



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS



CÂMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS – HENRIQUE SANTILLO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MOLECULARES

LETÍCIA KLEIN SEBASTIANY

**ESTUDO DA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 NA SUPERFÍCIE DE CARVÃO ATIVADO IMPREGNADO COM ZINCO E COBRE EM MEIO FILTRANTE DE LEITO FIXO**

ANÁPOLIS-GO

Setembro, 2015

LETÍCIA KLEIN SEBASTIANY

**ESTUDO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Pseudomonas aeruginosa* ATCC  
9027 NA SUPERFÍCIE DE CARVÃO ATIVADO IMPREGNADO COM ZINCO E  
COBRE EM MEIO FILTRANTE DE LEITO FIXO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. José Daniel Ribeiro de Campos

Co-orientador: Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves

\*Bolsista CAPES

**Anápolis- GO**

**2015**

Sebastiany, Leticia Klein.

ESTUDO DA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 NA SUPERFÍCIE DE CARVÃO ATIVADO IMPREGNADO COM ZINCO E COBRE EM MEIO FILTRANTE DE LEITO FIXO – 2015

68 folhas. 23 figuras.

Orientador: Prof. Dr. José Daniel Ribeiro Campos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás, 2015.


1. Biofilmes. 2. Carvão ativado. 3. Zinco. 4. Cobre. I. Título.

ESTUDO DA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 NA SUPERFÍCIE DE CARVÃO ATIVADO IMPREGNADO COM ZINCO E COBRE EM MEIO FILTRANTE DE LEITO FIXO

LETÍCIA KLEIN SEBASTIANY


Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências Moleculares do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas – Henrique Santillo, da Universidade Estadual de Goiás, apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestra em Ciências Moleculares.

Aprovada em 30/09/2015 por:



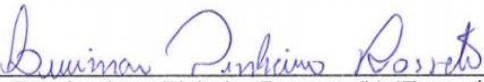
---

Prof. Dr. José Daniel Ribeiro de Campos (UEG)



---

Prof. Dr. Renato Rosseto (UEG)



---

Profa. Dra. Lucimar Pinheiro Rosseto (UniEvangélica)

ANÁPOLIS – GO  
SETEMBRO 2015

*“Perder tempo em aprender coisas que não interessam, priva-nos de descobrir coisas interessantes.”*

*Carlos Drummond de Andrade*

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus por todas as graças recebidas.

Aos meus pais Suzana Klein Sebastiany, Noé Luiz Sebastiany, aos meus irmãos Laura Klein Sebastiany, Luciana Klein Sebastiany, Luís Augusto Klein Sebastiany, ao Adriel Martins Lima e a Vera Maria Tavares pela força e por todo apoio.

Ao Prof. Dr. José Daniel Ribeiro de Campos pela orientação, todo conhecimento compartilhado e toda confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves pela Co-orientação e todo conhecimento proporcionado.

À CAPES pela bolsa concedida.

A todos os técnicos do laboratório de química, em especial ao Cleiber Cintra Morais e laboratório de microbiologia da UEG ao Osvaldo Gomes Pinto e Amanda Mazali por todo auxílio e aos meus colegas de pesquisa: Lorena Ferreira de Souza Oliveira, Eduardo Andrade, Sinara Pereira Brasil.

A todos os meus companheiros de mestrado: Érica Lima de Oliveira, Gabriel Victor Simões Dutra, Júnio César Fonseca Silva, Andréia de Araújo Martins, Carlos Júnior Gomes, Cindy Andrade Ribeiro.

Aos professores por colaborarem e aceitarem participar da banca examinadora.

Muito Obrigada!

## RESUMO

O carvão ativado é utilizado em filtros de água devido sua elevada capacidade adsortiva. Contudo, micro-organismos e matéria orgânica podem alojar-se na sua superfície porosa. Os micro-organismos consomem a matéria orgânica, secretam polissacarídeos e se reproduzem, formando biofilmes microbianos nestes filtros, que durante o processo de filtração podem ser desprendidos e contaminar a água filtrada. Neste trabalho, amostras de carvão ativado de casca de coco de Dendê (*Elaeis guineensis*) foram impregnadas com zinco, cobre e a combinação entre estes metais nos seguintes teores em massa: 0,100% Zn; 0,132% Cu; 0,066% Zn / 0,055% Cu; 0,041% Zn / 0,101% Cu; 0,062% Zn / 0,092% Cu, para avaliar o efeito inibitório na formação desta modalidade de crescimento microbiano. A formação de biofilme nas superfícies dos carvões foi testada em leito fixo, com a passagem de água de desafio com  $6,398 \text{ ufc mL}^{-1}$  de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. As amostras de carvão foram incubadas em câmara úmida a temperatura ambiente durante 24h. Foi realizada a sonicação para o desprendimento das células associadas aos biofilmes para contagem das células viáveis. Houve a formação de biofilmes no carvão ativado (CA<sub>ni</sub>) com contagem de  $6,087 \log_{10} \text{ ufc/5g}$  de CA<sub>ni</sub>. Para as amostras de carvão ativado impregnado com metais (CA<sub>i</sub>) houve diminuição significativa na formação de biofilmes entre CA<sub>ni</sub> e CA<sub>i</sub>, exceto para a comparação CA<sub>ni</sub> e CA<sub>i</sub> 0,100% Zn (para valores de  $p < 0,05$ ). Entre os tratamentos dos CA<sub>i</sub> foi verificada inibição significativa entre as amostras que contém zinco e cobre isoladamente comparadas às amostras combinadas, exceto para a comparação CA<sub>i</sub> 0,100% Zn e CA<sub>i</sub> 0,066% Zn / 0,055% Cu. Observou-se, ainda, um efeito sinérgico nas amostras impregnadas com zinco e cobre simultaneamente, potencializando a atividade inibitória da formação de biofilme quando comparado à mesma ação dos metais isolados e principalmente ao carvão ativado não impregnado (CA<sub>ni</sub>).

**Palavras-chave:** Carvão ativado, biofilme, *Pseudomonas aeruginosa*, zinco e cobre.

## ABSTRACT

Activated carbon is used in water filters due to its high adsorption capacity. However, microorganisms and organic matter can settle in its porous surface. The microorganisms consume organic matter and reproduce secrete polysaccharides, biofilm forming microbial these filters, which during the filtration process can be detached and contaminate the filtered water. In this work, samples of activated charcoal palm *Elaeis guineensis* coconut shell were impregnated with zinc, copper and combinations of these metals in the following weight contents: 0.100% Zn; 0.132% Cu; 0.066% Zn / Cu 0.055%; 0.041% Zn / Cu 0.101%; 0.062% Zn / Cu 0.092%, to assess the inhibitory effect on the formation of this method microbial growth. Biofilm formation on the surfaces of activated carbon was tested in flow using water with  $6.398 \text{ cfu mL}^{-1}$  *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. The coal samples were incubated in a humid chamber at room temperature for 24h. Sonication was performed for the detachment of cells associated with biofilms for counting the viable cells. There was the biofilm formation on the activated carbon (CA<sub>ni</sub>) with counting  $6.087 \log_{10} \text{ cfu} / 5\text{g CA}_{ni}$ . For samples activated carbon impregnated with metals (CA<sub>i</sub>) there was a significant reduction in the formation of biofilms between CA<sub>ni</sub> and CA<sub>i</sub> except for the comparison CA<sub>ni</sub> and CA<sub>i</sub> 0.100% Zn (for p values <0.05). Among the treatments CA<sub>i</sub> (activated carbon impregnated) significant inhibition was observed between samples containing zinc and copper alone compared to the combined samples, except for the comparison CA<sub>i</sub> 0.100% Zn and 0.066% Zn CA<sub>i</sub> / 0.055% Cu. There was also a synergistic effect of the samples impregnated with zinc and copper simultaneously enhancing the inhibitory activity of biofilm formation when compared to the same action of isolated metals and especially to non-impregnated activated carbon (CA<sub>ni</sub>).

**Keywords:** Activated carbon, biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, zinc and copper.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO .....  | 14 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA.....  | 15 |
| 2.1 APLICABILIDADES E TRATAMENTOS DA ÁGUA .....   | 15 |
| 2.2 CARVÃO ATIVADO .....  | 16 |
| 2.2.1 Ativação do carvão.....   | 17 |
| 2.2.2 Adsorção .....  | 19 |
| 2.2.3 Aplicações do carvão ativado.....   | 19 |
| 2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....   | 20 |
| 2.3.1 Biofilme microbiano.....  | 20 |
| 2.4 ZINCO E COBRE .....   | 22 |
| 2.4.1 Efeito antimicrobiano de metais .....   | 23 |
| 2.4.2 Carvão ativado impregnado com metais no tratamento de água.....   | 28 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL.....   | 29 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 29 |
| 4 METODOLOGIA.....  | 30 |
| 4.1 CARACTERIZAÇÕES DO CARVÃO ATIVADO .....   | 30 |
| 4.1.1 Determinação do teor de solúveis em água de carvão ativado de casca de<br>coco de dendê ( <i>Elaeis guineensis</i> ) (ASTM D 5029-98) .....   | 30 |
| 4.1.2 Determinação do teor de cinzas em carvão ativado (ASTM D 2866-94) ...   | 30 |
| 4.2 PREPARAÇÃO DO CARVÃO ATIVADO IMPREGNADO COM ZINCO E COBRE<br>.....  | 30 |
| 4.2.2 Determinação do número de iodo.....   | 31 |
| 4.2.3 Determinação da granulometria do carvão ativado de casca de coco de<br>Dendê ( <i>Elaeis guineensis</i> ) .....   | 31 |
| 4.2.4 Determinação da morfologia e composição química do Carvão ativado não<br>impregnado (CA <sub>ni</sub> ) e do Carvão ativado impregnado (CA <sub>i</sub> ) por microscopia eletrônica de<br>varredura (MEV), acoplada ao espectrômetro de energia dispersiva (EDS) ..... | 32 |
| 4.3 TESTES MICROBIOLÓGICOS .....  | 32 |
| 4.3.1 Manutenção e reativação da cepa estudada .....  | 32 |
| 4.3.2 Preparação da água desafio com <i>P. aeruginosa</i> .....   | 33 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.3.3 | Preparação dos filtros .....  | 33 |
| 4.4   | ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....   | 34 |
| 4.5   | DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE ZINCO E COBRE LIXIVIADOS EM<br>ÁGUA ATRAVÉS DE FILTROS DE CARVÃO ATIVADO IMPREGNADO. ....   | 34 |
| 5     | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 35 |
| 5.1   | CARACTERIZAÇÃO DO CARVÃO ATIVADO .....  | 35 |
| 5.1.2 | Determinação do teor de cinzas .....  | 35 |
| 5.1.3 | Determinação da concentração de zinco e cobre impregnados em carvão<br>ativado .....  | 36 |
| 5.1.4 | Determinação do número de iodo.....   | 37 |
| 5.1.6 | Determinação da morfologia e composição química do CANI e CAi por<br>microscopia eletrônica de varredura (MEV), acoplada ao espectrômetro de<br>energia dispersiva (EDS)..... | 38 |
| 5.2   | TESTES MICROBIOLÓGICOS .....  | 48 |
| 5.2.1 | Contagem de <i>P. aeruginosa</i> nas amostras de água desafio.....  | 48 |
| 5.2.2 | Formação de biofilme de <i>P. aeruginosa</i> no carvão ativado.....   | 48 |
| 5.3   | Determinação da quantidade de metais lixiviados dos filtros de carvão<br>ativado durante o processo de filtração .....  | 53 |
| 6     | CONCLUSÃO .....   | 56 |
| 7     | PERSPECTIVAS FUTURAS.....   | 57 |
| 8     | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 58 |
| 9     | ANEXOS.....   | 66 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                            |  |
|----------------------------|--|
| <b>ASTM</b>                | Sociedade Americana de Testes e Materiais                |
| <b>ATCC</b>                | <i>American Type Culture Collection</i>                  |
| <b>CAi</b>                 | Carvão ativado impregnado                                |
| <b>CAni</b>                | Carvão ativado não impregnado                            |
| <b>DNA</b>                 | Ácido desoxirribonucleico                                |
| <b>EDS</b>                 | Espectrometria de energia dispersiva                     |
| <b>MEV</b>                 | Microscopia Eletrônica de Varredura                      |
| <b>IUPAC</b>               | <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> |
| <b>ufc mL<sup>-1</sup></b> | Unidades formadoras de colônia por mililitro             |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1- Esquema de grupos funcionais presentes na superfície de carvão ativado. ....   | 17 |
| Figura 2- Esquema de ativação química do carvão com FeCl <sub>3</sub> .....  | 18 |
| Figura 3 – Esquema de formação de biofilmes microbianos em superfície. ....  | 22 |
| Figura 4- Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) de <i>Escherichia coli</i> : a- sem tratamento e b- tratadas com soluções contendo íons prata. ....        | 24 |
| Figura 5- Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) de <i>Staphylococcus aureus</i> : a- sem tratamento com íons prata e b- com tratamento de íons prata. .... | 24 |
| Figura 6 - Atividade antifúngica de nanopartículas de zinco em <i>Penicillium sp</i> utilizando a técnica de difusão em disco. ....  | 25 |
| Figura 7- Esquema do efeito antimicrobiano de nano partículas de metais. ....  | 27 |
| Figura 8 - Danos ao DNA de micro-organismos por espécies reativas de oxigênio. .   | 27 |
| Figura 9 - Imagem da filtração da suspensão microbiana em filtros de leito fixo de carvão ativado impregnados com zinco/cobre. ....  | 33 |
| Figura 10- Imagem de carvão ativado de casca de coco <i>Elaeis guineensis</i> obtidas por MEV magnificação 120x (I) e 1000x (II). ....   | 39 |
| Figura 11- Espectros de EDS referentes aos pontos 1 (I) e 2 (II) da amostra de carvão ativado não impregnado. ....   | 40 |
| Figura 12- Imagem magnificação 1000x do carvão ativado impregnado com 0,1% de zinco. ....  | 41 |
| Figura 13- Espectros de EDS referentes aos pontos 1 (I) e 2 (II) da amostra de carvão ativado impregnado com 0,100% de zinco. ....   | 41 |
| Figura 14- Imagem magnificação 1000x do carvão ativado impregnado com 0,132% de cobre. ....  | 42 |
| Figura 15- Espectros de EDS referentes aos pontos 1 (I) e 2 (II) da amostra de carvão ativado impregnado com 0,132% de cobre. ....   | 42 |
| Figura 16- Imagens magnificação 1000x do carvão ativado impregnado com 0,066% de zinco e 0,055% de cobre (I) e (II). ....  | 43 |
| Figura 17- Espectros de EDS referentes aos pontos 1 (I) e 2 (II) da amostra de carvão ativado impregnado com 0,066% de zinco e 0,055% de cobre. ....                                 | 44 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 18 - Imagem magnificação 1000x do carvão ativado impregnado com 0,041% de zinco e 0,101% de cobre.....  | 45 |
| Figura 19- Espectros de EDS referentes aos pontos 1 (I), 2 (II), 3 (III) e 4 (IV) da amostra de carvão ativado impregnado com 0,041% de zinco e 0,101 de cobre. .... | 45 |
| Figura 20 - Imagem magnificação 1000x do carvão ativado impregnado com 0,062% de zinco e 0,092% de cobre.....  | 46 |
| Figura 21- Espectros de EDS referentes aos pontos 1 (I), 2 (II), 3 (III) e 4 (IV) do carvão ativado impregnado com 0,062% de zinco e 0,092% de cobre.....            | 47 |
| Figura 22 - Inibição na formação de biofilme microbiano para CAni e carvão ativado impregnado com zinco e cobre. ....  | 52 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 - Tipos e diâmetros dos poros do carvão ativado (SING et al., 1985).....  | 18 |
| Tabela 2: Preparação de soluções de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ para impregnação no carvão ativado .....   | 30 |
| Tabela 3 - Determinação da porcentagem de metais impregnados no carvão ativado por espectrofotometria de absorção atômica. ....  | 36 |
| Tabela 4 - Superfície do carvão ativado detectada pela técnica da massa de iodo adsorvida.....   | 37 |
| Tabela 5 – Determinação do inóculo ajustado de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 nas amostras de água desafio. ....   | 48 |
| Tabela 6 – Quantificação de células viáveis de <i>P. aeruginosa</i> associadas a biofilmes formados na superfície de carvão ativado não impregnado (CA <sub>ni</sub> ). .... | 49 |
| Tabela 7 – Comparação do desenvolvimento de biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na superfície do CA <sub>ni</sub> e do CA <sub>i</sub> . ....                          | 50 |
| Tabela 8- Teor de metais lixiviados do carvão ativado no processo de filtração da água destilada. ....   | 53 |
| Tabela 9 – Teor de metais lixiviados do carvão ativado durante a filtração seriada de água destilada .....   | 54 |

## 1 INTRODUÇÃO

Diversas tecnologias são estudadas para o tratamento de água, tais como: resinas de troca-iônica (ZHANG et al., 2015), membranas de osmose reversa (EMADZADEH et al., 2015), carvão ativado (LI et al., 2015), entre outras.

