divulgação de informação ao consumidor sobre a qualidade da água para consumo humano (BRASIL, 2005).
- RESOLUÇÃO CONAMA Nº 357, de 17 de março de 2005 - Estabelece a classificação das águas doces, salobras e salinas do território nacional, em substituição a Resolução CONAMA 020, de 1986 (BRASIL, 2005).
- PORTARIA MS (MINISTÉRIO DA SAÚDE) Nº 518, de 25 de março de 2004 – Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências (BRASIL, 2004).
- PORTARIA MS Nº 1.469, de 29 de dezembro de 2000 – Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. (Revogada pela Portaria Ministerial nº 518 de 25/03/2004) (BRASIL, 2000).
- RESOLUÇÃO CONAMA Nº 274, de 29 de novembro de 2000 – Classificação das águas doces, salobras e salinas

essencial à defesa dos níveis de qualidade, avaliados por parâmetros e indicadores específicos (BRASIL, 2000).

- LEI Nº 9.984, de 17 de julho de 2000 – Dispõe sobre a criação da Agência Nacional de Água – ANA (BRASIL, 2000).
- RESOLUÇÃO CONJUNTA SECRETARIA DE SAÚDE (SS)/SECRETARIA DE MEIO AMBIENTE (SMA) Nº 1, de 26 de agosto de 1997 – Dispõe o teor mínimo de cloro residual livre na rede de abastecimento de água (BRASIL, 1997).
- LEI Nº 9.433, de 8 de janeiro de 1997 – Institui a Política de Recursos Hídricos, cria o Sistema de Gerenciamento de Recursos Hídricos (BRASIL, 1997).
- PORTARIA DO CENTRO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (CVS) Nº 21, de 19 de dezembro de 1991 – Disciplina o padrão bacteriológico das águas de irrigação de plantações de hortaliças e frutas rasteiras (BRASIL, 1991).
- PORTARIA MS Nº 36, de 19 de janeiro de 1990 – Aprova, na forma do Anexo a esta Portaria, as normas e o padrão de Potabilidade da Água destinada ao Consumo Humano, a serem observadas em todo o território nacional. (Substituída pela PORTARIA MS Nº 1.469 de 29/12/2000) (BRASIL, 1990).
- RESOLUÇÃO CONAMA Nº 20, de 18 de junho de 1986 – Estabelece classificação das águas doces, salobras e salinas do Território Nacional (BRASIL, 1986).
- PORTARIA MS Nº 443, de 03 de outubro de 1978 – Estabelece os requisitos sanitários mínimos a serem obedecidos no projeto, construção, operação e manutenção dos serviços de abastecimento público de água para consumo humano, com a finalidade de obter e manter a potabilidade da água, em obediência ao

disposto no artigo 9 do Decreto 79.367 de 09 de Março de 1977 (BRASIL, 1978).

- DECRETO Nº 79.367, de 9 de março de 1977 – Dispõe sobre normas e o padrão de potabilidade de água e da outras providências (BRASIL, 1977).
- PORTARIA Nº 635, de 26 de dezembro de 1975 – Aprova as Normas e Padrões sobre a fluoretação da água destinada ao consumo humano dos sistemas públicos de abastecimento (BRASIL, 1975).
- DECRETO Nº 76.872, de 22 de dezembro de 1975 - Regulamenta a Lei 6.050, de 24 de Maio de 1974, que dispõe sobre a Fluoretação da Água em Sistemas Públicos de Abastecimento (BRASIL, 1975).
- LEI N.º 6.050, de 24 de Maio de 1974 - Dispõe sobre a Fluoretação da Água em Sistemas de Abastecimento quando existir Estação de Tratamento (BRASIL, 1974).
- DECRETO Nº 24.643, de 10 de julho de 1934 – Código de Águas (BRASIL, 1934).

1.1.6 Controle microbiológico

Em relação às análises sugeridas para micro-organismos em água de consumo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o Ministério da Agricultura e a União Européia apresentam como senso comum a realização da pesquisa de *Escherichia coli* ou coliformes termotolerantes e a contagem de bactérias heterotróficas (ausência em 100 ml), conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano

Parâmetro	VMP (Valor máximo estabelecido) ⁽¹⁾
Água para consumo humano⁽²⁾	
<i>Escherichia coli</i> ou coliformes termotolerantes ⁽³⁾	Ausência em 100mL
Água na saída do tratamento	
Coliformes totais	Ausência em 100mL
Água tratada no sistema de distribuição (reservatórios e rede)	
<i>Escherichia coli</i> ou coliformes termotolerantes ⁽³⁾	Ausência em 100mL
Coliformes totais	Sistemas ou soluções alternativas coletivas que abastecem menos de 20.000 habitantes / Apenas uma amostra, entre as amostras examinadas no mês, poderá apresentar resultado positivo
	Sistemas ou soluções alternativas coletivas que abastecem a partir de 20.000 habitantes / Ausência em 100 mL em 95% das amostras examinadas no mês

Legenda: (1) valor máximo estabelecido; (2) água para consumo humano em toda e qualquer situação, incluindo fontes individuais como poços, minas, nascentes, dentre outras; (3) a detecção de *Escherichia coli* deve ser preferencialmente adotada.

Fonte: Portaria MS no. 2.914/2011.

Coliformes termotolerantes são classificados como bactérias do grupo coliforme que fermentam a lactose a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ em 24 horas; tendo como principal representante a *Escherichia coli*, de origem exclusivamente fecal (BRASIL, 2004).

Já a *Escherichia coli* é definida como uma bactéria do grupo coliforme que fermenta a lactose e manitol, com produção de ácido e gás a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ em 24 horas produz indol a partir do triptofano, oxidase negativa, não hidrolisa a ureia e apresenta atividade das enzimas β -galactosidase e β -glucoronidase, sendo considerada o mais específico indicador de contaminação fecal

recente e de eventual presença de organismos patogênicos (BRASIL, 2004).

Por fim, a contagem de bactérias heterotróficas é definida como a determinação da densidade de bactérias que são capazes de produzir unidades formadoras de colônias (UFC), na presença de compostos orgânicos contidos em meio de cultura apropriada, sob condições pré-estabelecidas de incubação: $35,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 48 horas (BRASIL, 2011). Em 20% das amostras mensais para análise de coliformes totais nos sistemas de distribuição, deve ser efetuada a Contagem de bactérias heterotróficas e, uma vez excedidas 500 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL, devem ser providenciadas imediata coleta, inspeção local e, se constatada irregularidade, outras providências cabíveis (BRASIL, 2004).

Para a garantia da qualidade microbiológica da água outros padrões devem ser seguidos, de acordo com a Portaria nº 2.914/2011 (BRASIL, 2011).

Em complementação às exigências relativas aos indicadores microbiológicos, deve ser observado o padrão de turbidez expresso na Tabela 2.

1.2 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é um termo genérico para um conjunto de tecnologias, técnicas e processos para a preparação, caracterização, manipulação e controle de átomos ou moléculas para construir novos materiais em escala de nanômetros, com novas propriedades, inerentes as suas dimensões. As características dos materiais e produtos nanométricos devem impactar os mais diversos setores industriais, como por exemplo químico, farmacêutico (ALENCAR, 2008).

Nos últimos tempos vem ocorrendo uma transformação na ciência e na tecnologia, mostrando que os materiais em nanoescala podem apresentar propriedades que diferem daquelas em escala macroscópica. A esta ciência que estuda estes novos materiais em escala nanométrica foi atribuído o nome de nanociência, porém é mais comumente chamada de nanotecnologia (DURAN et al., 2010, MENDONÇA, 2009).

Apesar de a ciência dos átomos e moléculas simples e a ciência da matéria já estarem bem estabelecidas e

fundamentadas, a nanotecnologia encontra-se em uma fase inicial, pois ainda há muito a ser estudado sobre o comportamento dos materiais em nanoescala (DURAN et. al. 2006, MENDONÇA, 2009). As partículas em tamanho nanométrico apresentam uma grande área superficial, além de exibirem propriedades ópticas, magnéticas, mecânicas ou químicas que diferem das superfícies e partículas em escala macroscópicas (QUINA, 2004, MENDONÇA, 2009).

1.2.1 Nanopartículas de prata

Os metais nobres coexistem com o ser humano de forma amigável e harmoniosa desde os primórdios da civilização. Existe um laço profundo entre essa harmoniosa coexistência e o progresso da civilização humana. Houve, porém um momento em que o uso dos metais nobres passou a ser não apenas uma forma de expressar e acumular riqueza. Um novo valor, porém, associado a uma funcionalidade passou a ser notado, o de proteger a saúde dos seres humanos contra doenças (ANSHUP, 2009).

As propriedades bactericidas da prata já eram utilizadas há 6.000 anos pelos sumérios que armazenavam água em recipientes de prata e assim mantinham-na fresca por mais tempo e também colocavam moedas de prata nos recipientes com leite para evitar que estragassem. Durante as grandes epidemias, as pessoas que utilizavam talheres de prata tinham mais chances de sobreviver e as crianças pequenas mantinham a imunidade. Os ferimentos eram tratados com prata para acelerar a cura (CHEN, 2008).

Nesse cenário, a prata se destacou dos demais por sua elevada eficiência. Os escritos de Heródoto sugeriam que Ciro, o grande (Pérsia, 550 – 529) consumia água fervida em jarro de prata (PRADEEP; ANSHUP, 2009). O seu uso como desinfetante e como agente preservador de água e alimentos tem sido reportado de forma constante ao longo das civilizações (Esparta, Grécia, Roma, Fenícia, Macedônia). Hipócrates, o pai da medicina, promoveu o uso da prata como cicatrizante de ferimentos. Alexandre, o grande, (335 a.C.) aconselhado por

Aristóteles, armazenava água previamente fervida em vasilhames de prata.

Evidências foram encontradas sobre o uso de prata na forma de sais de nitrato como agente anti-infeccioso, na farmacopeia Romana. Durante o século XIII, Lanfranc utilizou tubos de prata para introdução de alimentos através de fístulas (RUTKOW, 1988). Joseph Lister promoveu o uso de fios de prata em suturas. O mais notório evento do século XVIII e com repercussão até os dias de hoje partiu do obstetra alemão Crede que popularizou o uso de uma solução 1% de nitrato de prata na prevenção da oftalmia neonatal livrando milhares de crianças de cegueira irreversível, sendo aplicado em recém nascidos até os dias de hoje.

A proliferação de produtos comerciais com base em prata tem como ícone de sucesso a sulfadiazina de prata no tratamento de queimaduras de pele insubstituível como forma de tratamento de queimados nos hospitais. O primeiro relato do uso de prata como elemento filtrante, veio do emprego de malhas de prata em filtros para desinfecção de água (KRAUSE, 1936), seguido de tentativas de imobilização de prata em carbono ativado para a desinfecção da água (RENN, 1966).

Apesar da ação benéfica do uso da prata ter sido notada ao longo do desenvolvimento humano, até o final da década de 1990 ela se apresentava para a indústria como uma solução onerosa nas aplicações domésticas devido ao elevado custo da prata e da baixa taxa de liberação iônica. Com o desenvolvimento da nanociência e o controle sobre as dimensões nanométricas das emulsões de prata, o cenário mudou radicalmente. Na escala nanométrica vale-se da enorme relação área superficial/volume e não na quantidade de prata utilizada, além das interessantes propriedades advindas dos materiais quando se opera nessa escala. Desse modo, conseguiu-se uma maior superfície ativa, aumentando a capacidade bactericida. Um grama de prata, reduzida a escala nano, tem uma superfície de contato de centenas de metros quadrados (CHEN, 2008).

Ao longo das últimas décadas, várias pesquisas foram realizadas com a utilização de íons metálicos na desinfecção de água (FENG, 2000; CHOCHAN, 2004). A prata apresenta propriedades antimicrobianas para um largo espectro de micro-

organismos, incluindo bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos (PANÁCEK 2006).

Assim, as nanopartículas de prata passam a desempenhar um importante papel nas aplicações relacionadas a desinfecções, por seu baixo custo, eficácia, durabilidade e liberação controlada de íons prata com especial atenção focada na solução do problema de purificação de água.

1.2.1.1 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

A ação inibitória e bactericida de íons de prata frente um largo espectro de micro-organismos já é conhecida há bastante tempo e recentemente tem recebido atenção por sua atividade antimicrobiana que oferece possibilidades de uso com propósitos médicos e de higiene (DURAN, 2010).

Reduzir o tamanho da partícula é uma eficiente ferramenta para aumentar sua biocompatibilidade. A nanotecnologia estende a ciência de materiais para o domínio de partículas e interfaces com dimensões extremamente pequenas, da ordem de um a cem nanômetros. Partículas deste tamanho, ou "nanopartículas", apresentam uma grande área superficial e, frequentemente, exibem propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas ou químicas distintas de partículas e superfícies macroscópicas. O aproveitamento dessas propriedades em aplicações tecnológicas forma a base da nanotecnologia de materiais (QUINA, 2004).

Recentemente, foi observada atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata em fungos e também bactérias patogênicas: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhi*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* (GAJBHIYE; KESHARWANI; GADE; RAI, 2009). Estudos realizados (MORONES, 2005) também comprovaram atividade das nanopartículas de prata contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella Typhi*.

Em adição a atividade antimicrobiana, os mecanismos de ação e toxicidade também são de suma importância e vários estudos estão em andamento para melhor elucidar esses aspectos (DURAN, 2010).

O efeito inibitório da prata é provavelmente a soma de mecanismos de ação distintos. Acredita-se que íons Ag⁺ interagem com grupos sulfúricos nas membranas dos micro-

organismos, causando desregulação de sua permeabilidade e a morte da célula microbiana, como mostra a Figura 1 (DAMM; MÜNSTEDT; RÖSCH, 2008). Foi observado que níveis micromolares de íons de prata agem na cadeia respiratória ao desacoplar o transporte de elétrons da fosforilação oxidativa, assim, inibe as enzimas da cadeia respiratória ou interfere com a permeabilidade da membrana a prótons e fosfato (FENG, 2000). Os íons Ag^+ também podem interagir com o DNA impedindo a reprodução celular (DAMM, 2008).

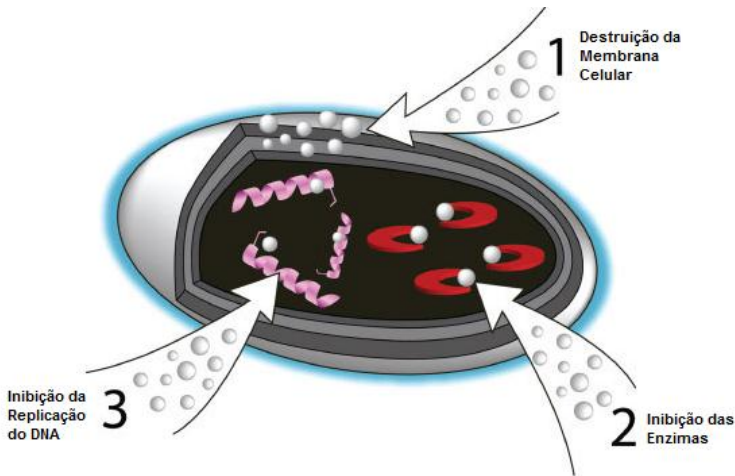


Figura 1 - Representação esquemática da atividade antimicrobiana da prata

Fonte: (MORONES, 2005).

1.2.2 Técnicas de Caracterização de Nanopartículas

1.2.2.1 Microscopia Eletrônica

A técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão foi utilizada para se avaliar o tamanho, a forma e a estrutura das nanopartículas produzidas, bem como para se observar as nanopartículas incorporadas na sílica que foi utilizada na confecção dos filtros. Esta técnica de caracterização consiste na aplicação de um feixe de elétrons através de uma amostra onde,

a recombinação dos feixes difratados e transmitidos com diferentes intensidades resulta na diferença de contraste da imagem formada (SILVA, 2012).

A preparação das amostras líquidas foi realizada depositando-se gotas da solução em um “grid”, que consiste de um filme de carbono amorfo (com 3-5 nm de espessura) sustentado em uma grade de cobre com 3 mm de diâmetro (com 300-400 mesh). A amostra fica inteiramente pronta quando o solvente é evaporado completamente (LEITE, 2003).

Para a preparação da sílica, as amostras foram previamente impregnadas em resina e curadas. A superfície de análise foi preparada com a confecção de nanocortes.

1.2.2.2 Espalhamento de luz dinâmica (DLS)

O espalhamento de luz dinâmica é utilizado para se avaliar a distribuição da população de tamanhos de partículas da emulsão coloidal de nanopartículas de prata.

Em técnicas baseadas na luz difundida, é empregado um feixe de raio laser que entra em contato com as partículas em um fluido e o resultado da luz difundida fornece os dados da distribuição dos tamanhos das partículas. O princípio empregado é de que quando uma partícula atravessa um feixe de laser, um espalhamento de luz em ângulo acontece, e este é inversamente proporcional ao seu tamanho.

Essa observação foi primeiramente realizada por Gustav Mie, através da resolução das equações de Maxwell para sistemas nanométricos, utilizando condições de contorno adequadas e supondo partículas esféricas, ele deduziu que essa dispersão é dependente do diâmetro das partículas presentes no sistema (PEREIRA, 2009; FILHO, 2008).

Esta técnica fornece detalhadamente a distribuição das populações de tamanhos das nanopartículas sintetizadas e gera histogramas dessas distribuições. O diâmetro medido com a técnica de DLS é chamado o diâmetro hidrodinâmico e refere-se ao modo como uma partícula se difunde no interior de um fluido por meio do movimento browniano (MALVERN, 2012).

1.2.2.3 Espectrometria de massa atômica de plasma acoplado indutivamente – ICP – MS

A técnica conhecida como ICP-MS foi escolhida para quantificar a concentração de prata nas amostras de água retiradas dos testes de lixiviação das sílicas tratadas com NPs_{Ag}. Dentre as técnicas de absorção atômica disponíveis, o ICP-MS foi a selecionada para estes testes devido a sua sensibilidade (SILVA, 2012).

O ICP – MS ou espectrometria de massa atômica de *plasma acoplado indutivamente*, ou por fonte de radiofrequência, é uma técnica de absorção atômica que se baseia na massa dos analitos para quantificá-los (SILVA, 2012).

É uma técnica muito utilizada por oferecer as maiores vantagens em termos de sensibilidade e menor efeito de interferências, com relação a outras técnicas de absorção atômica (SKOOG, 2006).

1.2.2.4 Espectroscopia de UV-Vis

É possível fazer o monitoramento das nanopartículas de prata através dos espectros de *UV-Vis*. O alargamento e o deslocamento das bandas determinam a qualidade de distribuição dos tamanhos das nanopartículas e pode determinar também a estabilidade.

A espectroscopia de absorção UV-Vis está baseada na medida da transmitância (T) ou absorbância (A) de soluções contidas em células transparentes tendo um caminho óptico de b cm. Para a maioria dos casos, a concentração de uma analito está relacionada linearmente à absorbância de acordo com a Lei de Beer.

No entanto quando se trata de dispersões coloidais, como no caso das nanopartículas de prata, a *lei de Beer* pode ser aplicada com restrições se utilizando do máximo da banda de *plasmon ressonante* nas regiões do ultravioleta, visível e infravermelho próximo, dependendo da emulsão gerada (SEGALA, 2009 apud SILVA, 2012).

1.2.3 Matrizes para impregnação de nanopartículas de prata

As nanopartículas de prata estão em evidência no presente cenário. Diversos estudos verificam sua impregnação em matrizes tanto inorgânicas quanto poliméricas (SILVA, 2012).

O uso de materiais inorgânicos ou poliméricos como bactericidas supera o uso de materiais orgânicos por estes apresentarem melhor resposta frente ao calor, durabilidade, seletividade, toxicidade entre outras características (KIN, 2007 apud SILVA, 2012).

Dentre as matrizes mais estudadas estão a sílica (inorgânica) e em menor proporção o EVA (etileno vinil acetato).

1.2.3.1 Sílica

O termo sílica refere-se aos compostos de dióxido de silício, SiO_2 , nas suas várias formas incluindo sílicas cristalinas; sílicas vítreas e sílicas amorfas. O dióxido de silício, SiO_2 , é o composto binário de oxigênio e silício mais comum, sendo inclusive composto dos dois elementos mais abundantes na crosta da Terra. A sílica e seus compostos constituem cerca de 60% em peso de toda a crosta terrestre (SILVA, 2012).

A sílica, pelas características químicas de sua superfície e durabilidade têm sido um dos materiais com grande expectativa de uso como suportes inorgânicos.

Possui entre outras vantagens, estreita distribuição de tamanho das partículas, a composição de sua superfície por grupos silanol e as extensões das ligações de hidrogênio facilitam a modificação da superfície por tratamento térmico. Os grupos silanol podem formar ligações covalentes e as interações isotrópicas em solução podem ajudar na formação de arranjos ordenados com o substrato (POL, 2002).

1.2.3.2 EVA

O EVA, copolímero de etileno-acetato de vinila é produzido por polimerização a altas pressões e em condições de síntese análogas a dos homopolímeros polietileno de baixa densidade (PEBD). As propriedades das resinas obtidas nesse processo

possuem desde características similares ao PEBD até as da borracha sintética (OLIVEIRA; SOARES, 2002).

A estrutura é modificada com a adição de acetato de vinila formando assim um material mais flexível. Essa modificação faz com que o EVA fique mais polar e mais cristalino. Quanto maior for a quantidade de acetato de vinila, maior será a cristalinidade do material (OLIVEIRA; SOARES, 2002)

Dentre as principais características apresentadas pelos copolímeros de etileno-acetato de vinila (EVA), as principais são (OLIVEIRA; SOARES, 2002):

- Apresentam excelente flexibilidade e tenacidade, sendo assim, as propriedades mecânicas mantêm-se mesmo quando estiverem sob temperaturas baixas.
- Os copolímeros de etileno-acetato de vinila apresentam boa elasticidade, em alguns casos é semelhante à elasticidade dos elastômeros.
- Esses materiais apresentam resistência às quebras sob tensões ambientais muito superiores às apresentadas por outros materiais poliméricos e copolímeros.
- São atóxicos, em função dessa característica, são muito utilizados em brinquedos e artigos para crianças.

1.3 REFERÊNCIAS

ALENCAR, Maria Simone de Menezes. **Estudo de futuro através da aplicação de técnicas de prospecção tecnológica:** o caso da nanotecnologia. 2008. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

AMSON, Gisele Van; HARACEMIV, Sônia Maria Chaves; MASSON, Maria Lucia. Levantamento de dados epidemiológicos relativos a ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná Brasil, no período de

1978 a 2000. In: **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, nov./dez., 2006.

ANA – AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS. **Águas Subterrâneas**. Brasília: 2002. Disponível em: <<http://www.ana.gov.br/gestaoRecHidricos/InfoHidrologicas/aguasSubterr/EstudoAguasSubterraneasANA22-08-02.doc>>. Acesso em: 15 ago. 2012.

ANDRADE, N. J.; MACEDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1996. p. 182.

BLANCO-HERNÁNDEZ, A. L.; ALONSO-GUTIERREZ, D.; JIMENEZ de BLAS, O. Estudio de los niveles de plomo, cadmio, cinc y arsénico em aguas de la provincia de Salamanca. In: **Española de Salud Publica**, v. 72, n. 1,p. 53-65, 1998.

BORGUETTI, N. R. B.; BORGUETTI, J. R.; FILHO, E. F. R. **O Aquífero Guarani**. Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais (GIA). Disponível em: <http://www.abas.org.br/index.php?PG=aguas_subterraneas&SPG=aguas_subterraneas_as#1>. Acesso em: 12 jul. 2006.

BRASIL. **Água**: dados revelam maior contaminação dentro das casas. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/161009.htm>>. Acesso em: 11 nov. 2010.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. **Resolução Conama nº 20 de 18 de junho de 1986** - Estabelece a classificação das águas doces, salobras e salinas do território nacional. Brasília, 1986.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. **Resolução Conama nº 357**, de 17 de março de 2005 - Estabelece a classificação das águas doces, salobras e salinas do território nacional, em substituição a Resolução CONAMA 020, de 1986. Brasília, 2005.

BRASIL. Lei nº. 9.984 de 17 de julho de 2000. Dispõe sobre a criação da Agência nacional de Águas – ANA. In: **Diário Oficial da União**, 18 de julho de 2000, Brasília, DF, p. 14-19.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518 de 25 de março de 2004 - Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. In: **Diário Oficial da União**, 26 de março de 2004, Brasília, DF, p. 9-15.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº. 1469. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano, e dá outras providências. In: **Diário Oficial da União**, 18 de julho de 2000, Brasília, DF, p. 14-19.

BRASIL. Portaria Funasa nº 177 de 21 de março de 2011 - Estabelece as diretrizes, competências e atribuições do programa nacional de apoio ao controle da qualidade da água para consumo humano. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 mar. 2011.

BRASIL. Portaria MS nº 1469, de 29 dez. 2000. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 fev. 2001. Seção 1.

BRASIL. Portaria nº 36, de 19 de janeiro de 1990. Aprova normas e o padrão de potabilidade da água para consumo humano em todo o território nacional. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 23. jan. 1990, Seção I, p. 1651-1654.

BRASIL. **Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011.** Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília, 2011.

BRISCOE, J. Evaluating water supply and other programs: short-run vs long-run mortality effects. In: **Public Health**, v. 99, n. 3, p. 142-145, 1985.

CASTRO, Viviane Guimarães de. **Utilização da água na indústria de alimentos**. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) - Universidade Castelo Branco, São Paulo, 2006.

CHANG, R. **Química geral: conceitos essenciais**. 4. ed. São Paulo: McGraw Hill, 2006.

CHEN, X., SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. In: **Toxicology Letters**, v. 176, n. 1, p. 1-12, 2008.

CHOHAN ZH, SUPURAN CT, SCOZZAFAVA A. Metalloantibiotics: synthesis and antibacterial activity of cobalt(II), copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes of kefzol. In: **J Enzyme Inhib Med Chem**, v. 19, p. 79-84, 2004.

D'ÁGUILA, P. S.; ROQUE, O. C. C.; MIRANDA, C. A. S.; FERREIRA, A. P. Avaliação da qualidade da água para abastecimento público do município de Nova Iguaçu. In: **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, n. 3, p. 791-798, 2000.

DAMM, C.; MÜNSTEDT, H.; RÖSCH, A. The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nano and microcomposites. In: **Materials Chemistry and Physics**, v. 108, n. 1, p. 61-66, 2008.

DIMITROV, P. Chegamos a 2000 d. C., e a saúde para onde vai? In: **O mundo da Saúde**, v. 24, n. 1, p. 19-30, 2000.

DROSTE R. L. **Theory and practice of water and wastewater treatment**. New York: Wiley, 1997.

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

FENG, Q. L.; WU, J.; CHEN, G. Q.; CUI, F. Z.; KIM, T. N.; KIM, J. O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. In: **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, p. 662-668, 2000.