O carvão ativado é utilizado como meio filtrante em filtros de água domésticos, por possuir elevado potencial de adsorção de impurezas, que se deve a sua elevada porosidade e área superficial (PARK et al., 1997). Porém, na filtração da água, micro-organismos e matéria orgânica podem se alojar facilmente nessa estrutura porosa do carvão ativado. Estes micro-organismos consomem a matéria orgânica do meio e secretam polissacarídeos, formando-se assim biofilmes microbianos na superfície do carvão ativado, podendo assim contaminar a água filtrada durante a filtração (GIBERT et al., 2013).

*Pseudomonas aeruginosa* são bactérias Gram negativas que podem causar diversos tipos de infecções e até mesmo a morte de pacientes imunocomprometidos (JEONG et al., 2014). Estas bactérias são capazes de formar biofilmes microbianos e necessitam de pequenas quantidades de nutrientes para sobreviverem. Os biofilmes microbianos propiciam proteção contra variações de temperatura, pH, agentes antimicrobianos e demais tipos de estresses (ALHEDE et al., 2014).

Metais são utilizados como agentes antimicrobianos em diversas aplicações (LEMIRE; HARRISON; RAYMOND, 2013). Apesar de alguns metais estando em baixas concentrações participarem de reações em sistemas biológicos, quando estão em concentrações maiores, são tóxicos e provocam a inibição de processos biológicos nas células. Carvão ativado impregnado com prata está sendo empregado comercialmente, pois possui efeito antimicrobiano. Zinco e cobre são metais menos nobres que a prata e também possuem efeito antimicrobiano (RAMAN et al., 2013).

Na formação de biofilmes microbianos em filtros de carvão ativado, pode ocorrer a saturação prematura do carvão ativado e acarretar a contaminação da água filtrada (SILVA et al., 2006), contudo, propõe-se neste estudo avaliar a inibição da formação de biofilmes microbianos na superfície do carvão ativado impregnado com zinco e cobre.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Aplicabilidades e tratamentos da água

A água apresenta aplicações em praticamente todos os setores da economia, tais como: indústrias têxteis (VALH et al., 2011), alimentícias (CASSANI; KNOCHEL, 2002), farmacêuticas (KEYASHIAN, 2014), agricultura (TIAN et al., 2015), entre outros. Dependendo destas aplicações são requeridas técnicas mais refinadas para o tratamento da água, como para indústria farmacêutica, podem ser aplicadas técnicas como osmose reversa (BELKACEM et al., 2008) e resinas de troca iônica (MAHORE et al., 2010). Na indústria de alimentos, podem ser aplicadas técnicas como filtração por membrana (WINKLER et al.; 2005) para remoção de contaminantes indesejáveis da água que interferem na obtenção do produto final.

A água destinada ao consumo humano deve se enquadrar em padrões de potabilidade, de acordo com a Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde.

Nas estações de tratamento convencional de água, existem processos pelos quais a água é submetida para chegar às residências da população, estes processos são: gradeamento, coagulação, floculação, decantação, filtração, cloração e fluoretação (CHEN et al., 2007).

As etapas de coagulação e floculação possuem a finalidade de aglomerar impurezas contidas na água, cuja maior parte consiste em matéria orgânica, coloides e demais impurezas que apresentam cargas e mantêm-se repelidas entre si (TRINH; KANG, 2011).

No tratamento convencional de água, o uso de oxidantes clorados (gás cloro e hipoclorito de sódio) na desinfecção de água pode causar a formação de subprodutos através de reações destes agentes desinfectantes e de matéria orgânica presente na água, formando compostos organoclorados nocivos à saúde (MILLER et al., 1993).

A água ao ser contaminada por determinados tipos de esgotos como: industriais, urbanos e hospitalares não tratados, ou inadequadamente tratados, torna-se veículo para uma série de contaminantes. Entre estes contaminantes têm-se bactérias, tais como cianobactérias, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*,

a qual possui versatilidade de persistir em ambientes adversos, adquirindo resistência (FUENTEFRÍA et al., 2008). Há também contaminantes como protozoários: *Giardia* (CARMENA et al., 2012), *Cryptosporidium* (RIETVELD et al., 2009) que podem acarretar doenças no trato intestinal humano.

Filtros domésticos devem ser utilizados com água tratada que obedeça os padrões de potabilidade presentes na Portaria nº 2914 de 2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011). Assim, são usados em residências para remover o cloro residual e substâncias orgânicas que causam gosto e mau odor na água tratada que porventura contaminaram a água entre a Estação de Tratamento de Água (ETA) e as torneiras das residências (WALLIS; STAGG; MELNICK, 1974).

## 2.2 CARVÃO ATIVADO

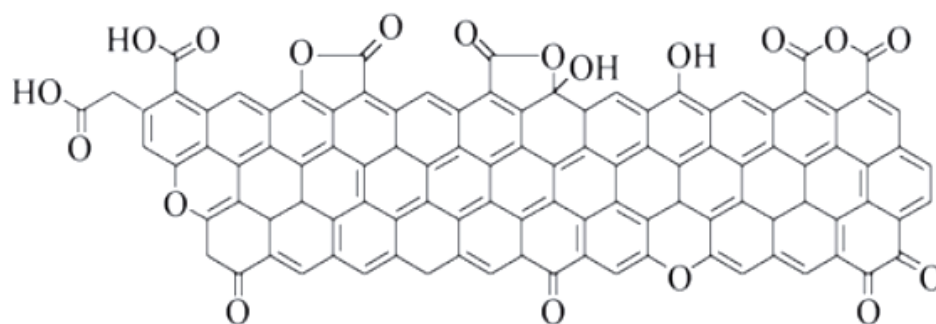
A produção do carvão ativado consiste na decomposição térmica de matérias-primas que possuem elevados teores de carbono, tais como: bambu (VELÁZQUEZ-TRUJILLO et al., 2010), cascas de porca-de-pistache (YANG; LIAO, 2003), sementes de uva (OKMANA et al., 2014), entre outros materiais de resíduos agrícolas, que visam minimizar o custo de sua produção e que diminuam danos causados ao meio ambiente. Esta primeira etapa do processo é denominada pirólise ou carbonização.

O material carbonáceo é submetido a elevadas temperaturas, podendo variar de 500°C a 800°C (NOWICKI et al., 2015), em baixas concentrações de oxigênio e atmosfera inerte.

Na pirólise são formados os poros primitivos na estrutura do carvão, o que lhe confere pequena área superficial, na ordem de dezenas de m<sup>2</sup>/g. Na primeira etapa deste processo são liberadas as substâncias voláteis contidas na matéria-prima e, posteriormente, ocorre a diminuição de massa deste material. Este processo de decomposição térmica é controlado, para que não haja a perda dos poros formados no carvão (SHOAIIB; AL-SWAIDAN, 2015).

O carvão constitui-se basicamente de carbono formando estruturas gráficas. A superfície do carvão ativado contém grupos funcionais oxigenados, tais como álcoois, fenóis e ácidos carboxílicos (OZDEMIR et al., 2014), conforme mostra a Figura 1. A quantidade e os tipos de grupos funcionais dependem do tipo de ativação (NOWICKI et al., 2015).

Figura 1- Esquema de grupos funcionais presentes na superfície de carvão ativado.



Fonte: Adaptado de NA et al., 2012

### 2.2.1 Ativação do carvão

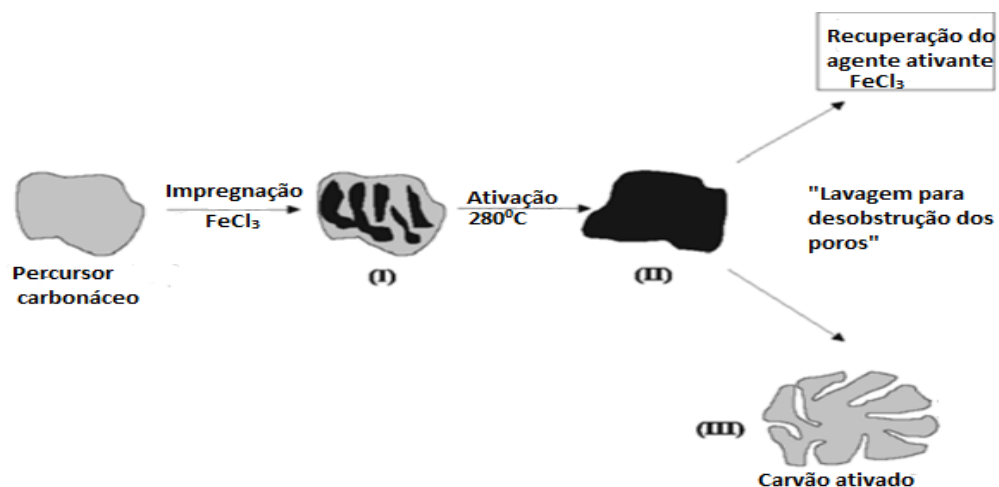
A ativação consiste em aumentar a porosidade do carvão e, conseqüentemente, sua área superficial. Nesta etapa, ocorrem perdas de massa do material precursor, com o aumento da temperatura e tempo de ativação, a perda de massa é aumentada (SCHETTINO Jr, 2004).

Conforme o processo de ativação do carvão, podem ocorrer variações em sua porosidade. A ativação do carvão pode ser dada através de dois processos: a ativação química e a física.

A ativação química pode ser dada a partir de ácidos ou bases, tais como: carbonato de potássio, hidróxido de potássio (OKMAN et al., 2014), cloreto de zinco (OZDEMIR et al., 2014), ácido fosfórico (ROCKSTRAW; GUO, 2007), cloreto férrico (PEREIRA et al., 2008) ilustrado na Figura 2.

Estes ácidos, bases e sais são responsáveis pela desidratação da matéria-prima carbonácea, a qual é impregnada com estes agentes desidratantes e submetidos a temperaturas que podem variar de 280°C a 800°C (PEREIRA et al., 2008), (OKMAN et al., 2014), (SAKA, 2012), (YORGUN, YILDIZ; 2015). No final do processo, os agentes químicos são removidos do carvão ativado através de lavagem.

Figura 2- Esquema de ativação química do carvão com FeCl<sub>3</sub>.



Fonte: Adaptado de PEREIRA et al., 2008

Na ativação física são utilizados gases oxidantes tais como CO<sub>2</sub> (SHOAIB; AL-SWAIDAN, 2015) e vapor de água (SOUSA et al., 1994), podendo-se empregar temperaturas de 450°C, 550°C e 650°C durante o processo (VELÁZQUEZ-TRUJILLO et al., 2010). A ativação física é ecologicamente adequada, quando comparada à ativação química, pois no processo químico são utilizadas substâncias que cujos resíduos podem gerar impactos ao meio ambiente (SHOAIB, AL-SWAIDAN; 2015).

Os carvões ativados podem ser classificados quanto à porosidade: microporosidade, mesoporosidade e microporosidade, conforme o tamanho dos poros (Tabela 1).

Tabela 1 - Tipos e diâmetros dos poros do carvão ativado (SING et al., 1985).

| Tipos de porosidade do carvão ativado | Diâmetros dos poros do carvão ativado |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Macroporos                            | > 50 nm                               |
| Mesoporos                             | 2 nm ≤ e ≤ 50 nm                      |
| Microporos secundários                | 0,8 nm ≤ e ≤ 2 nm                     |
| Microporos primários                  | < 0,8 nm                              |

Materiais que possuem maior dureza abrasiva, por serem constituídos por elevadas quantidades de lignina em sua estrutura e materiais que possuem

acentuada rigidez, tais como: casca de coco são mais aplicáveis, pois o carvão ativado proveniente destes materiais apresenta maior resistência mecânica (índice de abrasão) (HENDRICK, 2006).

### **2.2.2 Adsorção**

Materiais adsorventes são, em geral, sólidos que possuem elevadas áreas superficiais. Adsorbatos são componentes que se concentram na superfície destes adsorventes. O carvão ativado possui propriedade adsortiva devido à sua elevada área superficial, em torno de 1000 m<sup>2</sup>/g (SHOAIB; AL-SWAIDAN, 2015). As interações que ocorrem na superfície do carvão ativado podem ser físicas (fisissorção) ou químicas (quimissorção). As interações físicas são do tipo Van der Waals, não ocorrem alterações na natureza química das espécies adsorvente e adsorvato (MAURIN, 2014). Na adsorção química ocorrem ligações químicas covalentes e interações eletrostáticas entre o adsorvente e o adsorvato, pois as moléculas na superfície do adsorvente reagem com moléculas do adsorvato, muitas vezes essas interações são irreversíveis e a superfície do material adsorvente e o adsorvato são alterados (CHEN et al., 2007).

Características como tamanho e distribuição dos poros, área superficial, teor de cinzas, teor de impurezas contidas no carvão ativado, influenciam sua capacidade adsortiva. As impurezas adsorvidas obstruem os poros, diminuindo sua área superficial, além de causar a repulsão de adsorvatos (ISHIZAKI; MARTY, 1981).

### **2.2.3 Aplicabilidades do carvão ativado**

Devido à sua elevada área superficial e alto poder de adsorção (LI et al., 2002), o carvão ativado possui diversas aplicabilidades, tais como: suporte para catalisadores (LIAKAKOU et al., 2015), agente descolorante (TIAN et al., 2015), na remoção de metais pesados em efluentes (BACCAR et al., 2009). É comumente utilizado como meio filtrante em filtros de água domésticos. É um material hidrofóbico capaz de adsorver substâncias orgânicas e micro-organismos presentes na água. Através de quimissorção, o cloro residual utilizado para desinfecção da água em estações de tratamento, é removido (MARTIN; SCHACKLETON, 1990).