FIGUEIREDO, R. M. Programa de Redução de Patógenos e Padrões e Procedimentos Operacionais de Sanitização. In: **Coleção Higiene dos Alimentos**, v. 1. São Paulo: Manole, 2002. p. 73-78.

FILHO, J. C. S. **Uma geometria alternativa para detecção do espalhamento de luz laser por partículas e micro- rugosidades em superfície de silício**. 2008. Tese (Doutorado). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. 2008.

FREITAS, M. B. BRILHANTE, O. M.; ALMEIDA, L. M. Importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do Estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. In: **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 3, p. 651-660, 2001.

GAJBHIYE, M.; KESHARWANI, J.; GADE, A.; RAI, M. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. In: **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 5, n. 4, p 382-386, 2009.

HELLER, L. **Saneamento e saúde**. Brasília, p. 97. 1997.

HURLEY, T.; SADIQ, R.; MAZUMDER, A. Adaptation and evaluation of the canadian council of ministers of the environment water quality index (CCME WQI) for use as an effective tool to characterize drinking source water qualitys. In: **Water Research**, v. 46, n. 11, p. 3544-3552, jul. 2012.

IM, H. J.; YANG, Y.; ALLAIN, L. R.; BARNES, C. E.; DAI, S.; XUE, Z. Environ. In: **Sci. Technol.**, n. 34, p. 2209, 2000.

KIM, J. S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. In: **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, p. 95-101, 2007.

KRAUSE, G. A. **US Patent n.º. 2046467**, 1936.

LE PAPE, H.; SOLANO-SERENA, F.; CONTINI, P.; DEVILLERS, C.; MAFTAH, A.; LEPRAT, P. Involvement of reactive oxygen species in the bactericidal activity of activated carbon fibre supporting silver Bactericidal activity of ACF(Ag) mediated by ROS. In: **Journal of Inorganic Biochemistry**, n. 98, p.1054-1060, 2004.

LE PAPE, H.; SOLANO-SERENA, F.; CONTINI, P.; DEVILLERS, C.; MAFTAH, A.; LEPRAT, P. Evaluation of the anti-microbial properties of an activated carbon fibre supporting silver using a dynamic method. In: **Carbon**, v. 40, n. 15, p. 2947-2954, 2002.

LEITE, M. O.; ANDRADE, N. J.; SOUZA, M. R.; FONSECA, L. M.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; PENNA, C. F. A. M. Controle de qualidade da água em indústrias de alimentos. In: **Revista Leite e Derivados**, n. 69, mar./abr., 2003. Disponível em: <http://www.dipemar.com.br/leite/69/materia_atecnico_leite.htm>. Acesso em: 15 ago. 2006.

MALVERN - **Dynamic Light Scattering** (DLS).Disponível em: <http://www.malvern.com/labeng/technology/dynamic_light_scattering/dynamic_light_scattering.htm> Acesso em: 19 jun. 2012.

MENDONÇA, Mireli Venâncio. **Preparação, caracterização e estudos biológicos das nanopartículas de prata *in vitro* nas bactérias pneumônicas**. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Fisioterapia) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, Criciúma 2009.

MORONES, J. R, et al. The Bactericidal Effect of silver Nanoparticles. In: **Nanotechnology**, v. 16, p. 2346-2353, 2005.

MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMÍREZ, J. T.; YACAMAN, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. In: **Nanotechnology**, n. 16, p. 2346-2353, 2005.

OLIVEIRA, Marcio G; SOARES, Bluma G. Uso de EVA modificado com Grupos Mercaptanama - compatibilização de misturas NBR/EPDM. In: **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 12, n. 4, p. 301-310, 2002.

OLIVEIRA, R. M.; VALLA, V. V. As condições e as experiências de vida de grupos populares no Rio de Janeiro: repensando a mobilização popular no controle da dengue. In: **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, p. 77-88, 2001.

OMS (Organização Mundial Da Saúde). **Precariedade das condições sanitárias brasileiras**. Disponível em: <<http://www.who.com/brazil>>. Acesso em: 11 dez. 2010.

ONU (Organização das Nações Unidas). **Ações conjuntas do sistema das Nações Unidas no Brasil**. Disponível em: <<http://www.onu-brasil.org.br.org>>. Acesso em: 11 dez. 2010.

ORTIZ-IBARRA, H.; CASILLAS, N.; SOTO, V.; BARCENA-SOTO, M.; TORRES-VITELA, R.; DE LA CRUZ, W.; SERGIO GÓMEZ-SALAZAR, S. Surface characterization of electrodeposited silver on activated carbon for bactericidal purposes. In: **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 314, n. 2, p. 562-571, 2007.

OYANEDEL-CRAVERAND, V. A.; SMITH, J. A. Sustainable Colloidal-Silver-Impregnated Ceramic Filter for Point-of-Use Water Treatment, Environ. In: **Sci. Technol**, v. 42, n. 3, p. 927-933, 2008.

PANÁČEK, A.; KVITEK, L.; PRUCEK, R.; KOLAR, M.; VECEROVA, R.; PIZUROVA, N. et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. In: **Journal of Physical Chemistry B.**, v. 110, p. 16248 - 16253, 2006.

PEREIRA, M. K. **Ressonância de plasmon de superfície localizado e espalhamento Raman em soluções coloidais de ouro**. 2009. Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

POL, V. G. et al. Sonochemical Deposition of Silver Nanoparticles on Silica Spheres. In: **Langmuir**, v. 18, p. 3352-3357, 2002.

POTTERS FOR PEACE. Disponível em: <<http://s189535770.onlinehome.us/pottersforpeace/>>. Acesso em: 11 nov. 2010.

PRADEEP, T.; ANSHUP. Nobel metal nanoparticles for water purification: a critical review. In: **Thin Solid Films**, v. 517, n. 24, p. 6441-6478, 30 out. 2009.

QUINA, F. H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos, In: **Química Nova**, v. 27, n. 6, p.1028-1029, 2004.

RENN, C. E. **US Patent n°. 3268444**. 1996.

REYMAO, A. E.; SABER, B. A. Acesso à água tratada e insuficiência de renda: duas dimensões do problema da pobreza no nordeste brasileiro sob a ótica dos objetivos de desenvolvimento do milênio. In: **VII Encontro da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica**, 2007.

RUTKOW, I. M. **The History of Surgery in the United States 1775-1900**. New York: Jeremy Norman Co., 1998

SEGALA, K. **Síntese e caracterização de nanocompósitos funcionais**. 2009. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

SILVA, Franciele Joelma da. **Estudo da impregnação de nanopartículas de prata em sílica para uso como elemento filtrante em sistemas de purificação de água para depuração de ostras**. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Estágio Supervisionado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

TATA GROUP. Disponível em: <<http://www.tata.com>>. Acesso em: 11 nov. 2012.

TUNDISI, J. G. Recursos Hídricos. In: **Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da Unicamp**, São Carlos, out. 2003.

Disponível em: <<http://www.multciencia.unicamp.br/art03.htm>>. Acesso em: 21 jul. 2006.

UNIÃO EUROPÉIA. Diretiva do Parlamento Europeu e do Conselho n.º 98/83/CE de 3 de novembro de 1998. Relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano. In: **Jornal Oficial das Comunidades Européias**, União Européia, p. 35-38, 1998.

UNICEF. **Cerca de 20 mil crianças morrem por ano em consequência da falta de saneamento**. Disponível em: <<http://www.unicef.org/brazil/pt/UNI02.pdf>>. Acesso em: 02 nov. 2010.

ZANCUL, M. de S. Água e saúde. In: **Revista Eletrônica de Ciências**, n. 32., 2006. Disponível em: http://cdcc.usp.br/ciencia/artigos/art_32/atualidades.html. Acesso em: 11 dez. 2010.

**CAPÍTULO 2 - SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E
IMPREGNAÇÃO EM SÍLICA E PELLETS DE ETILENO
ACETATO DE VINILA (EVA)**

2.1 INTRODUÇÃO

Materiais com nanopartículas de prata incorporados em sua superfície têm atraído a atenção pela gama de aplicações que este tipo de funcionalização oferece. O uso de materiais inorgânicos ou poliméricos como bactericidas supera o uso de materiais orgânicos por estes apresentarem melhor resposta frente ao calor, durabilidade, seletividade, toxicidade entre outras características. (KIM, 2007; SILVA, 2012).

A sílica, pelas características químicas de sua superfície e durabilidade têm sido um dos materiais com grande expectativa de uso como suportes inorgânicos. Possui entre outras vantagens, estreita distribuição de tamanho das partículas, a composição de sua superfície por grupos silanol e as extensões das ligações de hidrogênio facilitam a modificação da superfície por tratamento térmico. Os grupos silanol podem formar ligações covalentes e as interações isotrópicas em solução podem ajudar na formação de arranjos ordenados com o substrato (POL, 2002, apud SILVA, 2012).

Já o copolímero de etileno-acetato de vinila (EVA) produzido por polimerização a altas pressões também tem sido utilizado como matriz polimérica na impregnação de nanopartículas e prata. Diferentes concentrações estão sendo testadas e sua atividade antimicrobiana como matriz das nanopartículas de prata está tendo bons resultados (OLIVEIRA; SOARES, 2002)

Para o entendimento e caracterização de nanomateriais as mais variadas técnicas têm sido criadas e utilizadas, cada uma apresentando suas peculiaridades. Entre as técnicas de maior destaque hoje são as espectroscopias (Raman, SERS, UV-Vis) e as microscopias (STM, AFM, TEM, MEV etc.), além de medidas de potencial Zeta, além de tamanho de partículas através de espalhamento dinâmico de luz (DLS) (SILVA, 2012).

No entanto de nada adianta a síntese de nanopartículas se não for possível verificar sua atividade antimicrobiana. Para tanto diversas técnicas de análises microbiológicas estão sendo validadas para tal utilização. Neste capítulo será abordada a técnica de análise microbiológica do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003).

O presente trabalho tem como objetivo principal a impregnação de nanopartículas de prata em suporte inorgânico (sílica) e EVA (etileno vinil acetato).

São os objetivos específicos deste estudo:

- Avaliar a síntese e impregnação das nanopartículas em sílica.
- Verificar a estabilidade e lixiviação da prata após a impregnação das nanopartículas em sílica.
- Uso de Espectrometria de Massa Atômica (ICP-MS) para avaliar a qualidade da adsorção através de testes de lixiviação de prata.
- Impregnação das nanopartículas com sílica em suporte polimérico (EVA).
- Caracterização das nanopartículas de prata por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Espectrofotometria de UV-Visível.

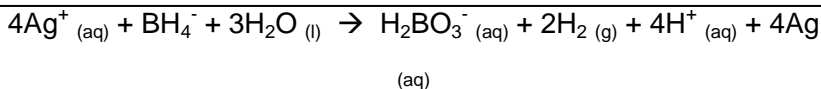
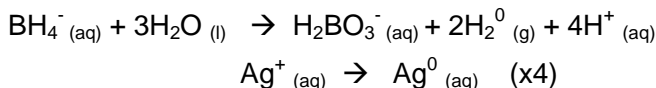
2.2 MATERIAL E MÉTODOS

A síntese de nanopartículas foi realizada pela empresa TechNano Solution (TNS) em parceria com o Laboratório de Síntese Inorgânica e Nanocompósitos (LabSin). A seguir uma breve descrição dos procedimentos de síntese e caracterização.

2.2.1 Síntese de nanopartículas de prata

A preparação das nanopartículas de prata foi feita por meio da adição lenta de um agente redutor, nesse caso o NaBH_4 , à solução de um sal de prata com um estabilizante. A reação foi processada sob temperatura de 5°C e agitação de 200RPM.

O sal que foi utilizado nesse caso é o AgNO_3 e o estabilizante um aminosilano (encapsulante α). A redução da prata pelo borohidreto de sódio ocorre segundo a reação descrita por SEGALA (2009) apresentada abaixo:



2.2.2 Impregnação das nanopartículas de prata em sílica

Devido a sua estrutura e da reatividade que a sílica oferece frente a variados grupos funcionais, a sílica gel é o suporte adequado e portanto escolhido para ancoragem das NPs_{Ag}. (SILVA, 2012).

A sílica-gel é constituída de grupos siloxanos (Si-O-Si) em seu interior, e de grupos silanois (Si-OH) em sua superfície (Figura 13). A reatividade química da superfície da sílica é determinada principalmente pelos grupos hidroxilas (silanois), os quais são fracamente ácidos com $\text{p}k_a \sim 7$. Além destes, verifica-se também a presença de grupos siloxanos na superfície da sílica. (PEREIRA, 2009; SILVA, 2012). Além destes, verifica-se também a presença de grupos siloxanos na superfície da sílica.

A impregnação de nanopartículas em sílica foi realizada pela empresa TNS e se mantém em sigilo de patente.

2.2.3 Impregnação das nanopartículas de prata em pellets de EVA.

A impregnação de nanopartículas nos pellets de EVA foi realizada também pela empresa TNS e se mantém em sigilo de patente.

2.2.4 Estabilidade das Nanopartículas

Silva (2012) realizou um levantamento de normas técnicas nacionais e internacionais de lixiviação em que se identificaram duas normas aplicadas a situações de lixiviação muito semelhantes às que ocorrem no presente trabalho: a norma ABNT NBR 10005:2004 e a norma *EPA Methods*: método 1312. Como as duas normas utilizam os mesmos parâmetros de

avaliação, optou-se por utilizar a ABNT NBR 10005:2004 por se tratar de uma norma brasileira.

No estudo conduzido pela norma ABNT NBR 10005:2004, as amostras sólidas a serem determinadas devem estar numa proporção 20 vezes menor que o líquido extrator. Segundo a norma esse líquido extrator trata-se de soluções ácidas, dependendo do tipo de amostra, porém por se tratar de nanopartículas de prata essas soluções não puderam ser utilizadas, apenas água ultrapura foi utilizado como líquido extrator.

Esta análise foi realizada pelo Laboratório de Espectrometria de Massa/UFSC e a seguir observa-se o protocolo utilizado.

Foram utilizadas duas amostras de pellets de 2,5 g cada, todas impregnadas com NPsAg, para cada frasco de 50 mL. O uso de duas amostras foi para garantir a reprodutibilidade do teste. Duas amostras de 2,5 g de pellets sem nanopartículas (branco) também foram utilizadas como referência. As amostras foram deixadas no agitador rotatório por 20 horas sob agitação de 30 ± 2 RPM. Após esse período, as amostras foram filtradas a vácuo e as partes líquidas das mesmas, assim como as retiradas do método alternativo, foram submetidas a análises de ICP-MS para se quantificar a prata lixiviada das amostras de sílica.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As NPsAg em fase aquosa foram preparadas por redução química à 600 RPM. O espectro de UV-Vis da reação (Figura 2) forneceu uma banda com $\lambda_{\text{médio}} = 429,42$ nm e $\lambda_{\text{máximo}} = 404,04$ nm com absorvância de 0,798. O FWHM do pico foi de 64,228 nm, um pico levemente simétrico, o que indica nanopartículas com superfícies irregulares e numa faixa de tamanho próxima.

Essa morfologia e o tamanho das NPsAg sugeridas pela Espectroscopia de UV-Vis pode ser comparada com o histograma de distribuição dos tamanhos das partículas, Figura 3. E as micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão- MET, Figura 4.

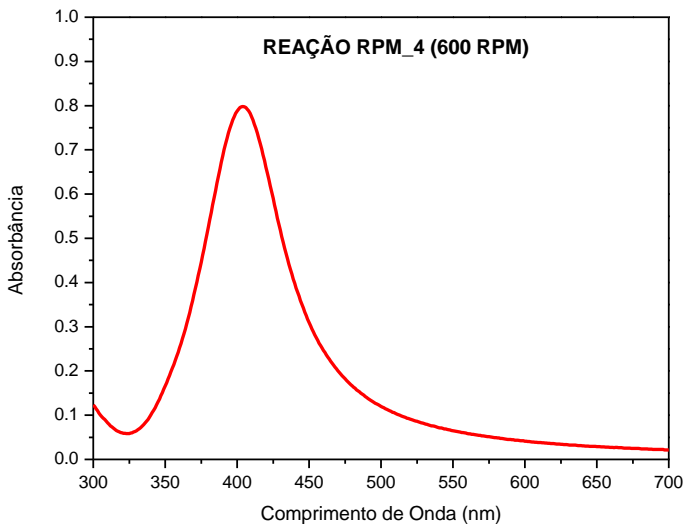


Figura 2 - Espectro de UV-Vis da reação conduzida com 600 RPM
Fonte: Dados primários, 2012.

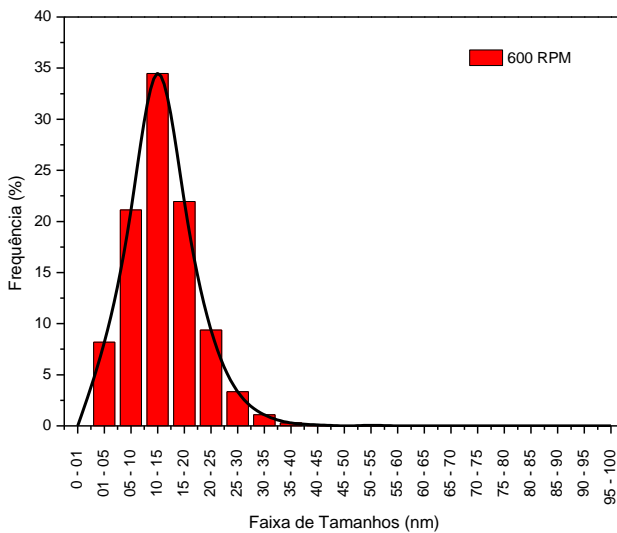


Figura 3 - Distribuição dos tamanhos das nanopartículas obtidas na reação conduzida com 600 RPM
Fonte: Dados primários, 2012.

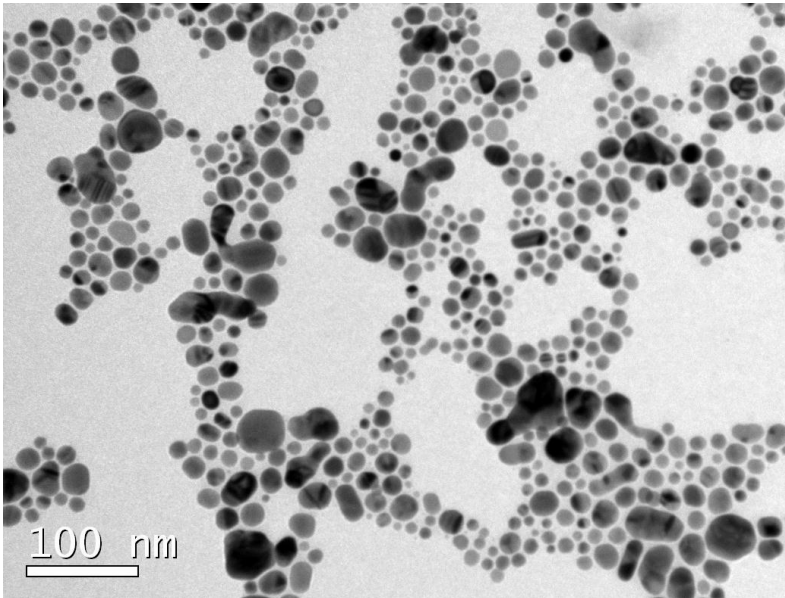


Figura 4 - Imagem de MET das nanopartículas obtidas na reação conduzida com 600 RPM (magnificação de 300.000)
Fonte: Dados primários, 2012.

É possível observar no histograma nanopartículas com faixa de distribuição de tamanho variando em torno de 01-40 nm. O mesmo foi obtido de uma contagem de 4665 partículas, que apresentaram diâmetro médio de 13,48 nm, com um desvio padrão de 6,45 nm e polidispersidade de 0,48.

A micrografia mostra nanopartículas menores apresentando formas geométricas mais esféricas do que os grandes aglomerados, que notoriamente foram gerados a partir de partículas menores que coalesceram e fundiram, gerando essas formas geométricas diferenciadas e de maior tamanho. Essa aglomeração é uma tendência natural das nanopartículas para reduzir a alta energia livre de superfície.

Já a adsorção das NPsAg na superfície da sílica possivelmente resulta de uma forte interação covalente entre o sólido adsorvente rico em grupos silanois e os grupos funcionais silanos do estabilizante das NPsAg. Interações semelhantes com essas NPsAg estabilizadas com aminosilanos foram

comprovadas em outros materiais, por exemplo, celulose. Outras interações como atração eletrostática, ligação de hidrogênio, entre outras, podem também estar paralelamente contribuindo para esta adsorção (MEYERS, 2000 apud SILVA, 2012).

O aspecto da superfície da sílica foi analisado por MET, Figura 5, onde é possível observar que a superfície não é lisa, e sim porosa e/ou rugosa, o que pode facilitar a adsorção das nanopartículas.

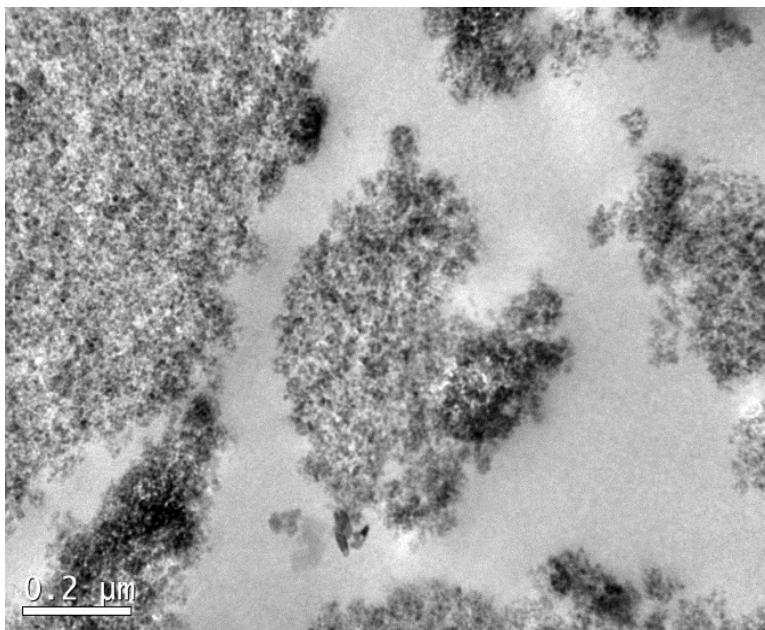
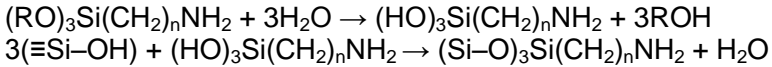


Figura 5 - Microscopia eletrônica de transmissão da sílica pura
Fonte: Dados primários, 2012

Quang *et al.* em seu trabalho reportam a interação entre os grupos silanois da superfície da sílica e os grupos silanos de um aminosilano. De acordo com esse trabalho, a interação dos grupos silanos no estabilizante e os grupos silanois na superfície da sílica acontece por meio da seguinte reação genérica (ABNT, 2005 apud SILVA 2012):



A adsorção das NPsAg em sílica foi também avaliada por MET (Figura 6). De acordo com esta micrografia é possível observar a presença de uma pequena quantidade de nanopartículas de prata em volta da sílica. Qualitativamente também é possível observar a adsorção pela mudança visual na coloração do pó de sílica, que vai do branco quando a sílica esta pura a um pó bem amarelo após a impregnação.

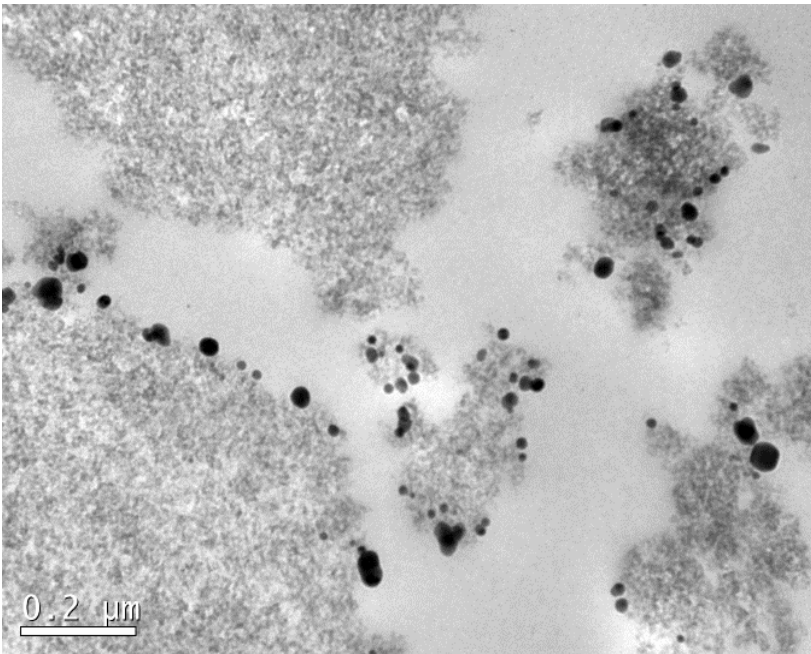


Figura 6 - Microscopia eletrônica de transmissão da sílica impregnada com as nanopartículas de prata (80 ml de solução de nanopartículas para cada grama de sílica).

Fonte: Dados primários, 2012

Em relação a estabilidade das nanopartículas, após o teste de lixiviação dos pellets de EVA, conforme a norma ABNT NBR 10005:2004, as amostras – em triplicata – foram submetidas a

análise de ICP-MS no Laboratório de Espectrometria de Massa/UFSC e os resultados de cada alíquota são apresentados na Tabela 6, sendo que esses valores são correspondentes as médias dos valores obtidos para todas as amostras.

Tabela 2 - Concentração média de Ag nas amostras de água utilizadas no teste de lixiviação baseada na norma, obtidas por análise de ICP-MS.

Amostras	Concentração Média de Ag ($\mu\text{g/L}$)
<i>A</i>	32,57
<i>B</i>	31,82
<i>Branco</i>	0,07

Fonte: Dados primários, 2012

Conforme a tabela uma quantidade bem acima do recomendado de prata foi lixiviada dos pellets. A concentração máxima permitida pelo CONAMA, segundo a Resolução n^o357 de 2005 é de 10 $\mu\text{g/L}$. Os resultados obtidos foram maiores que o estabelecido pela legislação, mostrando a necessidade de ajuste na concentração de prata no substrato.

2.4 CONCLUSÕES

As conclusões a que se pode chegar a partir do que obtemos são as seguintes:

- A sílica mostrou-se excelente matriz para impregnação das NPsAg.
- O EVA também mostrou estabilidade frente a incorporação com a sílica nanoparticulada.
- Os métodos de caracterização mostram a formação das nanopartículas uniformes e de qualidade.
- A metodologia utilizada para caracterização das nanopartículas foi eficaz

- para avaliar também a qualidade da matriz.
- O teste de lixiviação mostrou a necessidade de ajuste na concentração de prata no substrato.