## **2.3 *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo aeróbio Gram negativo produtor de pigmentos fluorescentes denominados piocianina e a pioverdina, que permitem sua identificação (SHARMA et al., 2013). A temperatura ótima para seu crescimento é cerca de 37°C (GAVINHO, 2011). Estas bactérias são capazes de se proliferar em baixas quantidades de nutrientes e de se adaptar facilmente a alterações no ambiente, como a temperatura (CHERIA et al., 2012), por exemplo, são capazes de resistir a temperaturas de 60°C a 70°C. No entanto, em cerca de 30 minutos, estas células são inativadas nesta faixa de temperatura (TSUJI et al., 1982).

A contaminação por esta bactéria pode causar infecções no trato urinário (SABHARWAL; CHHIBBER; HARJAI, 2014), conjuntivite e pneumonia em pacientes imunocomprometidos (BRITO et al., 2003), endoftalmite (PRIYA et al., 2015).

Devido ao uso indiscriminado de agentes antimicrobianos, antissépticos e desinfetantes, cepas de *P. aeruginosa* têm adquirido resistência. Este fato dificulta o tratamento e o controle de infecções causadas por estes micro-organismos, além disso, a formação de biofilme dificulta sua erradicação em diversos ambientes (STRATCHOUNSKIL et al., 1998).

### **2.3.1 Biofilme microbiano**

O biofilme microbiano é um aglomerado de células bacterianas unidas e aderidas a uma superfície sólida e úmida através de uma matriz composta de polissacarídeos sintetizados por elas mesmas. Organizadas nestas estruturas, as células encontram proteção em ambientes hostis ao seu crescimento (RENNER; WEIBEL, 2011).

Estas comunidades possuem canais que permitem o fluxo de nutrientes proporcionando a proteção destes micro-organismos a diversos tipos de estresses, como: variações de temperatura, pH, agentes antimicrobianos, radiação ultravioleta, entre outros, a matriz polissacarídica também é capaz de sequestrar toxinas em sua estrutura (COSTERTON et al., 1999).

Estes biofilmes podem ou não incluir micro-organismos de outros filos. Os exopolissacarídeos determinam a estrutura tridimensional do biofilme microbiano e quanto maior a quantidade destas substâncias poliméricas extracelulares, maior é a adesão destes biofilmes nestas superfícies (TSUNEDA et al., 2003).

Biofilmes microbianos podem ser formados em superfícies internas de tubulações em estações de distribuição de água (BOE- HANSEN et al., 2002), podem também ser formados na estrutura porosa de carvões ativados que são utilizados como filtros de água, comprometendo a qualidade da água potável (GIBERT et al., 2013).

A etapa inicial da formação de um biofilme inicia-se com a adesão de colonizadores primários em uma superfície biótica ou abiótica que contenha matéria orgânica e umidade, ocorrendo primeiramente interações do tipo Van der Waals entre a superfície de fixação e o colonizador inicial (GU, 2014).

A fixação irreversível de bactérias Gram-negativas à superfície ocorre, aproximadamente duas horas após a adesão inicial em que há a formação de micro colônias. Estas micro colônias correspondem a um amontoado de células unidas e aderidas entre si, em determinada superfície. Nesta etapa, a morte dos micro-organismos é cessada (BOARI, 2008).

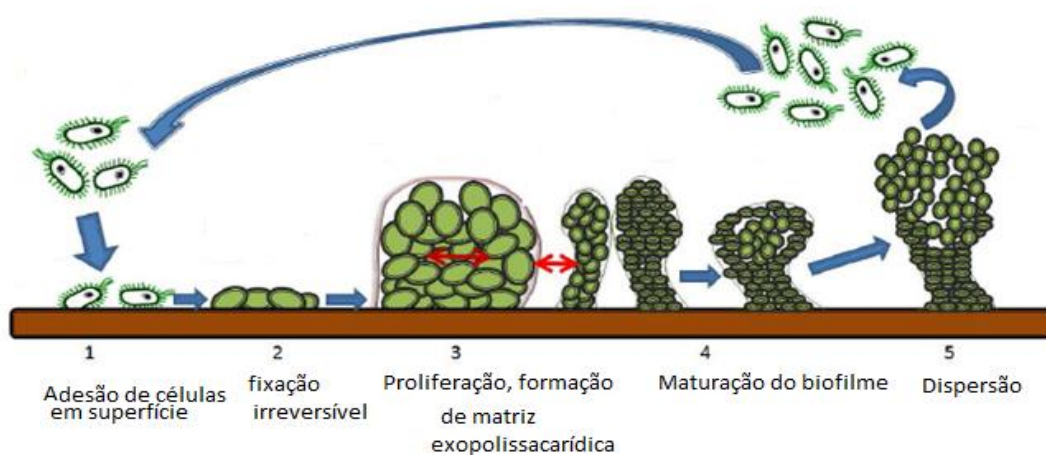
As células que se apresentam aderidas às superfícies são definidas como sésseis, enquanto aquelas que estão livres e dispersas na fase aquosa são definidas como planctônicas. Os colonizadores primários se desenvolvem formando pequenas colônias que passam a sintetizar uma matriz exopolissacarídica que atua como substrato, auxiliando a aderência de outros micro-organismos, denominados colonizadores secundários em sua estrutura (DUNNE JUNIOR, 2002).

Durante o processo de maturação do biofilme, há um aumento pronunciado na quantidade de micro-organismos e materiais polissacarídicos secretados, sendo aumentada a espessura do biofilme (HEYDORN et al., 2000).

A estrutura interna dos biofilmes torna-se um ambiente anaeróbio, no qual ocorre um aumento na quantidade de gases liberados pelos micro-organismos, e o subsequente enfraquecimento da sua estrutura propicia despreendimento de algumas células. A dispersão destas células é a última etapa da formação do ciclo do biofilme,

permitindo ao micro-organismo voltar à sua forma planctônica (SAUER et al., 2002). As etapas da formação de biofilme estão representadas na Figura 3.

Figura 3 – Esquema de formação de biofilmes microbianos em superfície.



**Fonte:** Adaptado de MIZAN et al., 2015.

A formação de biofilmes microbianos deve ser controlada a partir do nível bacteriológico, pois estes biofilmes são suficientemente resistentes a diversos agentes antimicrobianos. Contudo, entre outros agentes antimicrobianos, os metais podem ser aplicados para a inibição da formação de biofilmes microbianos (SINGH; WELSH; GREENBERG, 2013).

## 2.4 ZINCO E COBRE

O cobre é um elemento essencial a nível de traço na ingestão humana, pois está presente no organismo em órgãos responsáveis por importantes atividades metabólicas, como os rins e o fígado, assim como está presente em diversas proteínas e enzimas. A citocromo C oxidase é uma enzima encontrada na mitocôndria, contém quatro centros metálicos redox ativos que contém cobre, atuam como carreadores de elétrons, em que é formado um gradiente eletroquímico

através da membrana e cada molécula de O<sub>2</sub> é convertida em duas moléculas de água durante o processo de respiração (POYTON; MC EWEN, 1996).

No organismo humano o zinco está presente em diversas funções, e sua ausência pode ser manifestada através do retardo do crescimento em crianças (SANDSTEAD et al., 1998), pode causar o impedimento da realização de funções endócrinas (SANDSTEAD, 2013), alterações neurossensoriais. O zinco desempenha diversas funções biológicas no organismo humano como o metabolismo de carboidratos e lipídeos, possui ampla atividade enzimática, sendo que várias enzimas dependem do zinco para realizarem suas funções.

De acordo com o padrão de potabilidade da Portaria 2914/2011 a quantidade máxima de cobre na água potável deve ser de 2 mgL<sup>-1</sup> e o Padrão organoléptico de Potabilidade para o teor de zinco na água potável é de 5 mgL<sup>-1</sup> (BRASIL, 2011).

#### **2.4.1 Efeito antimicrobiano de metais**

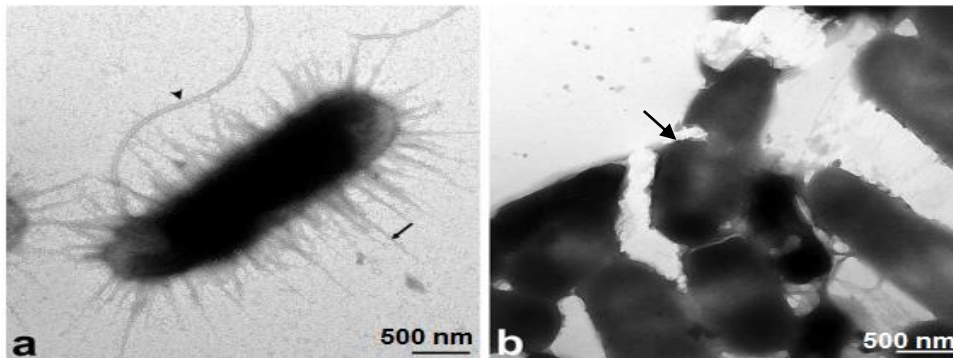
Metais como zinco, cobre, prata, titânio e cobalto possuem ação antimicrobiana mesmo em pequenas concentrações. Tal ação denominada como desinfecção oligodinâmica, devido à capacidade de inativar micro-organismos. As propriedades oligodinâmicas dos metais encontram-se nas classes: bactericidas, microbicidas e viricidas (SAVAGE et al., 2009). Estudos voltados para os efeitos antimicrobianos de metais são lentos, devida diversidade das funções metabólicas em micro-organismos.

Dentre os metais que possuem efeito antimicrobiano, a prata é o metal que possui maior efeito inibitório do crescimento bacteriano. Estudos para avaliação dos mecanismos causados pela prata em sua forma metálica para inibição do crescimento microbiano ainda estão sendo investigados. Para íons prata, portanto, tem-se que podem interagir com ácidos nucleicos do DNA em micro-organismos formando complexos, provocando a desnaturação do DNA e conseqüentemente, a morte celular (JUNG et al., 2008).

Jung et al. (2008) trataram a bactéria Gram negativa *Escherichia coli* com soluções contendo íons prata e evidenciaram que as bactérias foram danificadas e que houve a ruptura da membrana celular destes micro-organismos. Sendo

representada em “a” a bactéria sem tratamento e em “b” a bactéria com tratamento (Figura 4).

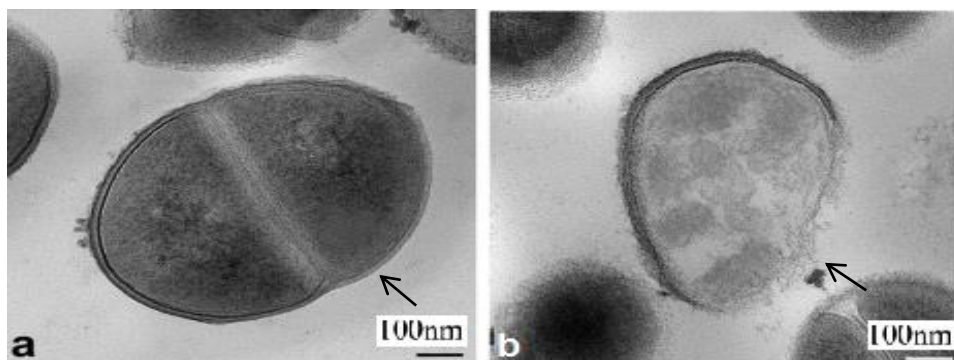
Figura 4- Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) de *Escherichia coli*: **a**- sem tratamento e **b**- tratadas com soluções contendo íons prata.



Fonte: Adaptado de Jung et al., 2008.

Jung et al. (2008) também verificaram a inativação *Staphylococcus aureus* através de tratamento com íons prata, que provocaram a degradação da parede celular deste micro-organismo. Conforme observado na Figura 5, a imagem obtida por microscopia eletrônica de transmitância (MET), em que “A” célula sem tratamento, em que a parede celular apresenta-se intacta e “B” célula com tratamento com íons prata, em que a parede celular apresenta-se degradada.

Figura 5- Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) de *Staphylococcus aureus*: **a**- sem tratamento com íons prata e **b**- com tratamento de íons prata.



Fonte: Adaptado de Jung et al., 2008.

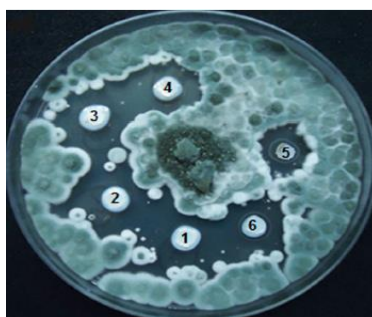
Gordon et al. (2010) avaliaram a inativação de proteínas de *Staphylococcus epidermidis* após sua exposição com íons prata, propuseram também a interação destes íons prata com grupo tiol, promovendo a atividade antimicrobiana.

Amirulhusni et al. (2012) realizaram ensaios microbiológicos com nanopartículas de prata em *Pseudomonas aeruginosa* pelo método de micro diluição e verificaram concentrações mínimas bactericidas de 100µg/mL e 200µg/mL, em intervalos de tempos de exposição de 0 a 4h, sendo observado efeito bactericida para este micro-organismo nestas concentrações.

Zeólitas modificadas com zinco e cobre (MALACHOVÁ et al., 2011) e nanopartículas de óxidos destes metais (SWAIN et al., 2014) têm sido utilizados para diversas finalidades de desinfecção, devido ao efeito antimicrobiano e antifúngico destes metais.

Swain et al. (2014) avaliaram o efeito antifúngico de diferentes concentrações de nanopartículas de zinco e óxido de zinco, sendo: 1- Zn (5,0 mg/mL); 2- Zn (2,5 mg/mL); 3- ZnO (5,0 mg/mL); 4- ZnO (2,5 mg/mL); 5- ZnO (2,5 mg/mL); 6- ZnO (5,0 mg/mL) e para tamanhos distintos destas nanopartículas, sendo: 1 e 2 Zn (comercial) <50 nm; 3 e 4 ZnO (sintetizado) 122,4 nm; 5 e 6 ZnO (comercial) < 35 nm. Em *Penicillium sp*, pela técnica de difusão em disco (Figura 6).

Figura 6 - Atividade antifúngica de nanopartículas de zinco em *Penicillium sp* utilizando a técnica de difusão em disco.



Fonte: (Swain et al., 2014).

Sendo o efeito inibitório do crescimento de *Penicillium* verificado em meio de cultura sólido e sete dias de inoculação pela formação de zonas de inibição em torno

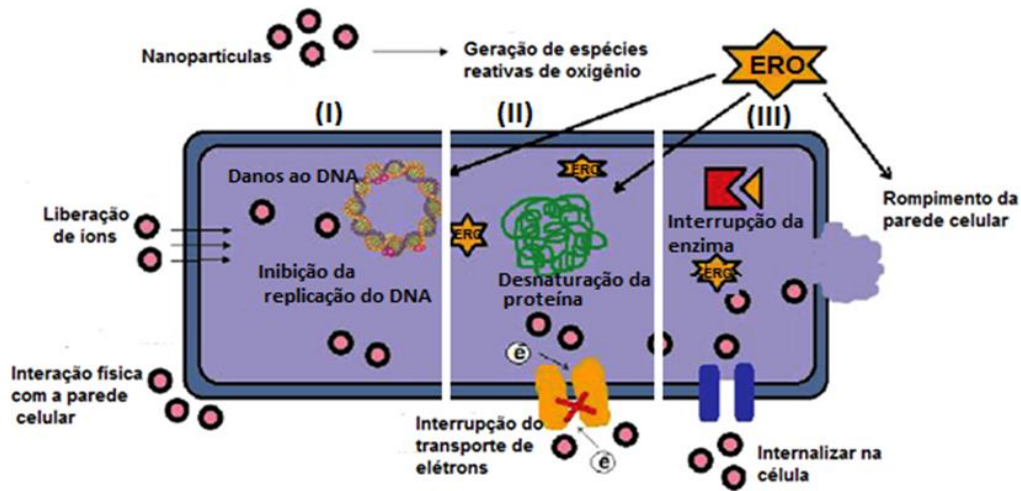
das amostras com diferentes concentrações e tamanhos de nanopartículas de zinco e óxido de zinco, conforme é mostrado na Figura 6.

Verificaram que a eficiência das nanopartículas na inibição do crescimento do *Penicillium sp* é aumentada com o aumento na dosagem destas nanopartículas, o que lhe confere um efeito de dose dependente. A eficiência também é aumentada com o tempo de exposição dos micro-organismos a estas nanopartículas. A variação da área superficial das nanopartículas de ZnO sintetizadas também contribuiu para a eficiência antimicrobiana.

Devido às propriedades físicas e químicas dos metais em promover ligações com biomoléculas nas células, o crescimento celular e os processos que conduzem a este crescimento são interrompidos. Espécies de metais podem participar de reações discretas nestas células, perturbando funções da membrana, inibindo atividades enzimáticas e causando danos ao DNA, quando se apresentam em doses excessivas (DIZAJ et al., 2014).

Nanopartículas de metais como a prata podem formar espécies reativas de oxigênio (ERO) na célula. O aumento dos níveis destas espécies reativas de oxigênio além da capacidade de tamponamento pode acarretar estresse oxidativo potencialmente citotóxico, causando danos ao DNA, como a inibição de sua replicação (I); desnaturação de proteínas, interrupção do transporte de elétrons na cadeia transportadora de elétrons (II); pode ocorrer a interrupção de algumas enzimas e o rompimento da parede celular bacteriana (III), com isso, ocorre a morte celular (DIZAJ et al., 2014). Conforme demonstrado no esquema da Figura 7.

Figura 7- Esquema do efeito antimicrobiano de nano partículas de metais.

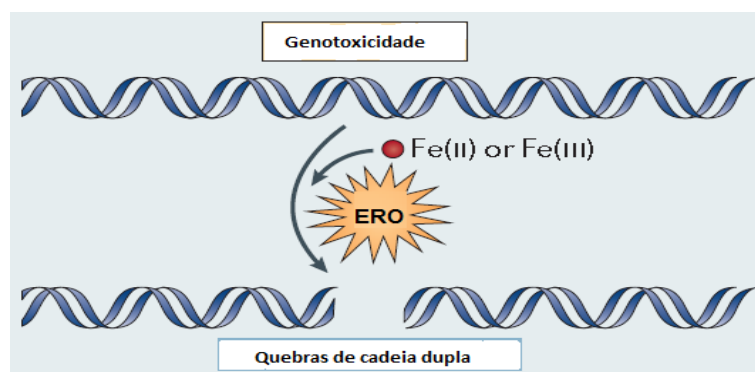


Fonte: Adaptado de (DIZAJ et al., 2014).

A inibição do crescimento e morte celular por metais se devem à combinação de mecanismos distintos, conforme as propriedades químicas do metal, os mecanismos de toxicidade podem variar (LEMIRE et al., 2013).

Doses tóxicas de íons metálicos como Fe (II) e Cu (II), causam estresse oxidativo em micro-organismos, que consiste na produção excessiva de radicais livres e diminuição de defesas de agentes antioxidantes nestas células. Estes íons reduzem espécies de oxigênio, formando espécies reativas de oxigênio (ERO), que promovem danos ao DNA (RANDERATH et al., 1991), conforme demonstrado na Figura 8.

Figura 8 - Danos ao DNA de micro-organismos por espécies reativas de oxigênio.



Fonte: Adaptado de Lemire et al., 2013.

#### **2.4.2 Carvão ativado impregnado com metais no tratamento de água**

KENNEDY et al. (2008) avaliaram o efeito antimicrobiano de carvão ativado impregnado com cobre e verificaram efetiva diminuição dos micro-organismos e evidenciaram através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão, a ruptura da parede celular dos patogênicos aplicados: *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, and *Salmonella typhi*.

Para tratamento de água está sendo empregado comercialmente carvão ativado impregnado com prata em teores de 0,5% pela Calgon Carbon®. Metais menos nobres que a prata como zinco e cobre também possuem atividade antimicrobiana, do mesmo modo, podem ser aplicados no tratamento de água, visando a inibição da formação de biofilmes microbianos na superfície do carvão ativado.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do carvão ativado impregnado com diferentes concentrações de zinco e cobre na formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* em meio filtrante de leito fixo.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar os carvões ativados, por meio da avaliação da porosidade, da determinação do número de iodo, teor de solúveis, cinzas e granulometria.
- Avaliar a concentração dos metais impregnados no carvão ativado pela técnica de espectroscopia de absorção atômica.
- Avaliar a morfologia e composição elementar do carvão ativado impregnado com zinco e cobre e não impregnado, pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplada ao espectrofotômetro de energia dispersiva (EDS).
- Estudar a formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* em meio filtrante de leito fixo de carvão ativado.
- Avaliar o efeito do carvão ativado impregnado com diferentes concentrações de zinco e cobre na formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa*.
- Quantificar metais lixiviados do carvão ativado após a filtração de água destilada em filtros-teste.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 CARACTERIZAÇÕES DO CARVÃO ATIVADO

#### 4.1.1 Determinação do teor de solúveis em água de carvão ativado de casca de coco de dendê (*Elaeis guineensis*) (ASTM D 5029-98)

Foram pesados 10,00g de carvão ativado e adicionados a um balão de fundo redondo, juntamente com 100mL de água deionizada, e colocados sob refluxo durante 15min. Após este tempo, 25mL da água mãe foram colocados em cápsula de porcelana, que foi aquecida a 150°C até a secura. A cápsula foi resfriada e pesada (ASTM D 5029-98).

#### 4.1.2 Determinação do teor de cinzas em carvão ativado (ASTM D 2866-94)

O carvão ativado de casca de coco de dendê foi fornecido pela empresa Bahiacarbon Agro Industrial Ltda localizada em Valença-BA. Para a determinação do teor de cinzas do carvão ativado, foram lavadas amostras de 2,5511g, 2,6041g e 2,4684g deste carvão, secadas, pesadas, colocadas em mufla a 550°C por 24h, arrefeceu-se e pesou-se. Conforme o método ASTM D 2866-94.

### 4.2 PREPARAÇÃO DO CARVÃO ATIVADO IMPREGNADO COM ZINCO E COBRE

Soluções estoque de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  foram preparadas, alíquotas foram retiradas e diluídas, conforme descrito na Tabela 2, a fim de se obter teores em massa de zinco e cobre de 0,05% e 0,1%.

Tabela 2: Preparação de soluções de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  e  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  para impregnação no carvão ativado

| Solução estoque  | Alíquota retirada (mL) | Concentração obtida com diluição para 50 mL (g/mL) | Teor em massa de metais em 25 g de carvão ativado |
|--|------------------------|--|---|
| $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$<br>( $5,0 \times 10^{-3}$ g/mL) | 19,00                  | $1,900 \times 10^{-3}$                             | 0,10% Cu  |
|  | 9,50                   | $9,503 \times 10^{-4}$                             | 0,05% Cu  |
| $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$<br>( $5,0 \times 10^{-3}$ g/mL) | 22,73                  | $2,273 \times 10^{-3}$                             | 0,10% Zn  |
|  | 11,37                  | $1,137 \times 10^{-3}$                             | 0,05% Zn  |

Em cinco cápsulas de porcelana foram adicionados 25g de carvão ativado (cada) e 50mL das soluções de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  e 50mL das soluções de  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , previamente preparadas em diferentes proporções (0,10% Zn; 0,10% Cu; 0,10% Zn / 0,05% Cu; 0,05% Zn / 0,10% Cu; 0,10% Zn / 0,10% Cu).

Após a adição destas soluções ao carvão ativado, submeteu-se a aquecimento e agitação em banho de areia, para que as paredes da cápsula fossem aquecidas uniformemente até secura. Estes carvões foram transferidos para cadinhos e colocados em mufla a  $550^\circ\text{C}$  por 2h.

#### **4.2.1 Determinação da concentração de zinco e cobre impregnados no carvão ativado.**

Em um ensaio padrão, 0,100 g de amostra de carvão ativado impregnado foi colocado em um béquer e adicionados 10mL de ácido nítrico 65% PA, aqueceu-se até a fervura por 10 minutos em capela de exaustão, posteriormente, a mistura foi filtrada e lavada com água deionizada até atingir 100mL (recolhida em balão volumétrico). As concentrações de zinco e cobre impregnados foram determinadas em um espectrofotômetro de absorção atômica *AAAnalyst 400* da Perkin Elmer, na Universidade Estadual de Goiás.

#### **4.2.2 Determinação do número de iodo**

Foram preparadas e padronizadas soluções de tiosulfato de sódio (0,100 N), solução de iodo padrão (0,100N) e solução de iodato de potássio (0,100 N). Em um Erlenmeyer, foram adicionados 20mL de solução de iodo e 1,000g de carvão ativado (com e sem zinco e cobre impregnados) sob agitação branda, foram titulados com solução de tiosulfato de sódio e realizada em duplicata para cada amostra, de acordo com a norma (ASTM D 4607-94).

#### **4.2.3 Determinação da granulometria do carvão ativado de casca de coco de Dendê (*Elaeis guineensis*)**

A determinação da granulometria do carvão ativado de casca de coco de Dendê foi realizada de acordo com a norma ASTM D 2862-97. Em que foram pesados 100g deste carvão ativado e utilizadas peneiras de 20, 36, 40 e 50 mesh.

Foram pesadas as quantidades de carvão ativado que ficaram retidas entre estas peneiras.

#### **4.2.4 Determinação da morfologia e composição química do Carvão ativado não impregnado (CA<sub>ni</sub>) e do Carvão ativado impregnado (CA<sub>i</sub>) por microscopia eletrônica de varredura (MEV), acoplada ao espectrômetro de energia dispersiva (EDS)**

Microscopia eletrônica de varredura acoplada ao espectrômetro de energia dispersiva foi empregada neste trabalho em amostras de carvão ativado impregnadas com zinco e cobre. Estas amostras foram suportadas sobre uma fita de carbono e colocadas em suporte de alumínio e analisadas no SEM Jeol JSM-6610, equipado com EDS, Thermo Scientific NSS Spectral Imaging e tensão de aceleração 10,0 kV. As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução na Universidade Federal de Goiás.

### **4.3 TESTES MICROBIOLÓGICOS**

#### **4.3.1 Manutenção e reativação da cepa estudada**

Para a realização dos ensaios foi utilizada a bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, proveniente da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia (UEG/Anápolis).

As cepas foram repicadas em meio de cultura sólido ágar cetrimida, pela técnica de esgotamento por estriação e as placas foram incubadas a 35°C por 24h. Cerca de 5 colônias isoladas e típicas foram transferidas para um tubo com 15mL de caldo nutriente, com acréscimo de 20% de glicerol, e posteriormente foram homogeneizadas em agitador de tubos (vórtex), após este procedimento os tubos foram incubados por 12h a 35°C. Em seguida, foram transferidas alíquotas de 1mL para microtubos tipo Eppendorf, previamente esterilizados e devidamente rotulados. Estas alíquotas foram armazenadas a 8°C por sete dias e congeladas em freezer a -20°C.

As cepas foram reativadas em ágar cetrimida a 35°C por 24h em estufa de cultura FANEM modelo 002 CB, antes da realização dos ensaios de formação de biofilme nos filtros de carvão ativado.

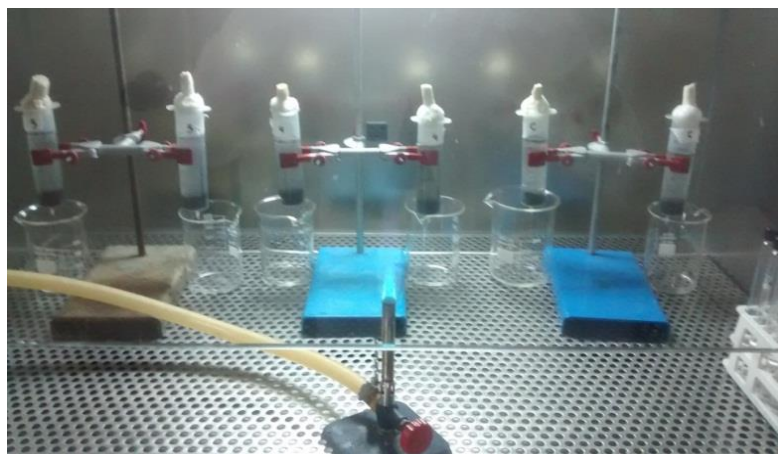
### 4.3.2 Preparação da água desafio com *P. aeruginosa*.

Após a reativação das cepas em ágar cetrimida, foram transferidas cinco colônias para um tubo com 10mL de água peptonada, sendo o inóculo inicialmente ajustado para  $1,5 \times 10^8$  ufc mL<sup>-1</sup> com a escala 0,5 Mc Farland. Foi retirada uma alíquota de 0,6mL desta suspensão que em seguida foi transferida para um Erlenmeyer com 59,4mL de água deionizada, ajustando o inóculo final para  $1,5 \times 10^6$  ufc mL<sup>-1</sup>.

### 4.3.3 Preparação dos filtros

De acordo com a norma técnica ABNT NBR 15176/04, foram preparados filtros de leito fixo com seringas estéreis de 60mL com o bico tampado com algodão e preenchidas com as amostras de 5g de carvão ativado impregnado e não impregnado com zinco e cobre. Os filtros foram presos em suportes universais e béqueres foram colocados para recolher o material filtrado (Figura 9).

Figura 9 - Imagem da filtração da suspensão microbiana em filtros de leito fixo de carvão ativado impregnados com zinco/cobre.



Fonte: Autoria própria.

Após a montagem do filtro, a água de desafio foi filtrada durante um período de  $50 \pm 5$  min em câmara de fluxo laminar QUIMIS modelo PA 310, em seguida, os filtros foram incubados em câmara úmida, à temperatura ambiente durante 24h, na ausência de luz.

Após a incubação, os carvões foram transferidos para Erlenmeyers com 100mL de solução fisiológica estéril. Logo após, foram submetidos a tratamento ultrassônico num Ultrassom UNIQUE modelo USC 1450 por 5min, na frequência de 25KHz para o desprendimento do biofilme microbiano da superfície do carvão ativado. Em seguida, retirou-se 1mL da solução sonicada e foi realizada a diluição seriada até  $10^{-5}$  para semeadura em ágar cetrimida e contagem das células viáveis que foram desprendidas das amostras de carvão.

#### **4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os ensaios microbiológicos foram realizados em triplicata, por meio de ensaios independentes. Índices de formação de biofilmes foram convertidos para escala logarítmica de base 10 e analisados descritivamente por meio de cálculos das médias e dos desvios padrão.