2.5 REFERÊNCIAS

ASTM E 2149 – 01. **Standard test method for determining the antimicrobial activity of immobilized antimicrobial agents under dynamic contact conditions.** 2001.

BRASIL. ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 10005** - Procedimento para obtenção de extrato lixiviado de resíduos sólidos, Rio de Janeiro, 2004.

BRASIL. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão:** norma aprovada – oitava edição. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas_public_disco_difusao.pdf>. Acesso em: 11 dez. 2012.

BRASIL. CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 20.** Padrões de água. 1986.

BRASIL. CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 357.** Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. 2005.

BRYASKOVA, R.; PENCHEVA, D.; KYULAVSKA, M.; BOZUKOVA, D.; DEBUIGNE, A.; DETREMBLEUR, C. Antibacterial activity of poly(vinyl alcohol)-b-poly (acrylonitrile) based micelles loaded with silver nanoparticles
In: **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 344, p. 424–428, 2010.

KIM, J. S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. In: **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, p.95-101, 2007.

MEYERS, D. Surface, interfaces and colloids principles and applications. In: **Talanta**, v. 51, New York, 2000.

MORONES, J. R, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. In: **Nanotechnology**, v. 16, p. 2346-2353, 2005.

POL, V. G. et al. Sonochemical deposition of silver nanoparticles on silica spheres. In: **Langmuir**, v. 18, p. 3352-3357, 2002.

QUANG, D. V. et al. Preparation of amino functionalized silica micro beads by dry method for supporting silver nanoparticles with antibacterial properties. In: **Colloids and Surfaces A: Physico chemical and Engineering Aspects**, v. 389, p. 118-126, 2011.

SEGALA, K. **Síntese e caracterização de nanocompósitos funcionais**. 2009. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

SILVA, Franciele Joelma da. **Estudo da impregnação de nano partículas de prata em sílica para uso como elemento filtrante em sistemas de purificação de água para depuração de ostras**. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Estágio Supervisionado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

**CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA
IMPREGNADAS EM SÍLICA E EVA**

3.1 INTRODUÇÃO

As nanopartículas de prata passam a desempenhar um importante papel nas aplicações relacionadas a desinfecções, por seu baixo custo, eficácia, durabilidade e liberação controlada de íons prata com especial atenção focada na solução do problema de purificação de água. Ao longo das últimas décadas, várias pesquisas foram realizadas com a utilização de íons metálicos na desinfecção de água (FENG, 2000; CHOHAN, 2004).

As nanopartículas podem ser incorporadas em diferentes matrizes, tanto inorgânicas quanto poliméricas. Neste capítulo observa-se a impregnação em sílica (matriz inorgânica) e esta sílica nanoparticulada em EVA (matriz polimérica). Ambos possuem vantagens na impregnação das nanopartículas e estão sendo amplamente estudados (SILVA, 2012; OLIVEIRA, 2007; CASTRO, 2006).

A atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata tem sido avaliada em diferentes aspectos para desinfecção da água. Estudos têm avaliado a atividade frente a água ultrapura, águas subterrâneas (água de poço artesiano), esta última com muita matéria inorgânica; como também em águas utilizadas em processos na indústria de alimentos, que possuem alta quantidade de matéria orgânica.

O presente trabalho tem como objetivo principal avaliar a atividade antimicrobiana de pellets de EVA em água conforme a norma ASTM E-2149.

Os objetivos específicos são:

- Avaliar a atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata por metodologia de contato: água ultrapura, água subterrânea (de poço artesiano) e água de processo industrial;
- Avaliar a atividade antimicrobiana por modelo de filtro para desinfecção de água: água artificialmente contaminada;
- Realizar análises microbiológicas e físico-químicas das amostras utilizadas segundo a ASTM, 2001, BAM/FDA, 2001 e APHA 2005;
- Verificar a lixiviação de prata por ICP-MS;

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Amostras

Foram utilizadas amostras de água ultrapura (artificialmente contaminada em laboratório), subterrânea (poço artesiano) e de processo da indústria de alimentos. Sua origem e coleta é descrita abaixo:

- Água ultrapura: A amostra de água ultrapura foi cedida pelo Laboratório de Controle de Processos (LCP), do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Foi coletada em frasco estéril, de forma asséptica, seguindo as boas práticas de laboratório e mantendo a esterilidade da amostra.

- Água subterrânea (poço artesiano): A amostra de água de poço foi cedida voluntariamente para análise. Foi coletada em poço artesiano doméstico, em uma residência na cidade Balneário Camboriú, SC/Brasil. Foi coletada em frasco estéril, de forma asséptica, seguindo as boas práticas de laboratório e mantendo a esterilidade da amostra. Foi transportada até o laboratório na cidade de Florianópolis por via terrestre, em caixa isotérmica e nas mesmas condições de assepsia.

Água de processo da indústria de alimentos: A amostra de água de processo foi cedida voluntariamente para análise pela indústria de laticínios Do Vale S/A, situada na cidade de Palhoça/SC. A água foi coletada de um equipamento envolvido na produção da manteiga. Esta água é descartada do processo de fabricação. A amostra foi coletada em frasco estéril, de forma asséptica, seguindo as boas práticas de laboratório e mantendo a esterilidade da amostra. Foi transportada até o laboratório na cidade de Florianópolis por via terrestre nas mesmas condições de assepsia.

3.2.2 Avaliação da atividade antimicrobiana de pellets com NPsAg por metodologia de contato dinâmico

3.3.2.1 Preparo dos meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram preparados acrescentando água em uma base em pó desidratada. Imediatamente após a esterilização a 121°C por 15 minutos, o meio foi resfriado em banho-maria entre 45 °C e 50°C. Os meios de cultura utilizados e sua forma de utilização foram:

- i) PCA (Himedia®)- Foram distribuídos em torno de 25 mL a 30 mL de ágar em placas de petri, para garantir uma profundidade uniforme de aproximadamente 4 mm (FERNANDES, 2010).
- ii) PEP (Himedia®)- Foram distribuídos com pipetador automático 9 mL em tubos de ensaio para realizar a diluição das amostras.
- iii) PEP (Himedia®) com Tween e lecitina de soja – Sua preparação foi baseada na *Japanese Industrial Standard Test for antimicrobial and efficacy* (JIS, 2007). O tween utilizado foi o tween 80, já a lecitina de soja foi adquirida em uma farmácia de manipulação. Foi preparado o PEP de acordo com o procedimento padrão de preparo de meios, pesado 3 gramas de lecitina de soja e 7g de tween 80 e incorporado ao meio antes de autoclavar. Foram distribuídos com pipetador automático 9 mL em tubos de ensaio para a realizar a diluição das amostras. Esse meio é utilizado para inibir a ação da prata durante a multiplicação nas placas de cultivo. Outra alternativa é a utilização do meio de cultura Agar Trípico de Soja (TSA), que contém cloreto de sódio em sua composição inibindo assim a ação da prata.
- iv) CN (Himedia®) – Foram distribuídos com pipetador automático 5 mL em tubos de ensaio para repicar as cepas de micro-organismos.

3.2.2.2 Preparo do inóculo

As bactérias *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli* e *E. faecalis* foram ativadas por duas vezes consecutivas em Caldo Nutriente (CN) (Himedia®) e incubadas a 37°C por 18h a 24h. Para obter colônias isoladas, foram feitas estrias em placas de Petri contendo Ágar-Padrão para Contagem (PCA) (Himedia®) e incubadas na mesma temperatura por 18h a 24h (FERNANDES, 2010).

O inóculo foi preparado fazendo-se suspensão direta em solução salina 0,85%*m/v*, das colônias selecionadas da placa de PCA após 18h a 24h de incubação. A suspensão foi ajustada para que sua turbidez coincidissem com a da solução de McFarland 0,5, o que resultou em uma suspensão contendo, aproximadamente de $1,5 \times 10^5$ UFC/mL a $3,0 \times 10^8$ UFC/mL (FERNANDES, 2010).

3.2.2.3 Análise microbiológica

As análises microbiológicas foram realizadas no Núcleo e Microbiologia de Alimentos – NUMICAL, UFSC

Antes da utilização da metodologia para verificação da atividade antimicrobiana dos pellets (ASTM E-2149) foi realizada análise microbiológica padrão de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2011) nas amostras de água utilizadas, para verificar sua qualidade e qual a sua contagem em UFC/mL inicial. Foram realizadas análise de coliformes totais, *E.coli* e bactérias heterotróficas. Os coliformes foram analisados pela técnica dos tubos múltiplos, já as heterotróficas pela contagem em profundidade dos mesófilos em ágar PCA (APHA, 2005; BAM/FDA, 2001).

A atividade antimicrobiana dos pellets impregnados com sílica e nanopartículas de prata (pellets com AgNp) foi avaliada conforme a metodologia do *Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions* descrita pela *ASTM International* (ASTM E-2149, 2001).

Para água ultrapura foi seguida a metodologia sem alterações. Para água subterrânea a de processo industrial, como já possuem contaminantes naturais foi realizada adaptação

da metodologia já descrita. Foi considerada a carga microbiana natural presente nas amostras e como controles positivos foram utilizados inóculos de *E.coli* e *E.faecalis* de Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente.

Para a realização dos ensaios conforme a norma ASTM E-2149, três diferentes amostras foram utilizadas: 1g ($\pm 0,2$) de pellets com NPsAg; 1g ($\pm 0,2$) de pellets sem tratamento com nanopartículas de prata (branco) e 50 mL de inóculo do micro-organismo em avaliação (cada micro-organismo é avaliada separadamente) a uma concentração de $1,5 - 3,0 \times 10^5$ UFC/mL. O procedimento desta análise consiste em adicionar, em frascos de 250 mL, previamente esterilizados, as seguintes quantidades:

- a - 50 mL do inóculo em água ultrapura e os pellets com NPsAg;
- b - 50 mL do inóculo em água ultrapura e os pellets sem tratamento com NPsAg (branco);
- c - 50 mL do inóculo em água ultrapura.

Os frascos foram fechados e incubados em estufa de agitação com temperatura de 36°C durante 1 minuto. Após 1 minuto, 1 hora, 12 horas e 24 horas de incubação, a agitação foi desligada, retirou-se 1 mL de cada frasco e procedeu-se as diluições e plaqueamento em profundidade em ágar padrão para contagem (PCA).

Todos os ensaios foram realizados em triplicata para avaliar o resultado final com base na média destas triplicatas. O tempo de 1 minuto ficou designado como t_0 .

A porcentagem de redução dos micro-organismos é calculada através da fórmula abaixo:

$$\text{Redução \% (UFC/mL)} = \frac{B - A}{B} \times 100$$

Onde:

A = UFC/mL (ou log da densidade de bactérias) do frasco contendo o material tratado com nanoprata depois do tempo de contado especificado (1h),

B = UFC/mL (ou log da densidade de bactérias) no tempo 0 (1min) do frasco utilizado para determinação de A.

3.2.2.4 Análise físico-química

As análises físico químicas foram realizadas pelo Laboratório de físico-química do LABCAL/UFSC, sendo a metodologia empregada em cada teste de acordo com a legislação vigente.

Foram realizadas as seguintes análises: pH, condutividade ($\mu\text{s}/\text{cm}$), turbidez (NTU), dureza total (mg/L), ferro total (ppm), matéria orgânica (oxibilidade) (mg/L)

3.2.2.5 Teste de lixiviação de prata

O teste de lixiviação de prata foi realizado pelo Laboratório de Espectrometria de Massa/UFSC, Florianópolis - SC, seguindo o protocolo abaixo:

As amostras foram preparadas para a determinação de Ag com a adição de Rh como padrão interno na concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ e de HNO_3 1% v/v. Para as soluções de calibração e para o branco, o mesmo procedimento foi adotado. Utilizou-se a nebulização pneumática e gás argônio 99,996%. Foi utilizado um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado modelo NexION 300D (Perkin Elmer, *Shelton*, USA).

Todos os reagentes utilizados possuíam no mínimo grau analítico de pureza. Água foi deionizada em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA) a uma resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$. Ácido nítrico 65% v/v de (Carlo Erba Reagenti, Milan, Itália) foi bi-destilado abaixo da temperatura de ebulição em destilador de quartzo (Kürner Analysentechnik, Rosenheim, Alemanha). Solução multielementar ICP *Multi Element calibration Standard 3* (Shelton, USA) e de Rh (Perkin Elmer, Norwalk, EUA) foram utilizados.

O limite de detecção do método (LOD) foi de $0,06 \mu\text{g L}^{-1}$ e o limite de quantificação (LOQ) foi de $0,18 \mu\text{g L}^{-1}$. A faixa de calibração empregada foi de 1 – $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

3.3.2.6 Análise estatística

Foi realizada regressão linear e teste de Tukey pelo programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

3.2.3 Análise da atividade antimicrobiana de pellets de NPsAg por metodologia sem contato dinâmico

Foi realizada análise apenas de água ultrapura artificialmente contaminada. Todo o procedimento segue os mesmos parâmetros do item 3.2.2, em todos os aspectos, utilizando os 4 micro-organismos (*S.aureus*, *K.pneumoniae*, *E.coli*, *E.faecalis*). O único diferencial é a adaptação do método da ASTM E-2149 para a utilização em um modelo de filtro para desinfecção de água.