O programa *Graphpad Prism 6* foi aplicado para avaliar o significado das diferenças entre a formação de biofilmes microbianos de CANI e dos CAi, aplicando o teste *t Student* pareado bicaudal ( $p < 0,05$ ) e não pareado entre os tratamentos dos CAi (0,100% de Zn / 0,132% de Cu). Para determinar diferenças significativas na formação de biofilmes entre estas amostras.

#### **4.5 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE ZINCO E COBRE LIXIVIADOS EM ÁGUA ATRAVÉS DE FILTROS DE CARVÃO ATIVADO IMPREGNADO.**

Filtros de carvão ativado impregnado com zinco e cobre foram projetados do mesmo modo que para filtração da água desafio nos testes microbiológicos, utilizando-se 5,00g de CAi. Para cada amostra destes carvões ativados foram realizadas três filtrações, cada qual, aplicando-se 100mL de água destilada, que foram passadas pelos filtros. A água previamente filtrada foi recolhida em béqueres isolados e posteriormente transferidas para balões volumétricos de 100mL. A cura de calibração foi preparada com as seguintes concentrações de zinco e cobre: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2  $\text{mgL}^{-1}$ . Os teores de zinco e cobre lixiviados durante as filtrações foram determinados em espectrofotômetro de absorção atômica *AAAnalyst 400* da Perkin Elmer na Universidade Estadual de Goiás.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 CARACTERIZAÇÃO DO CARVÃO ATIVADO**

#### **5.1.1 Determinação de solúveis em carvão ativado**

Para o teste de solúveis, aplicou-se água que solubilizou a materiais inorgânicos solúveis presentes no carvão ativado. Obteve-se 0,33% em massa de solúveis, indicando que praticamente todos os componentes do carvão ativado são insolúveis em água. Sendo o carvão ativado um material hidrofóbico e sua funcionalidade como filtros de água não é comprometida devido a este baixo teor de solúveis.

Oliveira (2014) determinou teor de solúveis em água de lavagem de carvão ativado de casca de coco de dendê (*Elaeis guineensis*) de 0,19%, neste trabalho, os teores encontrados foram maiores. Esta variação pode ocorrer, pois estes solúveis são óxidos de minerais que são formados durante os processos de pirólise e ativação do carvão. Os tipos e quantidades destes óxidos podem variar conforme a composição da matéria-prima empregada na preparação do carvão.

#### **5.1.2 Determinação do teor de cinzas**

A determinação do teor de cinzas do carvão ativado indica a quantidade de materiais inorgânicos presentes neste material. O teor de cinzas determinado foi de 10,8% em massa. Loureiro (2012) determinou teores de cinza em amostras de carvão ativado de casca de coco em média: 5,71%, 11,40%, 14,31% e 9,08% em diferentes formas do carvão ativado e Bernardo et al. (1997) verificaram teores de cinza para carvão ativado de bagaço de cana em média: 15,5% e 12,1%.

Cinzas são comumente encontradas em carvão ativado, seus teores podem variar de acordo com a matéria prima empregada durante sua fabricação. Estas espécies inorgânicas consistem em óxidos metálicos. Van der Merwe e Badosz (2005) determinaram óxidos como: SiO<sub>2</sub>, MgO, CaO, K<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>O, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em cinzas de carvão ativado de casca de coco.

Carvões ativados de casca de coco comerciais apresentam teores de cinzas de 4,0% em massa (Calgon Carbon®, mostrado em Anexo A). O teor de cinzas determinado no presente trabalho está superior ao comercial, portanto, apenas 0,33% deste material inorgânico é solúvel em água, sendo mínima a interferência na aplicabilidade deste carvão em filtros de água domésticos.

### 5.1.3 Determinação da concentração de zinco e cobre impregnados em carvão ativado

Os valores dos fatores de correlação linear obtidos para o cobre e o zinco, a partir de curvas de calibração, foram Cu  $R^2 = 0,9998$  e Zn  $R^2 = 0,9982$ . Os resultados das porcentagens em massa de zinco e cobre estão na Tabela 3.

Tabela 3 - Determinação da porcentagem de metais impregnados no carvão ativado por espectrofotometria de absorção atômica.

| Metais | % Impregnação no CA |
|--------|---------------------|
| Zn     | 0,100               |
| Cu     | 0,132               |
| Zn/Cu  | 0,066 / 0,055       |
| Zn/Cu  | 0,062 / 0,092       |
| Zn/Cu  | 0,041 / 0,101       |
| CAni   | 0,000               |

Legenda: CA - carvão ativado, Zn - zinco, Cu - cobre, CAni - carvão ativado não impregnado.

Zinco e cobre foram impregnados na superfície do carvão ativado isoladamente e em combinação, para avaliar a inibição da formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* na superfície deste material.

Oliveira (2014) impregnou prata em carvão ativado de casca de coco de dendê (*Elaeis guineensis*) nos seguintes teores em massa: 0,0295%, 0,0660%, 0,0845%, 0,1907%, 0,2214%, para avaliar a inibição da formação de biofilmes microbianos. Os teores de prata utilizados por Oliveira (2014) estão próximos aos teores de zinco e cobre aplicados neste trabalho, para a mesma finalidade.

#### 5.1.4 Determinação do número de iodo

O número de iodo indica a área superficial do carvão ativado. Quanto maior a quantidade de iodo adsorvida, maior será a área superficial do carvão ativado.

A impregnação de metais em carvão ativado pode levar à obstrução de poros, em que aglomerados destes metais podem ser formados em sua superfície, fazendo com que haja perda da área superficial interna do material e comprometendo seu poder adsortivo.

Na Tabela 4 são mostradas as massas de iodo adsorvidas pelo carvão ativado não impregnado e carvão ativado impregnado com zinco e cobre. O carvão ativado sem metais impregnados apresentou maior massa de iodo adsorvida, 1240,5mg de iodo em 1g de CA, portanto, possui maior área superficial. No entanto, a quantidade de metais impregnados não alterou de forma significativa a capacidade adsortiva do carvão ativado. Isto mostra que a capacidade adsortiva do carvão ativado impregnado ou não, permanece a mesma.

Tabela 4 - Superfície do carvão ativado detectada pela técnica da massa de iodo adsorvida.

| Metais                | Massa de iodo adsorvida em CA (mg/g)<br>MED $\pm$ DP |
|-----------------------|--|
| 0,100% de Zn          | 1232,0 $\pm$ 12,02                                   |
| 0,132% de Cu          | 1217,0 $\pm$ 5,65                                    |
| 0,041% Zn / 0,101% Cu | 1239,5 $\pm$ 9,19                                    |
| 0,066% Zn / 0,055% Cu | 1228,0 $\pm$ 6,36                                    |
| 0,062% Zn / 0,092% Cu | 1231,5 $\pm$ 2,12                                    |
| CAni                  | 1240,0 $\pm$ 7,77                                    |

Legenda: CA - carvão ativado, MED - média, DP - desvio-padrão, Zn - zinco, Cu - cobre, CAni – carvão ativado não impregnado.

Veronezi et al. (2009) determinaram o número de iodo de carvão ativado em pó, proveniente de madeira e verificaram quantidades em massa (mg) de iodo adsorvidas por grama de carvão ativado de  $920,71 \pm 10,62$ ,  $824,12 \pm 2,73$ ,  $754,13 \pm 5,31 \text{ mg g}^{-1}$ , observando significativa porosidade e área superficial destes materiais, pois as quantidades de iodo adsorvidas são relativamente elevadas. Os desvios-

padrão encontrados por estes autores estão de acordo com os desvios encontrados neste trabalho.

Comercialmente têm-se o carvão ativado de madeira pela Calgon Carbon® que determina número de iodo mínimo de 1000 mg g<sup>-1</sup> (Anexo A1). Sendo este número de iodo de carvão ativado empregado comercialmente, de acordo com estes valores aqui determinados, sendo superiores a 1000 mg de iodo por grama de carvão ativado. Algumas variações se devem aos tipos de materiais precursores empregados e aos tratamentos submetidos, como a ativação.

#### **5.1.5 Determinação da granulometria do carvão ativado de casca de coco *Elaeis guineensis***

A granulometria do carvão ativado foi de 20x40mesh, sendo mais de 90% do carvão ativado retido entre as peneiras de 20 e 40mesh. Foi observada homogeneidade na distribuição do tamanho dos grãos, favorecendo na compactação do carvão ativado quando utilizado em filtros de água.

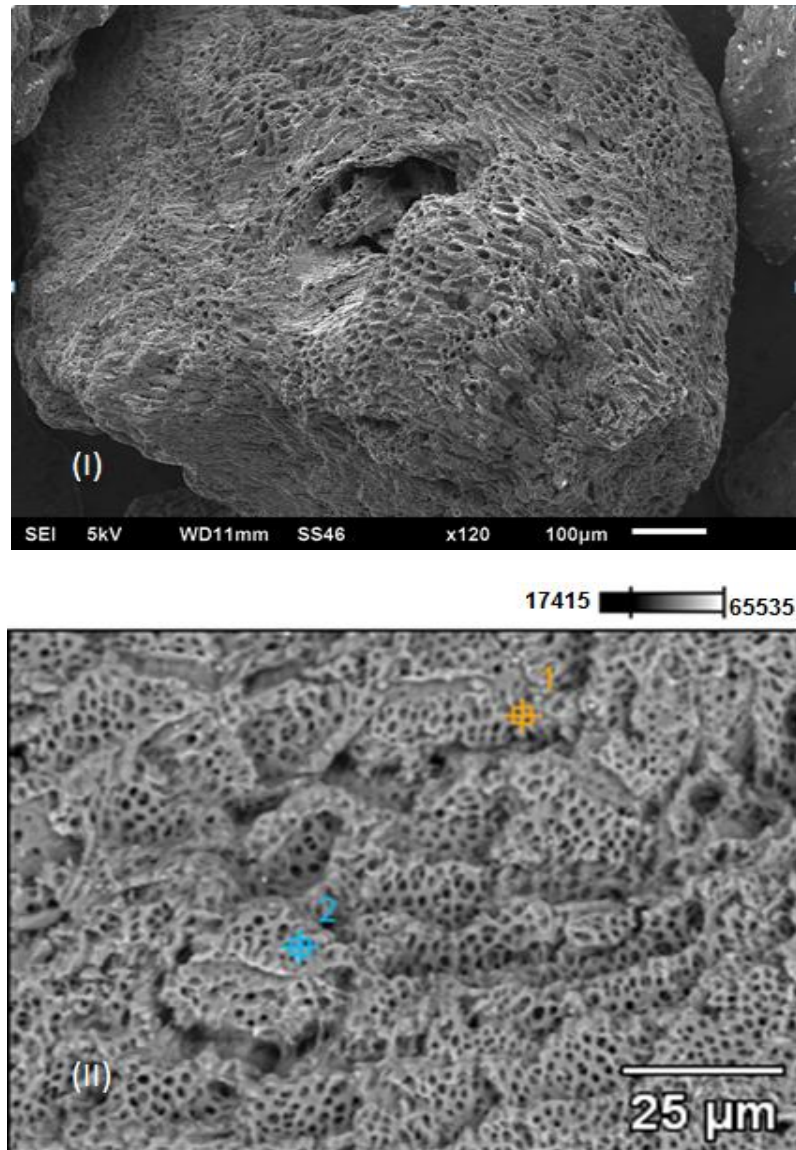
O carvão ativado de casca coco comercializado pela Calgon Carbon® possui granulometria 20x50mesh (Anexo A1). Esses valores obtidos representam valores próximos aos comerciais, estando adequados para aplicação em filtros por gravidade, uma vez que para grãos com diâmetros inferiores, a filtração ocorre muito lentamente e para grãos com diâmetros muito superiores, a filtração ocorre rapidamente e a adsorção de impurezas não é efetiva (NIEDERSBERG et al., 2012).

#### **5.1.6 Determinação da morfologia e composição química do CANI e CAi por microscopia eletrônica de varredura (MEV), acoplada ao espectrômetro de energia dispersiva (EDS).**

Amostras de carvão ativado granular de casca de coco de dendê (*Elaeis guineensis*) foram analisadas por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura, a fim de se analisar a morfologia deste material.

A Figura 10 é a imagem do carvão ativado sem impregnação de metais. (I) magnificação 120x e (II) magnificação 1000x.

Figura 10- Imagem de carvão ativado de casca de coco *Elaeis guineensis* obtidas por MEV magnificação 120x (I) e 1000x (II).



Conforme é observado nas imagens (I) e (II), para estes pontos da amostra de carvão ativado não impregnado (CAni) é possível observar a elevada porosidade do carvão ativado. A elevada porosidade do carvão ativado foi obtida através do processo de ativação, que lhe confere o aumento em sua área superficial (YANG; LUA, 2003). A estrutura do carvão ativado preserva as características da matéria-prima precursora, casca de coco de dendê (*Elaeis guineensis*).

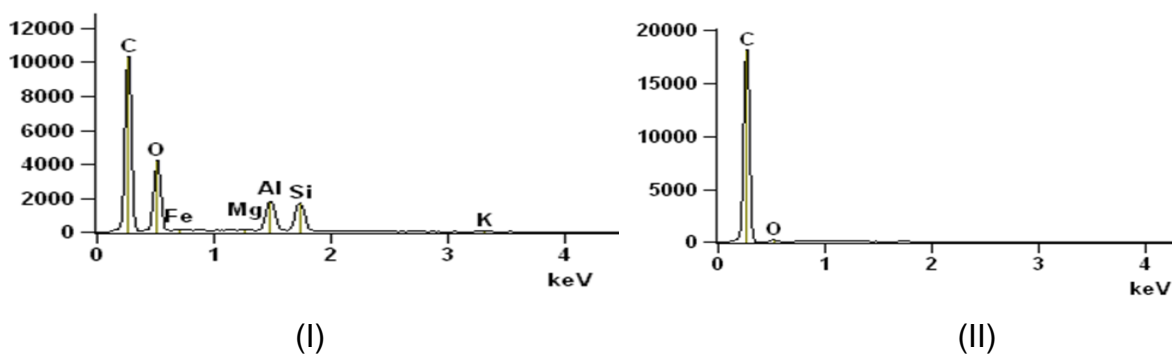
ACEVEDO et al. (2014) verificaram que o efeito antimicrobiano de carvão ativado impregnado com nanopartículas de prata depende também da área

superficial do carvão ativado, pois o fenômeno de adsorção está relacionado à sua área superficial.

A capacidade adsortiva do carvão ativado está relacionada também à sua elevada porosidade, sendo a capacidade adsortiva verificada neste trabalho através da determinação do número de iodo para este material.

O carvão ativado não impregnado foi analisado por MEV/EDS. Na Figura 11 estão representados os espectros de EDS referentes ao ponto 1 e ponto 2 da imagem (II) da Figura 10.