Foram realizados ensaios com cada um dos micro-organismos, cada um em triplicata, totalizando 12 ensaios. O diferencial desta metodologia do filtro em comparação a outra metodologia apresentada é a utilização de um modelo de filtro onde não há movimentação dos pellets com nanopartículas e contato dos mesmos com os micro-organismos.

O modelo do filtro é composto de:

- Base de cilíndrica de vidro autoclavável (1)
- Suporte superior com aberturas de entrada (2) e saída (3)
- Mangueira de entrada (4) e saída (5)
- Béquer de plástico (6)
- Bomba de submersa de aquário, marca Atman, modelo AT-302, de 450l/hora de vazão (7)
- Esferas de vidro (8) para preenchimento da coluna
- Pellets de EVA com NPsAg (9)



Figura 7 - Modelo de filtro

Fonte: Dados primários, 2012

Foi adicionado ao béquer cerca de 1 litro de água, contaminada artificialmente com cada um dos micro-organismos, separadamente (*S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*), até que por ação da bomba essa água fosse transferida para a coluna, preenchendo-a por completo. O filtro operou em circulação fechada, transportando a água do béquer para a coluna e vice-versa. Foi utilizado papel pardo para evitar o contato com a superfície externa.

Da mesma forma na metodologia anterior foram retiradas alíquotas nos tempos estabelecidos, com controles do branco e inóculo mantidos na estufa bacteriológica de agitação e realizados concomitantemente.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana de pellets com NPsAg por metodologia de contato

Nas tabelas abaixo são expressos os valores da porcentagem média de redução de micro-organismos em UFC/mL. São expressos também os valores do inóculo e do branco para controle. Como esperado os valores do inóculo e muitas vezes do branco são negativos, demonstrando que ao longo do tempo não houve redução e sim crescimento de micro-organismos. Em certos casos observou-se discreta redução do branco. Isso pode ser devido a algum erro experimental pontual.

Foram realizados os ensaios em triplicata e a seguir apresentados apenas os valores médios dos 3 ensaios.

3.3.1.1 Água ultrapura artificialmente contaminada

3.3.1.1.1 Água ultrapura artificialmente contaminada por *Staphylococcus aureus*

Tabela 3 – *Staphylococcus aureus* - Ensaio microbiológico em água ultrapura artificialmente contaminada conforme a norma ASTM E-2149 – % da média de redução em UFC/mL e desvio padrão

<i>Staphylococcus aureus</i> : % Média (UFC/mL) e Desvio Padrão				
Tratamento	% Média de Redução 1 hr	% Média de Redução 12hr	% Média de Redução 24hr	Desvio Padrão
10g	83,36	97,48	100,00	0,00
20g	99,10	99,99	100,00	0,00
Branco	63,78	7,94	71,57	10,09
Inóculo	-1600,96	1787043736,73	-7924,35	6238,03

Fonte: Dados primários, 2012

Avaliando-se as médias da redução de UFC/mL, utilizando-se 10g de pellets a redução passou de mais de 80% na primeira hora para 95% em 12hr e chegando a 100% em 24 hr. Com 20g de pellets a redução foi de quase 100% já na primeira hora, permanecendo assim até as 24 hr.

3.3.1.1.2 Água ultrapura artificialmente contaminada por *Klebsiella pneumoniae*

Tabela 4 - *Klebsiella pneumoniae* - Ensaio microbiológicos em água ultrapura artificialmente contaminada conforme a norma ASTM E-2149 – % da média em UFC/mL e desvio padrão

<i>Klebsiella pneumoniae</i>: % Média (UFC/mL) e Desvio Padrão				
Tratamento	% Média de Redução em 1 hr	% Média de Redução em 12hr	% Média de Redução em 24hr	Desvio Padrão
10g	75,73	98,80	100,00	0,00
20g	100,00	100,00	100,00	0,00
Branco	24,18	27,2	28,3	1,74
Inóculo	-111,66	-13875,91	-1874,32	1326,41

Fonte: Dados primários, 2012

Avaliando-se as médias da redução de UFC/mL, utilizando-se 10g de pellets a redução passou de mais de 70% na primeira hora para 100% em 12 hr e 24 hr. Com 20g de pellets a redução foi de 100% já na primeira hora, permanecendo assim até as 24 hr.

3.3.1.1.3 Água ultrapura artificialmente contaminada por *Escherichia coli*

Tabela 5 - *Escherichia coli* - Ensaios microbiológicos em água ultrapura artificialmente contaminada conforme a norma ASTM E-2149 – % média em UFC/mL e desvio padrão

<i>Escherichia coli</i>: % Média (UFC/mL) e Desvio Padrão				
Tratamento	% Média de Redução em 1 hr	% Média de Redução em 12hr	% Média de Redução em 24hr	Desvio Padrão
10g	99,97	100,00	98,23	2,50
20g	99,99	100,00	100,00	0,00
Branco	-174,30	-63,12	-943,33	479,90
Inóculo	-1534,35	-1337,66	-6117,87	5273,07

Fonte: Dados primários, 2012

Avaliando-se as médias da redução de UFC/mL, observou-se que em ambos os tratamentos (10g e 20g), desde a primeira hora já houve uma redução de mais de 99%, passando para 100% com 12hr e 24hr.

3.3.1.1.4 Água ultrapura artificialmente contaminada por *Enterococcus faecalis*

Tabela 6 - *Enterococcus faecalis* - Ensaio microbiológicos em água ultrapura artificialmente contaminada conforme a norma ASTM E-2149 – % média e desvio padrão

<i>Enterococcus faecalis</i>: % Média em UFC/mL e Desvio Padrão				
Tratamento	% Média de Redução em 1 hr	% Média de Redução em 12hr	% Média de Redução em 24hr	Desvio Padrão
10g	89,17	98,66	100,00	0,00
20g	91,25	98,94	100,00	0,00
Branco	-95,51	-184,11	-3296,93	2227,56
Inóculo	-109,18	-10859,25	-10501,71	10561,89

Fonte: Dados primários, 2012

Avaliando-se as médias da redução de UFC/mL, observou-se no tratamento com 10g um aumento na taxa de redução de 85% em 1h para mais de 99% em 12hr, chegando a 100% em 24hr. Com 20g este índice aumenta para mais de 90% já na primeira hora, para 99% em 12hr e 100% em 24hr.

3.3.1.1.5 Água subterrânea – de poço artesiano

Tabela 7 - Ensaios microbiológicos em água subterrânea (de poço artesiano) conforme a norma ASTM E-2149 – Ensaio 3

Ensaio 3: Contagem Inicial Água $3,9 \cdot 10^7$							
Tratamento	T0hr	T1hr	T12hr	T24hr	% de Redução em 1 hr	% de Redução em 12hr	% de Redução em 24hr
10g	$4,0 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^1$	$0,0 \cdot 10^0$	$1,0 \cdot 10^0$	100,00	100,00	100,00
20g	$4,1 \cdot 10^7$	$0,0 \cdot 10^0$	$0,0 \cdot 10^0$	$1,0 \cdot 10^0$	100,00	100,00	100,00
Branco	$2,4 \cdot 10^7$	$8,3 \cdot 10^6$	$7,6 \cdot 10^7$	$9,1 \cdot 10^6$	65,42	66,2	62,08
Inóculo E.coli	$2,8 \cdot 10^5$	$2,7 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^7$	$3,5 \cdot 10^7$	-864,29	-6328,57	-12400,00
Inóculo Enterococcus	$1,8 \cdot 10^5$	$4,1 \cdot 10^6$	$7,5 \cdot 10^7$	$3,2 \cdot 10^7$	-2177,78	-41566,67	-17677,78

Fonte: Dados primários, 2012

Tabela 8 - Ensaio microbiológicos em água subterrânea (de poço artesiano) conforme a norma ASTM E-2149 – % média e desvio padrão

: % Média e Desvio Padrão				
Tratamento	% Média de Redução em 1 hr	% Média de Redução em 12hr	% Média de Redução em 24hr	Desvio Padrão
10g	100,00	100,00	100,00	0,00
20g	100,00	100,00	100,00	0,00
Branco	28,51	-19,41	78,10	11,63
Inóculo E.coli	-2030,84	-20838,71	-5639,23	5027,08
Inóculo Enterococcus	-1233,55	-21910,42	-7544,43	7202,61

Fonte: Dados primários, 2012

Avaliando-se as médias da redução de UFC/mL, observou-se a redução de 100% em 10g e 20g já na primeira hora em todos os ensaios.

3.3.1.1.6 Água de processo da indústria de alimentos

Tabela 9 - Ensaio microbiológicos em água de processo da indústria de alimentos - % média em UFC/mL e desvio padrão

% Média em UFC/mL e Desvio Padrão				
Tratamento	% Média de Redução em 1 hr	% Média de Redução em 12hr	% Média de Redução em 24hr	Desvio Padrão
10g	66,07	77,88	99,77	0,28
20g	88,16	99,70	99,97	0,01
Branco	13,84	-14,90	-1112,33	1673,46
Inóculo <i>E.coli</i>	6,43	-1453,19	-4785,93	6830,32
Inóculo <i>E.faecalis</i>	-66,53	-0,20	-740,63	1185,54

Fonte: Dados primários, 2012

Avaliando-se as médias da redução de UFC/mL, observou-se que no tratamento com 10g a redução foi de cerca de 60% na primeira hora, chegando a 99% em 24hr.

3.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana de pellets com NPsAg por metodologia sem contato

3.3.2.1 Água ultrapura artificialmente contaminada

3.3.2.1.1 Água ultrapura artificialmente contaminada - *Klebsiella pneumoniae*

Tabela 10 - *Klebsiella pneumoniae* - Ensaio microbiológico em água ultrapura artificialmente contaminada conforme a norma ASTM E-2149 – % média e em UFC/mL e desvio padrão

<i>Klebsiella pneumoniae</i>: % Média em UFC/mL e Desvio Padrão				
Tratamento	% Média de Redução em 1 hr	% Média de Redução em 12hr	% Média de Redução em 24hr	Desvio Padrão
10g	74,37	77,74	98,00	2,37
20g	24,59	92,00	99,85	0,13
Branco	-244,05	31,88	-24,70	105,60
Inóculo	15,38	-4899,80	-1419,94	1056,81

Fonte: Dados primários, 2012

Avaliando-se as médias da redução de UFC/mL, observou-se que em 10g obteve-se cerca de 75% de redução na primeira hora, enquanto com 20g obteve-se apenas 25%. Em 24hr, no entanto, em 10g e 20g houve redução de 98% e 99%, respectivamente.

3.3.2.1.2 Água ultrapura artificialmente contaminada - *Staphylococcus aureus*

Tabela 11 - *Staphylococcus aureus* - Ensaio microbiológicos em água ultrapura artificialmente contaminada conforme a norma ASTM E-2149 – % média em UFC/mL e desvio padrão

<i>Staphylococcus aureus</i>: % Média em UFC/mL e Desvio Padrão				
Tratamento	% Média de Redução em 1 hr	% Média de Redução em 12hr	% Média de Redução em 24hr	Desvio Padrão
10g	74,80	89,85	99,52	0,45
20g	86,71	74,35	99,80	0,26
Branco	13,06	-50,43	33,13	25,13
Inóculo	-507,98	-27167,86	-5894,05	7082,22

Fonte: Dados primários, 2012

Avaliando-se as médias da redução de UFC/mL, observou-se que em 10g obteve-se cerca de 75% de redução na primeira hora, enquanto com 20g obteve-se 85%. Em 24hr, no entanto, em ambos os tratamento houve redução de 99%.

3.2.2.1.3 Água ultrapura artificialmente contaminada - *Enterococcus faecalis*

Tabela 12 - *Enterococcus faecalis* - Ensaio microbiológicos em água ultrapura artificialmente contaminada conforme a norma ASTM E-2149 – % média em UFC/mL e desvio padrão

<i>Enterococcus faecalis</i>: % Média em UFC/mL e Desvio Padrão				
Tratamento	% Média de Redução em 1 hr	% Média de Redução em 12hr	% Média de Redução em 24hr	Desvio Padrão
10g	77,84	98,22	99,87	0,09
20g	91,31	99,91	99,98	0,01
Branco	-1103,18	-573,08	-2628,89	2501,80
Inóculo	-708,57	-3010,79	-9903,09	8845,90

Fonte: Dados primários, 2012

Avaliando-se as médias da redução de UFC/mL, observou-se que em 10g obteve-se cerca de 75% de redução na primeira hora, enquanto com 20g obteve-se cerca de 90%. Em 24hr, no entanto, em ambos os tratamentos houve redução de 99%.

3.2.2.1.4 Água ultrapura artificialmente contaminada - *Escherichia coli*

Tabela 13 - *Escherichia coli* - Ensaio microbiológicos em água ultrapura artificialmente contaminada conforme a norma ASTM E-2149 – % média em UFC/mL e desvio padrão

<i>Escherichia coli</i>: % Média em UFC/mL e Desvio Padrão				
Tratamento	% Média de Redução em 1 hr	% Média de Redução em 12hr	% Média de Redução em 24hr	Desvio Padrão
10g	65,53	96,45	99,85	0,06
20g	87,48	99,78	99,98	0,02
Branco	-35,88	-2444,97	-776,81	267,04
Inóculo	-1244,82	-12708,08	-21326,77	13725,66

Fonte: Dados primários, 2012

Avaliando-se as médias da redução de UFC/mL, observou-se que em 10g obteve-se cerca de 65% de redução na primeira hora, enquanto com 20g obteve-se cerca de 90%. Em 24hr, no entanto, em ambos os tratamentos houve redução de 99%.