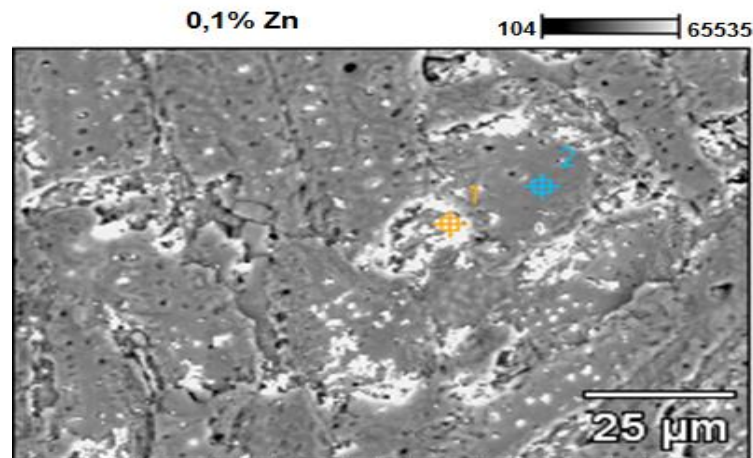
Figura 11- Espectros de EDS referentes aos pontos 1 (I) e 2 (II) da amostra de carvão ativado não impregnado.



De acordo com os espectros, para ambos os pontos (I) e (II) são observados picos intensos de carbono, que compõe basicamente a estrutura do carvão ativado (ALABADI et al., 2015) e alguns picos menos intensos para demais componentes da amostra que são oriundos do material precursor e possivelmente estão disponíveis na superfície do carvão ativado, como cinzas ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{MgO}$ ,  $\text{FeO}$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) (VAN DER MERWE; BANDOSZ, 2005).

A Figura 12 é referente ao CAi 0,1% de zinco, magnificação 1000x.

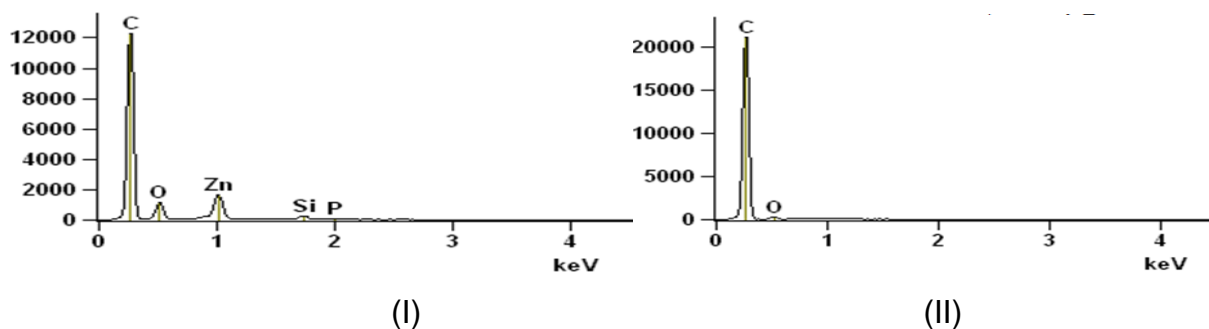
Figura 12- Imagem magnificação 1000x do carvão ativado impregnado com 0,1% de zinco.



A imagem 12 apresenta uma estrutura carbonácea densa e compactada, com distribuição heterogênea dos poros na superfície, neste ponto da amostra. Isto indica que o carvão ativado impregnado pode ter preservado as características do material precursor.

A Figura 13 representa os espectros de EDS referentes aos pontos 1 (I) e 2 (II) da imagem 12 do carvão ativado impregnado com 0,100% de zinco.

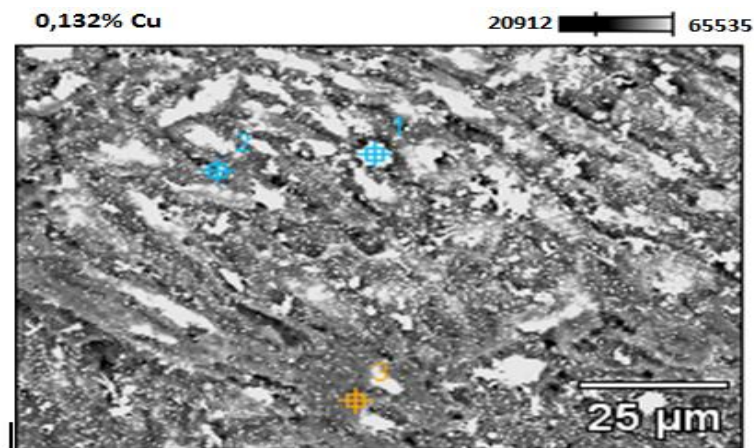
Figura 13- Espectros de EDS referentes aos pontos 1 (I) e 2 (II) da amostra de carvão ativado impregnado com 0,100% de zinco.



Em ambos os espectros de EDS (I) ponto 1 e (II) ponto 2 são verificados picos intensos de carbono. O espectro (I) indica a presença de alguns componentes do carvão ativado (silício e oxigênio), além da presença do zinco impregnado. No espectro (II) não foi detectada a presença de zinco impregnado neste ponto da amostra. O zinco pode não estar homogeneamente distribuído na superfície do carvão ativado.

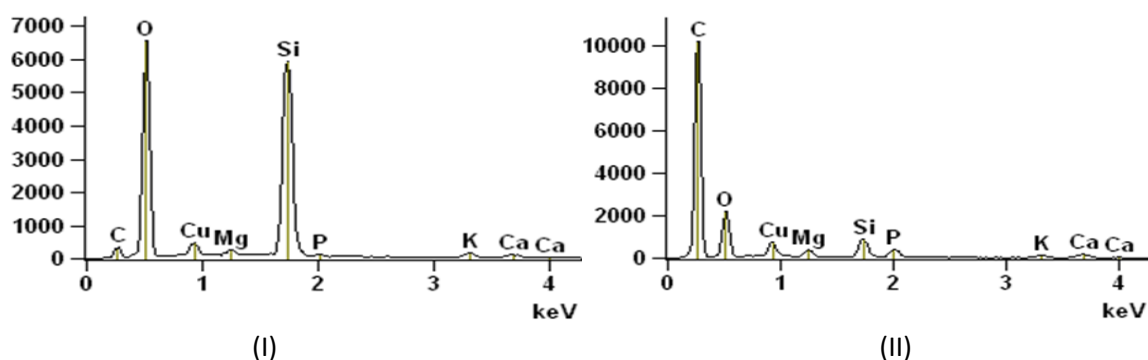
A Figura 14 representa a imagem do carvão ativado impregnado com 0,132% de cobre magnificação 1000x.

Figura 14- Imagem magnificação 1000x do carvão ativado impregnado com 0,132% de cobre.



A imagem 14 representa, neste ponto da amostra, uma superfície com distribuição heterogênea de poros e dispersão de estruturas de silicatos, conforme observado na Figura 15 que refere-se aos espectros de EDS da amostra de carvão ativado impregnado com 0,132% de cobre referentes aos pontos 1 (I) e 2 (II) da Figura 14.

Figura 15- Espectros de EDS referentes aos pontos 1 (I) e 2 (II) da amostra de carvão ativado impregnado com 0,132% de cobre.



O espectro de EDS referente no ponto 1, determina basicamente a presença de oxigênio e silício (que indica a presença de silicatos na superfície do carvão ativado), assim como um sinal referente ao cobre impregnado. Neste ponto, provavelmente, o cobre esteja depositado sobre a superfície do silicato. No ponto 2 da micrografia, o sinal mais intenso no espectro de EDS (II) determinou a presença

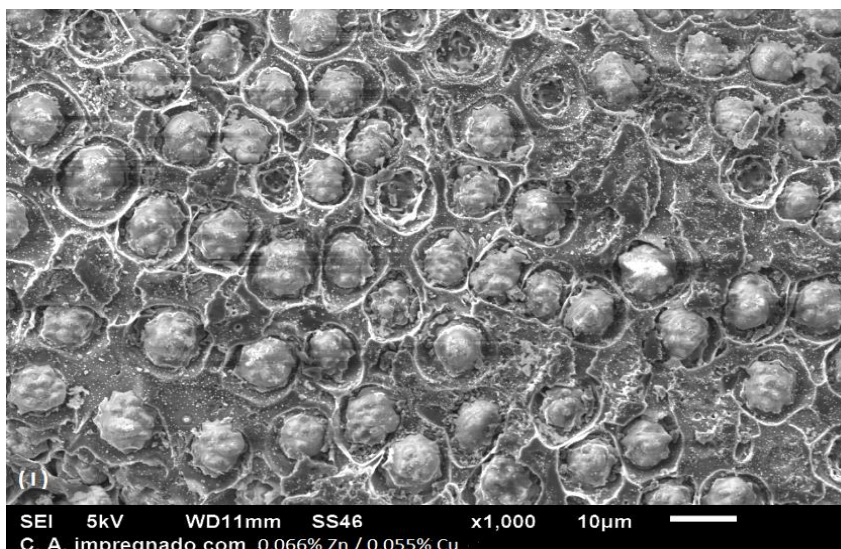
de carbono. Um sinal referente ao cobre também foi observado. Neste ponto, provavelmente, o cobre esteja depositado sobre a estrutura carbonácea do carvão ativado. Conforme os espectros de EDS, o cobre pode estar depositado tanto na superfície do carvão, quanto na superfície dos silicatos.

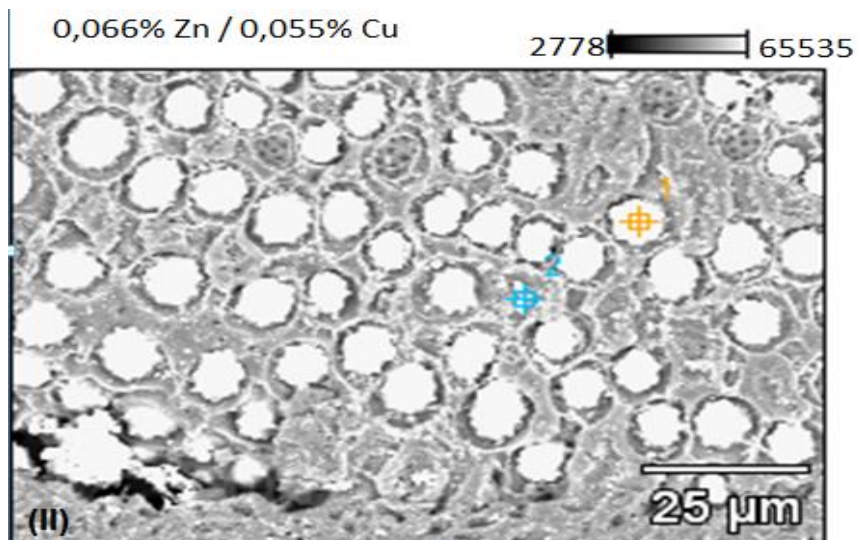
Na determinação do teor de cinzas, tem-se que a quantidade de material inorgânico insolúvel é muito superior a de solúvel e possivelmente estes silicatos compõe basicamente as cinzas do carvão ativado. Carvão ativado proveniente de outros precursores como cascas de amendoim (WU et al., 2013), madeira (NORIT) (ZHU et al., 2009) também contém significativos teores de silício em sua composição.

Materiais precursores na produção de carvão ativado tais como casca de arroz, possuem elevados teores de silicatos em sua composição, podendo variar de 18.8% a 22.3% em massa e passam a compor o carvão ativado (CHEN et al., 2012).

A Figura 16 representa a imagem ampliada 1000x do carvão ativado impregnado com 0,066% de zinco e 0,055% de cobre.

Figura 16- Imagens magnificação 1000x do carvão ativado impregnado com 0,066% de zinco e 0,055% de cobre (I) e (II).

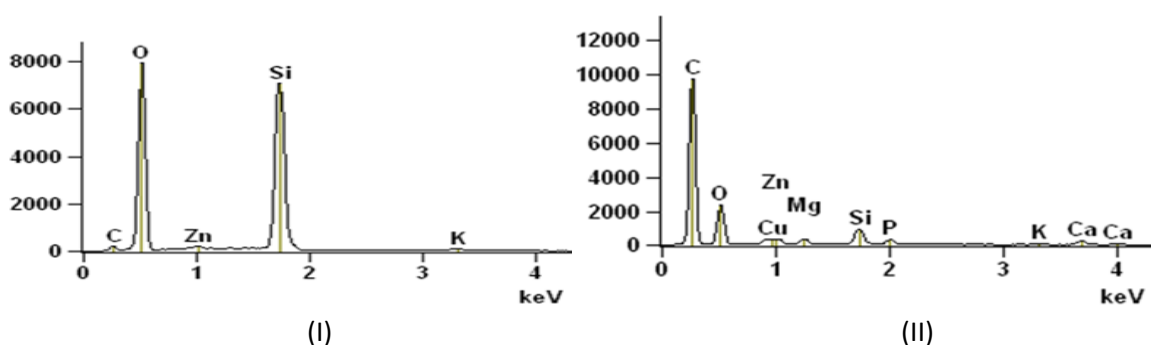




Nas Figuras 16 (I) e (II) são verificadas elevadas quantidades de silicatos adsorvidos na superfície do carvão ativado, também são observadas lacunas nesta superfície que apresentam morfologia semelhante às dos silicatos, em que provavelmente estas estruturas foram desprendidas do carvão ativado. A presença destes silicatos deve-se à constituição da matéria-prima precursora.

A Figura 17 representa espectros de EDS referentes aos pontos 1 (I) e 2 (II) da Figura 16 (II) do carvão ativado impregnado com 0,066% de zinco e 0,055% de cobre.

Figura 17- Espectros de EDS referentes aos pontos 1 (I) e 2 (II) da amostra de carvão ativado impregnado com 0,066% de zinco e 0,055% de cobre.

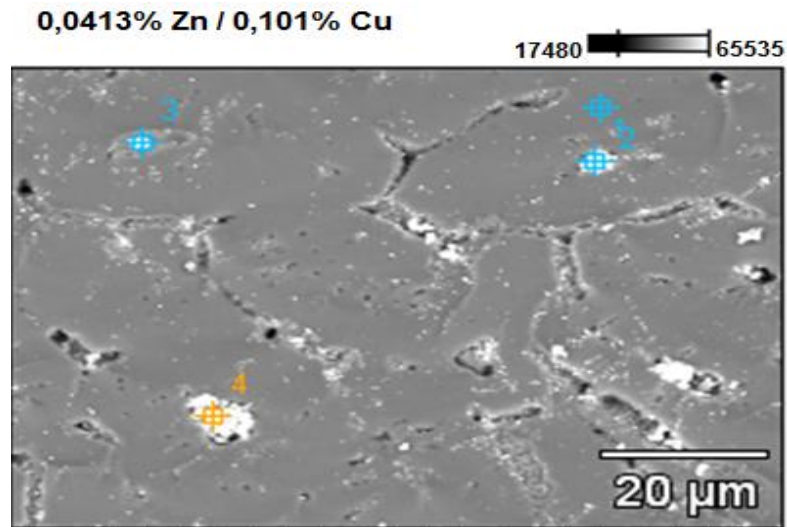


No ponto 1, o espectro de EDS apresenta sinais intensos de silício e oxigênio indicando a presença de silicatos, assim como sinal pouco intenso de zinco, indicando, provavelmente, que o metal esteja depositado sobre o silicato neste ponto da amostra de carvão ativado. No ponto 2, o espectro de EDS mostra um sinal

intenso de carbono e sinais pouco intensos de zinco e cobre, podendo indicar a deposição destes metais sobre a estrutura carbonácea do carvão ativado.