Como observado, as análises foram realizadas em 4 tempos; com 4 micro-organismos diferentes; com 2 quantidades diferentes de pellets (10g e 20g) e 3 tipos de água (ultrapura, subterrânea (de poço artesiano) e de processo da indústria de alimento).

O intuito de trabalhar com os três tipos de água foi avaliar o comportamento das nanopartículas frente a diferentes composições físico-químicas e microbiológicas. A água ultrapura foi utilizada para avaliar o desempenho antimicrobiano das nanopartículas sem a interferência de fatores do substrato, já que a água ultrapura é uma água de extrema pureza, isenta de partículas, íons e substâncias orgânicas ou micro-organismos. A água subterrânea foi escolhida para avaliar a atividade das

nanopartículas em um substrato rico em compostos inorgânicos, como minerais. Já a água de processo da indústria de alimentos foi escolhida para avaliar a atividade das nanopartículas em um substrato rico em matéria orgânica, como gordura, carboidratos e proteínas.

Em relação a avaliação microbiológica, a ASTM E2149 recomenda análises apenas de *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. No entanto, a metodologia foi adaptada para mais dois micro-organismos: *Escherichia coli* – importante micro-organismo solicitado pela legislação brasileira em análises de água e *Enterococcus faecalis* – micro-organismo presente em água de processos na indústria de alimentos.

3.3.3 Análise físico-química

Tabela 14 - Análise físico-química de água ultrapura, subterrânea e de processo industrial

Análise	Água subterrânea	Água ultrapura	Água de processo industrial
pH	4,35	6,98	7,07
Condutividade (µs/cm)	140,8	<1	134,9
Turbidez (NTU)	17,6	----*	413,0
Dureza Total (mg/L)	<0,05	----*	47,1
Ferro Total (ppm)	2,39	----*	1,09
Matéria orgânica (oxibilidade) (mg/L)	35,7	----*	774,3

Legenda: * Ensaio não realizado pois não se aplica

Fonte: Dados primários, 2012

De acordo com os resultados das análises físico-químicas pode-se verificar que se confirmou a composição rica em compostos inorgânicos para a água de poço, enquanto a água da indústria mostrou seu elevado teor de matéria orgânica, visto que a água ultrapura confirmou seus resultados de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2011).

3.3.4 Teste de lixiviação de prata

Tabela 15 - Análise de ICP-MS avaliando-se o micro-organismo *S.aureus*.

<i>Staphylococcus aureus</i> (µg/L)				
Tratamento	T0hr	T1hr	T12hr	T24hr
10g	3,72 ± 0,14	8,53 ± 0,14	22,95 ± 0,30	20,31 ± 0,23
20g	9,56 ± 0,08	14,74 ± 1,10	56,80 ± 2,89	27,80 ± 1,24
Branco	-	-	-	2,35 ± 0,56

Fonte: Dados primários, 2012

Tabela 16 - Análise de ICP-MS avaliando-se o micro-organismo *Klebsiella pneumoniae*.

<i>Klebsiella pneumoniae</i> (µg/L)				
Tratamento	T0hr	T1hr	T12hr	T24hr
10g	4,55 ± 0,09	13,89 ± 0,12	28,86 ± 0,08	59,98 ± 0,75
20g	8,27 ± 0,09	18,13 ± 0,06	28,36 ± 1,17	51,66 ± 3,31
Branco	-	-	-	Menor que LOQ

Fonte: Dados primários, 2012

Tabela 17- Análise de ICP-MS avaliando-se o micro-organismo
Escherichia coli

<i>Escherichia coli</i> (µg/L)				
Tratamento	T0hr	T1hr	T12hr	T24hr
10g	4,87 ± 0,02	9,19 ± 0,43	14,00 ± 0,21	36,91 ± 0,31
20g	9,42 ± 0,13	17,43 ± 0,79	45,88 ± 0,05	52,13 ± 1,28
Branco	-	-	-	2,45 ± 0,90

Fonte: Dados primários, 2012

Tabela 18- Análise de ICP-MS avaliando-se o micro-organismo
Enterococcus faecalis (µg/L)

<i>Enterococcus faecalis</i> (µg/L)				
Tratamento	T0hr	T1hr	T12hr	T24hr
10g	7,03 ± 0,08	4,97 ± 0,07	4,73 ± 0,16	46,71 ± 0,49
20g	19,64 ± 0,12	34,05 ± 0,53	93,78 ± 5,45	112,75 ± 0,73
Branco	-	-	-	1,61 ± 0,48

Fonte: Dados primários, 2012

A concentração máxima de Ag permitida em água de consumo pela legislação é de 10µg/L (Resolução/CONAMA/nº357 – 2005). Em face disto, de acordo com os resultados acima descritos, nenhuma das amostras está de acordo.

Não houve diferença significativa entre micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos.

O armazenamento das amostras em tubos de ensaio com tampa metálica podem ter interferido no resultado.

3.3.5 Análise estatística

Foram realizadas as análises estatísticas para as diferentes variáveis já mencionadas e discutidas anteriormente. Abaixo se observam as tabelas com os respectivos resultados.

Foram realizados os métodos de Tukey, regressão linear e análise de variância. O método de Tukey consiste na construção de intervalos de confiança para todos os pares de médias de tal forma que o conjunto de todos os intervalos tenha um determinado grau de confiança (GUIMARÃES; SARFIELD CABRAL, 2007).

Regressão linear é um método para se estimar a condicional, ou seja, o valor esperado de uma variável y , frente aos valores de outras variáveis x . Em geral, trata da questão de se estimar um valor condicional esperado. É chamada "linear" porque se considera que a relação da resposta às variáveis é uma função linear de alguns parâmetros (ANDRADE, OLGLIARI, 2007).

3.3.5.1 Análise da atividade antimicrobiana de pellets de NPsAg por metodologia de contato

- Água ultrapura

Aplicou-se o Teste de Tukey para analisar se há relação de significância entre a quantidade de pellets utilizado (10g e 20g) e o tempo (1 hora, 12 horas e 24 horas). Observam-se os dados nas tabelas a seguir.

Desdobramento de micro-organismos dentro de nível (quantidade de pellets) x tempo

Tabela 19 - Teste de Tukey com nível 10 g. (Erro padrão: 2.94)

Média de redução (%)			
Tratamentos	1 hora	12 horas	24 horas
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	75.73 a	98.79 a	100.00 a
<i>Staphylococcus aureus</i>	83.35 ab	97.47 aa	100.00 a
Enterococcus	89.17 bc	98.66 a	100.00 a
Escherichia coli	99.97 c	100.00 a	100.00 a

Fonte: Dados primários, 2012

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Tabela 20 - Teste de Tukey com nível 20 g. (Erro padrão: 2.94)

Média de redução (%)			
Tratamentos	1 hora	12 horas	24 horas
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100.00 a	100.00 a	100.00 a
<i>Staphylococcus aureus</i>	99.10 a	99.99 a	100.00 a
<i>Enterococcus faecalis</i>	91.25 a	98.94 a	100.00 a
Escherichia coli	99.99 a	100.00 a	100.00 a

Fonte: Dados primários, 2012

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Verificou-se que houve diferenças significativas na redução da contagem dos micro-organismos apenas na dose 10g e na primeira hora.

Desdobramento de níveis dentro de micro-organismos x tempo

Tabela 21 - Teste de Tukey com Micro-organismos. (Erro padrão: 2.94)

Nível	<i>Enterococcus faecalis</i>			<i>Escherichia coli</i>		
	1 hora	12 horas	24 horas	1 hora	12 horas	24 horas
10	89.17 a	98.66 a	100.0 0 a	99.97 a	100.00 a	100.00 a
20	91.25 a	98.94 a	100.0 0 a	99.99 a	100.00 a	100.00 a

Fonte: Dados primários, 2012

Tabela 22 - Teste de Tukey com Micro-organismos. (Erro padrão: 2.94)

Nível	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
	1 hora	12 horas	24 horas	1 hora	12 horas	24 horas
10	75.73 a	98.79 a	100.00 a	83.35 a	97.47 a	100.00 a
20	100.0 0 b	100.00 a	100.00 a	99.10 b	99.99 a	100.00 a

Fonte: Dados primários, 2012

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Observou-se que somente para *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* o nível 20 g apresentou maior porcentagem e na primeira hora.

Tabela 23 – Regressão linear com micro-organismos

Nível	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Escherichia coli</i>
10g	$Y_i = 78.67 + 1.04 X_i$ $R^2 = 76.63\%$	$Y_i = 84.78 + 0.72 X_i$ $R^2 = 84.30\%$	$Y_i = 90.20 + 0.47 X_i$ $R^2 = 82.24\%$	$Y_i = 99.974 + 0.001 X_i$ $R^2 = 72.80\%$
20g	$Y_i = 100.00 + 0.0 X_i$ $R^2 = 100.00\%$	$Y_i = 99.22 + 0.04 X_i$ $R^2 = 73.94\%$	$Y_i = 92.09 + 0.37 X_i$ $R^2 = 82.02\%$	$Y_i = 99.99 + 0.0004 X_i$ $R^2 = 72.80\%$

Fonte: Dados primários, 2012

Isto significa que a cada hora que passa (X_i) a porcentagem média de redução do micro-organismo (Y_i) aumenta 1 vez o valor do coeficiente do X_i . Para *E.faecalis* no nível 10g a porcentagem média de redução do micro-organismo (Y_i) = $90.20 + 0.47 \times 1 = 90.20 + 0.47 = 90.67\%$. (em 12 horas seria: porcentagem média de redução do Micro-organismo $Y_i = 90.20 + 0.47 \times 12 = 90.20 + 5.64 = 95.84\%$.) Assim, é possível estimar qual a porcentagem média de redução de micro-organismos a cada hora que e em cada nível (10 e 20g).

*1 = *E.faecalis* 10 - $R^2 = 82.24\%$

2 = *E.faecalis* 20 - $R^2 = 82.02\%$

3 = *Escherichia coli* 10 - $R^2 = 72.80\%$

4 = *Escherichia coli* 20 - $R^2 = 72.80\%$

*5 = *Klebsiella pneumoniae* 10 - $R^2 = 76.63\%$

6 = *Klebsiella pneumoniae* 20 - $R^2 = 100.00\%$

*7 = *Staphylococcus aureus* 10 - $R^2 = 84.30\%$

8 = *Staphylococcus aureus* 20 - $R^2 = 73.94\%$

Os resultados assinalados acima com (*) foram considerados significativos.

- Água de processo industrial

Realizou-se o teste F e não se observaram diferenças significativas em nenhum dos casos. O teste abaixo foi realizado para se ter idéia de quanto reduziu a contagem de micro-organismo, em média, por hora, para cada nível (10g e 20g).

Tabela 24: Teste TuKey para níveis dentro de tempo.

Tratamentos 24 horas		Média de redução (%)	
Nível	1 hora	1 hora	12 horas
10	99.77 a	66.07 a	77.88 a
20	99.97 a	88.16 a	99.70 a

Fonte: Dados primários, 2012

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

- Desdobramentos de tempo dentro de nível

Tabela 25 - Regressão linear ($Y_i = \dots ; X_i = \dots$)

Nível	Equação
10	$Y_i = 63.10 + 1.47 X_i$. $R^2 = 97.89\%$
20	$Y_i = 89.70 + 0.51 X_i$. $R^2 = 74.58\%$

Fonte: Dados primários, 2012

Com essa equação é possível ter uma idéia de quanto reduziu a contagem de micro-organismos por hora. No entanto, observou-se que a equação não foi significativa.

- Água subterrânea

Tabela 26 - Teste TuKey para níveis dentro de tempo

Tratamentos horas	Média de redução (%)			
	Nível	1 hora	12 horas	24 horas
10		100 a	100 a	100 a
20		100 a	100 a	100 a

Fonte: Dados primários, 2012

Observou-se que já na primeira hora ocorreu redução de 100% da contagem de micro-organismos.

3.3.5.2 Análise da atividade antimicrobiana de pellets de NPsAg por metodologia sem contato (filtro)

- Água ultrapura

Desdobramento de Micro-organismos dentro de nível x tempo

Tabela 27 - Teste Tukey com nível 10 g. (Erro padrão: 2.94)

Média de redução (%)			
Tratamentos	1 hora	12 horas	24 horas
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	74.36 a	77.74 a	98.00 a
<i>Staphylococcus aureus</i>	74.79 a	89.85 a	99.51 a
<i>Enterococcus faecalis</i>	77.84 a	98.22 a	99.88 a
<i>Escherichia coli</i>	65.53 a	96.45 a	99.85 a

Fonte: Dados primários, 2012

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Tabela 28 - Teste Tukey com nível 20 g. (Erro padrão: 2.94)

Média de redução (%)			
Tratamentos	1 hora	12 horas	24 horas
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24.59 a	92.00 a	99.85 a
<i>Staphylococcus aureus</i>	86.71 b	74.35 b	99.80 a
<i>Enterococcus faecalis</i>	91.31 b	99.91 a	99.98 a
<i>Escherichia coli</i>	87.48 b	99.78 a	99.97 a

Fonte: Dados primários, 2012

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Verificou-se que houve diferenças significativas na redução dos micro-organismos apenas na dose 20g, na primeira hora e 12 horas depois.