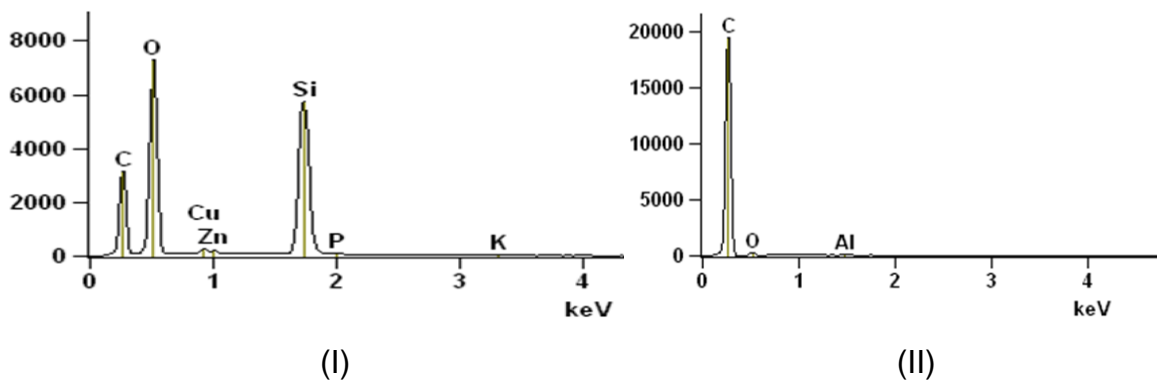
A Figura 18 representa a imagem do CAi 0,041% de zinco e 0,101% de cobre magnificação 1000x.

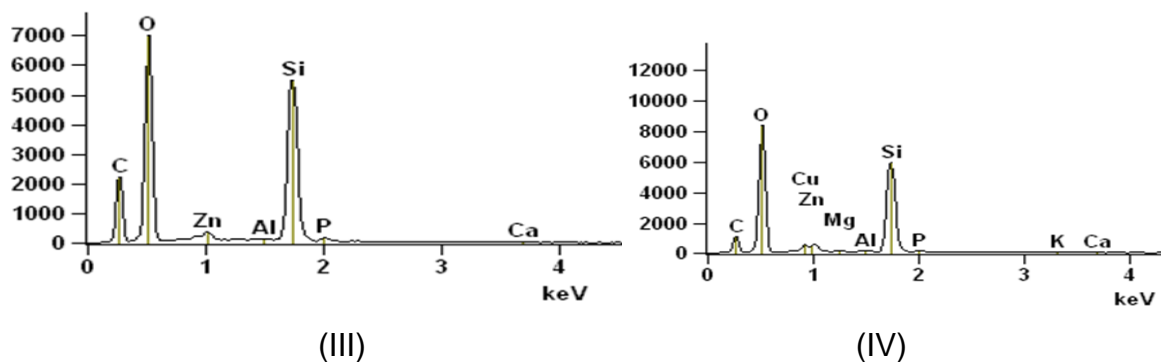
Figura 18 - Imagem magnificação 1000x do carvão ativado impregnado com 0,041% de zinco e 0,101% de cobre.



A Figura 19 representa os espectros de EDS referentes aos pontos 1 (I), 2 (II), 3 (III) e 4 (IV) da Figura 18 do carvão ativado impregnado com 0,041% de zinco e 0,101% de cobre.

Figura 19- Espectros de EDS referentes aos pontos 1 (I), 2 (II), 3 (III) e 4 (IV) da amostra de carvão ativado impregnado com 0,041% de zinco e 0,101 de cobre.



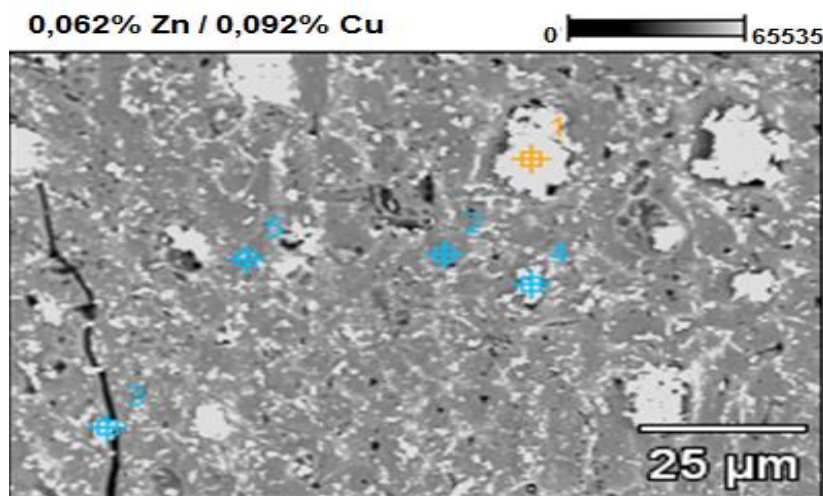


Zinco e cobre impregnados aparecem em diferentes pontos da imagem de acordo com os espectros (I), (III) e (IV), demonstrando que estão impregnados no carvão ativado e dispersos nesta superfície. A presença de silicato no carvão fez com que os metais ficassem adsorvidos tanto na superfície carbonácea do carvão, quanto na superfície do silicato.

A distribuição homogênea dos metais na superfície do carvão ativado pode contribuir para o aumento do efeito antimicrobiano deste material, sendo que, quando estes metais apresentam-se aglomerados, apenas parte da amostra poderá inibir a formação de biofilmes microbianos, enquanto outra parte da amostra estará desprotegida.

A Figura 20 representa a imagem do CAi 0,062% Zn e 0,092% Cu magnificação 1000x.

Figura 20 - Imagem magnificação 1000x do carvão ativado impregnado com 0,062% de zinco e 0,092% de cobre.

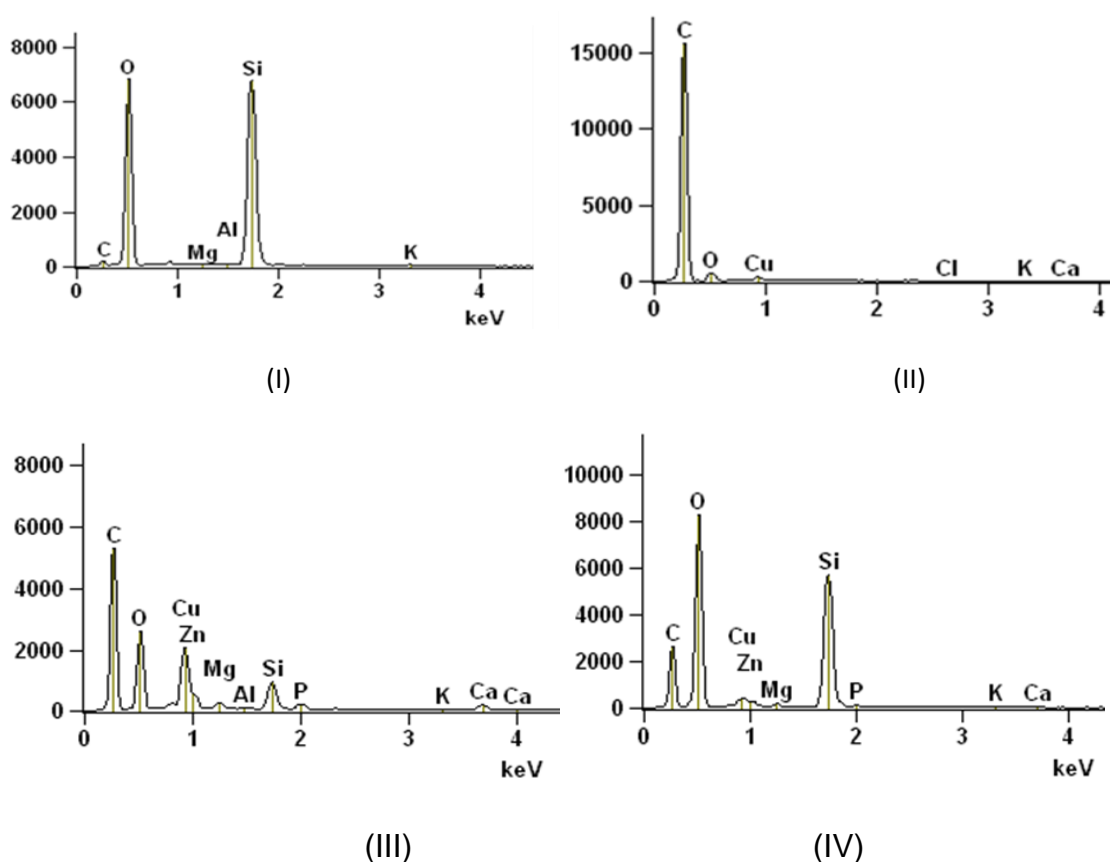


Conforme a Figura 20 é observada uma estrutura semelhante às dos demais carvões ativados impregnados com o zinco e cobre isolados e em combinação,

sendo verificada estrutura compacta e heterogeneidade na distribuição dos poros, além da presença de silicatos neste ponto da amostra.

A Figura 21 representa os espectros de EDS do carvão ativado impregnado com 0,062% de zinco e 0,092% de cobre, referentes aos pontos 1 (I), 2 (II), 3 (III) e 4 (IV). Os espectros de EDS indicam a presença de carbono, silício e oxigênio em diferentes pontos no carvão ativado.

Figura 21- Espectros de EDS referentes aos pontos 1 (I), 2 (II), 3 (III) e 4 (IV) do carvão ativado impregnado com 0,062% de zinco e 0,092% de cobre.



As análises de MEV/EDS mostram que os metais zinco e cobre podem estar depositados, principalmente, sobre o carvão ativado ou sobre silicatos. A presença destes silicatos pode comprometer a área superficial do carvão ativado, ou seja, diminuir sua capacidade adsortiva, uma vez que adsorvidos de modo a bloquear a abertura do poro na superfície, pode ocorrer perda da área superficial interna do carvão ativado. Quando este carvão ativado impregnado for utilizado no processo de filtração de água, poderá haver lixiviação de metal contaminando a água filtrada. Isto dependerá da força de ligação metal-silicato, metal-carbono e silicato carbono.

## 5.2 TESTES MICROBIOLÓGICOS

### 5.2.1 Contagem de *P. aeruginosa* nas amostras de água desafio

A contagem dos micro-organismos nas suspensões bacterianas obtidas na água desafio foi realizada conforme descrito no item 4.3.3 e estão mostradas na Tabela 5.

Tabela 5 – Determinação do inoculo ajustado de *P. aeruginosa* ATCC 9027 nas amostras de água desafio.

| Amostras      | Contagem de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ufc mL <sup>-1</sup> ) |
|---------------|---|
| 1             | 6,437   |
| 2             | 6,342   |
| 3             | 6,212   |
| 4             | 6,838   |
| 5             | 6,164   |
| <b>MED±DP</b> | <b>6,398±0,268</b>  |

Legenda: MED - média, DP - desvio padrão.

Os resultados encontrados nos inóculos de *P. aeruginosa* nas amostras de água desafio estão próximos aos preconizados pela norma NBR 15176/04 e Portaria INMETRO 394/2014 que determinam um mínimo de  $1 \times 10^4$  e máximo de  $9 \times 10^5$  ufc mL<sup>-1</sup> para os ensaios de controle do nível microbiológico com este micro-organismo.

### 5.2.2 Formação de biofilme de *P. aeruginosa* no carvão ativado

Após o processo de filtração, foi verificada a formação de biofilme nas superfícies do carvão ativado não impregnado. Os resultados das contagens de células viáveis são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Quantificação de células viáveis de *P. aeruginosa* associadas a biofilmes formados na superfície de carvão ativado não impregnado (CA<sub>ni</sub>).

| <b>Contagem de <i>P. aeruginosa</i></b> |   |
|---|---|
| <b>Amostras</b>                         | <b>(Log<sub>10</sub> ufc/5g de CA<sub>ni</sub>)</b> |
| <b>1</b>                                | 5,990   |
| <b>2</b>                                | 5,255   |
| <b>3</b>                                | 6,571   |
| <b>4</b>                                | 6,350   |
| <b>5</b>                                | 6,267   |
| <b>MED±DP</b>                           | <b>6,087±0,509</b>                                  |

Legenda: MED – média, DP – desvio-padrão, ufc/5g de CA<sub>ni</sub>- unidades formadoras de colônia por cinco gramas de carvão ativado.

Foi verificado que após a passagem da água desafio e incubação das amostras de carvão ativado não impregnado houve a formação de biofilme por *P. aeruginosa* em todas as amostras estudadas com valores médios de 6,087 log<sub>10</sub> ufc/5g.

De acordo com Zhang et al. (2011), os micro-organismos podem se alojar facilmente na estrutura porosa do carvão ativado, consumir a matéria orgânica presente no meio, secretar polissacarídeos e se reproduzir, gerando biofilme microbiano, podendo acarretar a saturação prematura do carvão ativado.

Oliveira (2014) também verificou a formação de biofilmes microbianos de *Pseudomonas aeruginosa* na superfície de carvão ativado de casca de coco *Elaeis guineensis*, apresentando contagens de 7,56 log<sub>10</sub> ufc mL<sup>-1</sup>.

Na Tabela 7 são comparados os resultados da formação de biofilme na superfície do carvão ativado impregnado com as amostras não impregnadas. Observa-se pelos resultados que houve a formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* em todas as amostras não impregnadas e impregnadas com zinco e cobre. No entanto, a formação de biofilmes foi diminuída quando zinco e cobre apresentam-se impregnados ao carvão ativado e notadamente diminuída, quando os metais apresentam-se combinados nesta superfície.

Tabela 7 – Comparação do desenvolvimento de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* na superfície do CAi e do CAi.

| Log <sub>10</sub> ufc/5g <i>P. aeruginosa</i> |                    |                          |
|---|--------------------|--------------------------|
| Amostras                                      | MED±DP             | Inibição entre CAi e CAi |
| CAi   | <b>6,087±0,509</b> | -                        |
| CAi 0,100% Zn                                 | <b>5,064±0,596</b> | 1,023                    |
| CAi 0,132% Cu                                 | <b>4,883±0,585</b> | 1,204 <sup>#</sup>       |
| CAi 0,041% Zn / 0,101% Cu                     | <b>3,975±0,415</b> | 2,112 <sup>#*\$</sup>    |
| CAi 0,066% Zn / 0,055% Cu                     | <b>3,854±0,318</b> | 2,233 <sup>#*\$</sup>    |
| CAi 0,062% Zn / 0,092% Cu                     | <b>2,809±1,016</b> | 3,278 <sup>#*\$</sup>    |

Legenda: Log<sub>10</sub> ufc/5g- Unidades formadoras de colônia em 5g de carvão ativado; CAi – carvão ativado impregnado; CAi – carvão ativado não impregnado. <sup>#</sup> Diferenças significativas entre CAi vs CAi (p< 0,05). <sup>\*</sup>Diferenças significativas entre CAi 0,100% Zn e CAi com os metais combinados (p< 0,05). <sup>§</sup>Diferenças significativas entre CAi 0,132% Cu e CAi com os metais combinados (p< 0,05).

Inibições significativas foram verificadas ao comparar-se as amostras impregnadas (CAi) com as amostras não impregnadas (CAi), com exceção ao CAi 0,100% de zinco.

Comparações entre as médias do CAi e dos CAi com zinco e cobre isolados já apresentam inibição na formação de biofilmes microbianos, sendo de 1,023 e 1,204 logs, respectivamente. O cobre possui teor em massa de 32% acima do teor de zinco impregnado, portanto, apresentou diminuição significativa quando comparado ao CAi (p= 0,006), e maior efeito antimicrobiano.