Desdobramento de Níveis dentro de micro-organismos x tempo

Tabela 29 - Teste de Tukey com Micro-organismos. (Erro padrão: 2.94)

Nível	<i>Enterococcus faecalis</i>			<i>Escherichia coli</i>		
	1 hora	12 horas	24 horas	1 hora	12 horas	24 horas
10	77.84 a	98.22 a	99.88 a	65.53 a	96.45 a	99.85 a
20	91.31 a	99.91 a	99.98 a	87.48 a	99.78 a	99.97 a

Fonte: Dados primários, 2012

Tabela 30 - Teste de Tukey com Micro-organismos. (Erro padrão: 2.94)

Nível	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
	1 hora	12 horas	24 horas	1 hora	12 horas	24 horas
10	74.36 a	77.74 a	98.00 a	74.79 a	89.85 a	99.51 a
20	24.59 b	92.00 a	99.85 a	86.70 a	74.35 a	99.80 a

Fonte: Dados primários, 2012

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste

de Tukey com nível de significância de 5%.

Observa-se que somente para *Klebsiella pneumoniae* o nível 10 g deu maior porcentagem e na primeira hora.

Regressão linear ($Y_i = a + b X_i$)

Tabela 31 – Regressão linear com Micro-organismos

Nível	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>
10	$Y_i = 70.57 + 1.04 X_i$	$Y_i = 74.85 + 1.07 X_i$	$Y_i = 80.31 + 0.95 X_i$	$Y_i = 69.10 + 1.47 X_i$
20	$Y_i = 32.28 + 3.23 X_i$	$Y_i = 79.64 + 0.59 X_i$	$Y_i = 92.49 + 0.37 X_i$	$Y_i = 89.14 + 0.54 X_i$

Fonte: Dados primários, 2012

Conforme já mencionado, isto significa que a cada hora que passa (X_i) a porcentagem média de redução do micro-organismo aumenta 1 vez o valor do coeficiente do X_i . Assim, é possível estimar qual a porcentagem média da redução de micro-organismos a cada hora e em cada nível (10 e 20g).

$$1 = E.faecalis\ 10 - R^2 = 78.58\%$$

$$2 = E. faecalis\ 20 - R^2 = 73.45\%$$

$$3 = Escherichia\ coli\ 10 - R^2 = 80.40\%$$

$$4 = Escherichia\ coli\ 20 - R^2 = 74.01\%$$

$$5 = Klebsiella\ pneumoniae\ 10 - R^2 = 87.19\%$$

$$6 = Klebsiella\ pneumoniae\ 20 - R^2 = 80.79\%$$

$$*7 = Staphylococcus\ aureus\ 10 - R^2 = 97.76\%$$

$$8 = Staphylococcus\ aureus\ 20 - R^2 = 28.71\%$$

Os resultados assinalados acima com (*) foram considerados significativos.

3.3.5.3 Comparação de variáveis

- Água de processo industrial x Água subterrânea

Tabela 32 – Análise de Variância

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Local	1	1171.00840 0	1171.00840 0	6.618	0.0167
Níveis	1	486.349511	486.349511	2.748	0.1104
Tempo	2	776.978817	388.489408	2.195	0.1332
Local*Níveis	1	486.349511	486.349511	2.748	0.1104
Local*Tempo	2	776.978817	388.489408	2.195	0.1332
Níveis*Tempo	2	236.523706	118.261853	0.668	0.5218
Local*Níveis*Tempo	2	236.523706	118.261853	0.668	0.5218
Erro	24	4246.84693 3	176.951956	-	-
Total Corrigido	35	8417.55940 0			
CV (%)	14.11				
Média Geral	94.2966667		Número de Observações	36	

Fonte: Dados primários, 2012

Tabela 33 - Teste de Turkey

Tratamentos	Médias
Indústria	88.59 a
Poço	100.00 b

Fonte: Dados primários, 2012

O local refere-se ao tipo de água: subterrânea (poço) ou de processo industrial.

Comparando estes dois tipos de água observou-se que foi significativo apenas o local. Isto quer dizer que, independente do tempo e da dosagem (10 ou 20 g), a porcentagem média de redução de micro-organismos foi maior para a água de poço.

- Metodologia de contato (sem filtro) x Metodologia sem contato (com filtro)

Tabela 34 - Análise de Variância

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Local	1	1553.938335	1553.938335	20.821	0.0000
Micro-organismos	3	923.828082	307.942694	4.126	0.0111
Tempo	2	3770.431953	1885.215976	25.260	0.0000
Local*Micro-organismo	3	597.270526	199.090175	2.668	0.0581
Local*Tempo	2	1129.798553	564.899276	7.569	0.0014
Micro-organismos*Tempo	6	1004.782781	167.463797	2.244	0.0547
Local*Micro*Tempo	6	707.530803	117.921800	1.580	0.1735
Erro	48	3582.321533	74.631699		
Total Corrigido	71	13269.902565			
CV (%)	9.34				
Média Geral	92.4656944		Número de Observações	72	

Fonte: Dados primários, 2012

Os locais referem-se a metodologia de contato x metodologia sem contato (filtro).

Tabela 35 - Desdobramentos de locais dentro de micro-organismos -
Independente de Tempo

Local	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>
Sem filtro	95.75 b	96.65 b	96.34 a	99.70 b
Com filtro	77.76 a	87.51 a	94.51 a	91.50 a

Fonte: Dados primários, 2012

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de nível de significância.

Observaram-se diferenças significativas em ambas as metodologias (com filtro e sem filtro) para os micro-organismos *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Tabela 36 - Desdobramentos de micro-organismos dentro de local -
Independente de tempo

Local	Sem filtro	Com filtro
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	95.75 a	77.76 a1
<i>Staphylococcus aureus</i>	96.65 a	87.51 a2
<i>Enterococcus</i>	96.34 a	94.51 a2
<i>Escherichia coli</i>	99.70 a	91.50 a2

Fonte: Dados primários, 2012

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de nível de significância.

Observaram-se diferenças significativas apenas em *Klebsiella pneumoniae* e na metodologia com filtro.

Tabela 37 - Desdobramento de Locais dentro de cada tempo -
Independente de micro-organismo

Local	1 hora	12 horas	24 horas
Sem filtro	92.32 b	99.23 b	99.78 a
Com filtro	72.83 a	91.03 a	99.60 a

Fonte: Dados primários, 2012

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de nível de significância.

Observaram-se diferenças significativas em ambas as metodologias (com filtro e sem filtro) nos tempos de 1 hora e 12 horas. Em 24 horas não observaram-se diferenças significativas.

- Desdobramento de tempos dentro de cada local (Metodologia de contato x Metodologia sem contato) – Independente de micro-organismo

Tabela 38 - Regressão linear ($Y_i = ; x_i =$)

Local	Equação de regressão	R ²
Sem filtro	$Y_i = 93.16 + 0.32 X_i$	78.44%
Com filtro	$Y_i = 73.54 + 1.16 X_i$	94.81%

Fonte: Dados primários, 2012

Tabela 39 - Desdobramento de Micro-organismos dentro de cada tempo -
Independente de local

Micro-organismos	1 hora	12 horas	24 horas
Klebsiella pneumoniae	68.67 a	92.14 a1	99.46 a1
Staphylococcus aureus	85.99 b	90.42 a1	99.83 a1
Enterococcus	87.39 b	98.92 a1	99.97 a1
Escherichia coli	88.25 b	99.06 a1	99.50 a1

Fonte: Dados primários, 2012

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de nível de significância.

Observaram-se diferenças significativas apenas em 1 hora e com o micro-organismo *Klebsiella pneumoniae*.

- Desdobramento de tempos dentro de cada Micro-organismo - Independente de local

Tabela 40 - Regressão linear ($Y_i =$; $X_i =$)

Micro-organismos	Equação de regressão	R ²
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$Y_i = 70.38 + 1.33 X_i$	90.17%
<i>Staphylococcus aureus</i>	$Y_i = 84.62 + 0.60 X_i$	96.79%
<i>Enterococcus</i>	$Y_i = 88.77 + 0.53 X_i$	79.21%
<i>Escherichia coli</i>	$Y_i = 89.65 + 0.48 X_i$	75.82%

Fonte: Dados primários, 2012

Comparando-se a utilização de diferentes tipos de água, observou-se pouca diferença estatística, mas a água de poço artesiano mostrou maior % de redução média de UFC/mL, seguida da água ultra-pura e por último a água de processo industrial. Ao contrário do que se imaginava, as nanopartículas tiveram maior eficiência em meio com alta concentração de matéria inorgânica (água de poço artesiano) que em meio neutro, isento de íons e partículas (água ultra-pura). Já a matéria orgânica interfere de forma significativa, prejudicando a atividade das nanopartículas. Maiores estudos são necessários nessa área para explicar tais fatos.

Os tempos utilizados ($T_0 = 1$ minuto, $T_1 = 1$ hora, $T_{12} = 12$ horas e $T_{24} = 24$ horas) se mostraram adequados. Apenas nos casos em que houve o problema de reaparecimento de micro-organismos em 24 horas que seria interessante o acréscimo dos tempos $T_{36} = 36$ horas e $T_{48} = 48$ horas, para verificar a multiplicação contínua ou estagnação do micro-organismo.

3.4 CONCLUSÕES

- Existe diferença na interação das nanopartículas de prata em diferentes amostras de água: maior eficiência em água subterrânea, seguida da água ultrapura e por fim a água de processo da indústria de alimentos. Comparando-se estatisticamente a água subterrânea com a água de processo industrial, independente do tempo e da quantidade de pellets utilizada, a água subterrânea mostrou maior % média de redução.
- As análises físico-químicas confirmaram a característica de cada tipo de água, com maior porcentagem de matéria orgânica (água de processo da indústria) e matéria inorgânica (água subterrânea).
- São necessários maiores estudos e testes para certificar-se que é necessário o contato do micro-organismo com as nanopartículas para maior eficiência. Avaliando-se as duas metodologias em relação a % de redução média de UFC/mL, na água ultrapura (único tipo de água testado no filtro), ambas tiveram significância. Entretanto não pode-se afirmar que uma ou outra metodologia é mais eficaz, são necessários maiores estudos.
- Não existe grande diferença na atividade antimicrobiana das nanopartículas frente a Gram-positivos e Gram-negativos.
- Apesar de vários ensaios terem mostrado a % de redução de micro-organismos chegando a 100% na primeira hora com a utilização de 20g de pellets, de acordo com as análises estatísticas não é possível afirmar que a maior quantidade de pellets promove maior redução. São necessários estudos posteriores.
- Necessários maiores estudos em relação a síntese de nanopartículas de prata como: redução de custo de sua síntese para viabilizar sua utilização em larga escala; sua impregnação em matrizes diferentes das utilizadas;

micro-organismos diferentes com metodologias diferenciadas.

- Importante realização de pesquisas com outros metais (ouro, cobre) associados a nanotecnologia para auxiliar na desinfecção de água de consumo e também nos problemas com a utilização da água na indústria de alimentos.

3.5 REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21. ed. Washington, 2005. p. 1336.

ANDRADE, D. F.; OGLIARI, P. J. **Estatística para as ciências agrárias e biológicas com noções de experimentação**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

ASTM E 2149 – 01. **Standard test method for determining the antimicrobial activity of immobilized antimicrobial agents under dynamic contact conditions**. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde Gabinete do Ministro. **Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. 2011.

CASTRO, Viviane Guimarães de. **Utilização da água na indústria de alimentos**. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) - Universidade Castelo Branco, São Paulo, 2006.

CHOHAN, Z. H.; SUPURAN, C. T.; SCOZZAFAVA, A. Metalloantibiotics: Synthesis and antibacterial activity of cobalt(II), copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes of kefzol. In: **J Enzyme Inhib Med Chem**, v. 19, p. 79-84, 2004.

FENG, Peter; WEAGANT, Stephen D.; GRANT, Michael A.; BURKHARDT, William. BAM: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. In: **Bacteriological Analytical Manual**, cap. 4, 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm064948.htm>>. Acesso em: 10 mar. 2012.

FENG, Q. L.; WU, J.; CHEN, G. Q.; CUI, F. Z.; KIM, T. N.; KIM, J. O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. In: **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, p. 662–668, 2000.

FERNANDES, Patricia Erica. **Novo método de síntese de nanopartículas de prata e avaliação do seu efeito antimicrobiano**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a computer statistical analysis system. In: **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FLECK et al. Análise físico-química da qualidade da água do Rio Alegria localizado no município de Medianeira-PR. In: **Revista Eletrônica Científica Inovação e Tecnologia**, v. 1, n. 5, 2012.

FREIRE, F. B.; PIRES, E. C.; FREIRE, J. C. Tratamento anaeróbio de pentaclorofenol em reator de leito fluidificado alimentado com água residuária sintética contendo glicose como fonte única de carbono. In: **Eng. sanit. ambient.**, v. 13, n. 3, p. 339-346, jul./set. 2008.

GUIMARÃES, R. C.; SARFIELD CABRAL, J. A. **Estatística**. 2. ed. McGraw-Hill, 2007.

JIS– JAPANESE INDUSTRIAL STANDARD. **JIS Z 2801:2000**. Antimicrobial Products – Test for antimicrobial activity and efficacy. Japanese Standards Association: Tokyo, Japan, 2000.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus Níger*. In: **Sci. agric.**, Piracicaba, v. 52, n. 2, p. 299-304, maio/ago. 1995.

LIMA, A; SCHMIDELL, W.; NINOW, J. L.; SOARES, H. M. Aclimação de microbiota nitrificante para o tratamento de efluente de indústria frigorífica. In: **Revista Saúde e Ambiente**, v. 8, n. 1, 2007.

OLIVEIRA, Anie Karina da Rosa. **Reaproveitamento de resíduos de EVA da indústria calçadista em formulações de borracha**. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Industrial) - Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, 2007.

TEBALDI et al. Qualidade da água de um córrego sob influência de efluente tratado de abate bovino. In: **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, n.3, p.302–309, 2011.