Os CAi com zinco e cobre conjuntamente apresentaram diminuições significativas quando comparados ao CAi e também quando comparados aos CAi com metais isolados, exceto, na comparação entre CAi 0,066% Zn / 0,055% Cu e CAi 0,100% Zn, sendo que para esta combinação, o cobre apresenta-se com teor em massa reduzido praticamente à metade quando comparado às demais combinações deste metal. Sendo verificadas diminuições significativas entre os CAi com zinco e cobre isolados e combinados, nota-se que o efeito antimicrobiano é potencializado, quando estes metais estão conjuntamente impregnados.

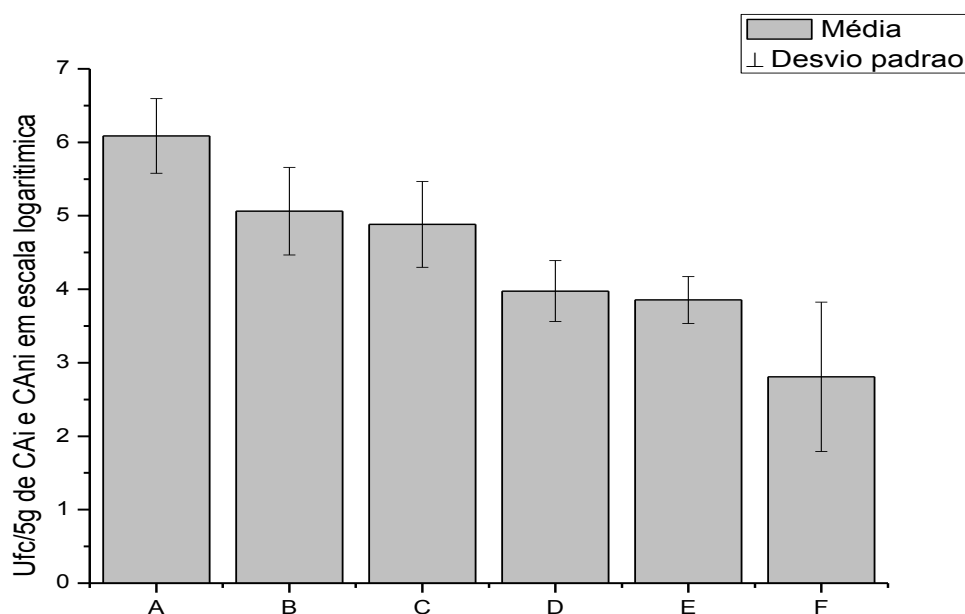
Ao serem comparados CAi 0,066% Zn / 0,055% Cu e CAi 0,062% Zn / 0,092% Cu, verifica-se praticamente o mesmo teor em massa de zinco impregnado para ambas as amostras e praticamente o dobro de cobre impregnado entre as mesmas, sendo considerado o desvio-padrão com 1,016 logs acima do valor em média da formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* (para a amostra CAi 0,062% Zn / 0,092% Cu) , nota-se praticamente o mesmo crescimento microbiano para ambas as amostras. Indicando que possivelmente o zinco potencializa o efeito antimicrobiano do cobre.

Xiang et al. (2010) realizaram testes microbiológicos com *Escherichia coli*. Eles observaram que para o carvão ativado impregnado com 4,58% em massa de cobre não houve crescimento microbiano, todas as células foram inativadas. Ao se comparar com o presente trabalho, verifica-se que os autores utilizaram teores elevados de cobre impregnado ao carvão ativado, portanto, maior o efeito antimicrobiano. Sendo observado um efeito de dose dependente em que quanto maior a concentração de cobre impregnado, maior será o efeito antimicrobiano.

Lin et al. (2002) utilizaram íons de prata e cobre para controlar o crescimento de *Legionella*, em sistemas de distribuição de água em determinados hospitais. Estes íons formam ligações eletrostáticas com grupos carregados negativamente que estão localizados na parede celular bacteriana. Quando estes dois íons são juntamente aplicados, ocorre um efeito sinérgico no controle do crescimento desta bactéria patogênica. No presente trabalho também foi observado um efeito sinérgico na inibição da formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* quando zinco e cobre são aplicados conjuntamente, assim como o trabalho do Lin et al. (2002).

A Figura 22 representa a formação de biofilmes no CAni e nos CAi sendo verificada a diminuição na formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* em carvão ativado impregnado com zinco e cobre isoladamente e em combinação em comparação ao CAni. Observando-se acentuada diminuição na formação de biofilmes pela comparação entre o CAni e os CAi com zinco e cobre impregnados conjuntamente ao carvão ativado, evidenciando o efeito sinérgico entre estes metais na inibição da formação de biofilmes de *P. aeruginosa*.

Figura 22 - Inibição na formação de biofilme microbiano para CAni e carvão ativado impregnado com zinco e cobre.



Legenda: **A** - CAni; **B** - 0,100% Zn; **C** - 0,132% Cu; **D** - 0,041% Zn / 0,101% Cu; **E** - 0,066% Zn / 0,055% Cu; **F** - 0,062% Zn / 0,092% Cu.

Zhao et al. (2013) avaliaram o efeito antimicrobiano de prata (0,97% em massa) em *Escherichia coli*, e observaram um efeito bactericida para este micro-organismo em que todas as células foram inativadas.

Neste trabalho, foi observada diminuição de até 3,278 logs no crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* para teores em massa de zinco e cobre de 0,062% e 0,092% respectivamente. O efeito antimicrobiano neste trabalho apresentou menor diminuição na contagem de micro-organismos quando comparado ao Zhao et al. (2013), que utilizou teores de prata de 0,97% em massa, praticamente sete vezes acima dos teores de metais aplicados neste trabalho. O que sugere que com baixos teores de metais, a diminuição do crescimento bacteriano já se torna efetiva.

Oliveira (2014) avaliou o efeito na inibição da formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* em carvão ativado impregnado com prata (0,0295%, 0,0660%, 0,0845%, 0,1907% e 0,2214% em massa). Verificou diminuição de até 2 logs na inibição do crescimento microbiano, para a amostra mais concentrada de

prata, sendo observado efeito de dose dependente, pois conforme houve o aumento da concentração de prata, houve diminuição na contagem de células viáveis.

As concentrações utilizadas por Oliveira (2014) foram próximas às aplicadas neste trabalho, no entanto, no presente trabalho, a inibição da formação de biofilmes foi maior, sendo de até 3,278 para a combinação entre zinco e cobre. Sugere-se que o aumento na inibição da formação de biofilmes para o mesmo micro-organismo se deve à combinação entre zinco e cobre, que gera um efeito sinérgico que potencializa a inibição do crescimento microbiano.

### 5.3 Determinação da quantidade de metais lixiviados dos filtros de carvão ativado durante o processo de filtração

Os teores de metais lixiviados do filtro de carvão ativado devem estar abaixo dos estabelecidos pelos padrões de potabilidade, pela Portaria 2914/2011 que preconiza teores de cobre na água potável valores máximos de 2 mgL<sup>-1</sup>. O Padrão organoléptico de potabilidade para o zinco na água potável, determina valores máximos de 5 mgL<sup>-1</sup> (BRASIL, 2011), pois além de contaminar a água filtrada, o filtro perde sua eficiência na inibição do crescimento microbiano. Os valores dos coeficientes de correlação linear obtidos para o zinco e o cobre, a partir das curvas de calibração, foram: Zn R<sup>2</sup> = 0,9877 e Cu R<sup>2</sup> = 0,9927. Os teores de zinco e cobre lixiviados do carvão ativado estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8- Teor de metais lixiviados do carvão ativado no processo de filtração da água destilada.

| CAi                   | Teor de metais lixiviados (mgL <sup>-1</sup> ) |                     |                     |
|-----------------------|--|---------------------|---------------------|
|                       | Primeira filtração                             | Segunda filtração   | Terceira filtração  |
| 0,100% Zn             | 0,700 Zn                                       | 0,236 Zn            | 0,089 Zn            |
| 0,132% Cu             | 0,965 Cu                                       | 0,022 Cu            | 0,016 Cu            |
| 0,066% Zn / 0,055% Cu | 0,064 Zn / 0,117 Cu                            | 0,069 Zn / 0,236 Cu | 0,040 Zn / 0,236 Cu |
| 0,041% Zn / 0,101% Cu | 0,425 Zn / 0,627 Cu                            | 0,486 Zn / 0,748 Cu | 0,522 Zn / 0,121 Cu |
| 0,062% Zn / 0,092% Cu | 0,145 Zn / 0,913 Cu                            | 0,070 Zn / 1,220 Cu | 0,084 Zn / 0,166 Cu |

Legenda: CAi – carvão ativado impregnado, Zn – zinco, Cu – cobre

A Tabela 9 indica a porcentagem em massa de zinco e cobre lixiviados dos carvões ativados impregnados (em 5g de CAi) durante o processo de filtração seriada de água destilada.

Tabela 9 – Teor de metais lixiviados do carvão ativado durante a filtração seriada de água destilada

| Teor de metais lixiviados CAi (%) |                    |                   |                    |
|-----------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| CAi                               | Primeira filtração | Segunda filtração | Terceira filtração |
| 0,100% Zn                         | 1,40               | 0,47              | 0,17               |
| 0,132% Cu                         | 1,46               | 0,03              | 0,02               |
| 0,066% Zn / 0,055% Cu             | 0,19 / 0,42        | 0,15 / 0,85       | 0,12 / 0,85        |
| 0,041% Zn / 0,101% Cu             | 2,07 / 1,25        | 2,37 / 1,49       | 2,69 / 0,24        |
| 0,062% Zn / 0,092% Cu             | 0,46 / 1,98        | 0,22 / 2,60       | 0,27 / 0,34        |

Legenda: CAi - Carvão ativado, Zn - zinco, Cu – cobre

Os teores de metais lixiviados do carvão ativado são mínimos, sendo que a amostra com 0,041% Zn / 0,101% Cu apresentou maior lixiviação de zinco, sendo de 2,69% em massa e a amostra 0,062% Zn / 0,092% Cu apresentou maior lixiviação de cobre, sendo de 2,60% em massa do teor impregnado no carvão ativado.

No processo de impregnação de zinco e cobre na superfície do carvão ativado, parte destes metais se prendem fracamente à estrutura do carvão, podendo ser liberados na água durante a filtração. Porém, grande parte destes metais é liberado na primeira água que passa pelo filtro. Esta água, portanto, deve ser descartada, procedimento este chamado de pré-lavagem do meio filtrante. Essas quantidades de metais lixiviados serão reduzidas até não serem mais liberadas. O teor de metais lixiviados é mínimo em relação ao teor impregnado no carvão ativado. Indicando, portanto, que a inibição do crescimento microbiano ocorreu na superfície do carvão ativado e não em suspensão, na água passada por este filtro.

As quantidades determinadas de metais lixiviados do carvão ativado estão de acordo com os padrões de potabilidade da Portaria 2914/2011. Foi verificada a diminuição na quantidade de metais lixiviados do carvão ativado durante a filtração de água em filtros-teste de CAi, conforme a água foi passada pelos filtros.

Ao comparar-se a primeira filtração com a terceira, é verificada acentuada diminuição dos teores de zinco e cobre lixiviados do carvão ativado, sendo que na primeira água passada pelo filtro, o arraste de materiais inorgânicos solúveis em água é maior, pois estão em maiores quantidades. A terceira filtração demonstrou uma lixiviação mínima, mostrando que os metais que não estavam fortemente presos à estrutura do carvão ativado foram lixiviados em quase sua totalidade nos primeiros 200mL de água no processo de filtração.

## 6 CONCLUSÃO

Carvão ativado de casca de coco de dendê impregnado com zinco e cobre, nas concentrações testadas, inibiram a formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. O metal impregnado não diminuiu a capacidade adsortiva do carvão ativado. O teor de cinza encontrado foi de 10,8%, sendo que 0,33% é solúvel e o restante insolúvel em água, basicamente silicatos (conforme determinado por MEV/EDS). Os teores de zinco e cobre lixiviados do carvão ativado após a passagem de água destilada estão enquadrados nos padrões de potabilidade conforme a Portaria 2914/2011. A inibição máxima da formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 foi de 3,278 logs. Foi verificado um efeito sinérgico na inibição do crescimento microbiano, em que, aparentemente, o zinco potencializa o efeito antimicrobiano do cobre. Diante destes resultados, carvão ativado de casca de coco de dendê impregnado com zinco e cobre apresenta propriedade de inibição de biofilme microbiano, mostrando sua aplicação como meio filtrante em filtros de água domésticos.

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Visando detalhar a formação de biofilmes no carvão ativado e sugerir mecanismos de atividade antimicrobiana dos carvões ativados impregnados com zinco e cobre sugere-se:

- Visualizar e avaliar o biofilme formado no carvão ativado por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura.
- Determinar os estados de oxidação do zinco e cobre impregnados no carvão ativado, por meio da técnica de XPS (espectroscopia fotoeletrônica de raios x).
- Realizar os testes microbiológicos com outros micro-organismos, para avaliar o efeito antimicrobiano sobre os mesmos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO, S.; AREVALO-FESTER, J.; GALICIA, L.; ATENCIO, R.; PLAZA, E.; GONZALEZ, E.; Efficiency study of silver nanoparticles (AgNPs) supported on granular activated carbon against *Escherichia coli*. **Journal of Nanomedicine Research**, v. 1, n. 2, p. 1 – 5, 2014
- ALABADI, A.; RAZZAQUE, S.; YANG, Y.; CHEN, S.; TAN, B.; Highly porous activated carbon materials from carbonized biomass with high CO<sub>2</sub> capturing capacity. **Chemical Engineering Journal**; Manuscrito aceito em 7 de junho de 2015
- ALHEDE, M.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; ALHEDE, M.; Chapter one – *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Mechanisms of immune evasion. **Advances in Applied Microbiology**, v. 86, p. 1-40, 2014
- AMIRULHUSNI, A. N.; PALANISAMY, N. K.; MOHD-ZAIN, Z.; PING, L. J.; DURAIRAJ, R.; Antibacterial effect of silver nanoparticles on multi drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **World Academy of Science, Engineering and technology**, v. 6, p. 7-22, 2012
- ASTM D 2866 – 94: **Standard Test Method for Total Ash Content of Activated Carbon**; (Reapproved 1999).
- ASTM D 4607 – 94; **Standard Test Method for Determination of Iodine Number of Activated Carbon**; (Reapproved 1999).
- ASTM D 5029 – 98; **Standard Test Method for Water Solubles in Activated Carbon**.
- BACCAR, R.; BOUZID, J.; FEKI, M.; MONTIEL, A.; Preparation of activated carbon from Tunisian olive-waste cakes and its application for adsorption of heavy metal ions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 162, p. 1522–1529, 2009
- BELKACEM, M.; BENSADOK, K.; REFES, A.; CHARVIER, P. M.; NEZZAL, G.; Water produce for pharmaceutical industry: role of reverse osmosis stage. **Desalination**, v. 221 , p. 298-302, 2008
- BERNARDO, E.C.; EGASHIRA, R.; KAWASAKI, J.; Decolorization of Molasses' Waste water Using Activated Carbon Prepared From Cane Bagasse, **Carbon**, v. 35, n. 9, p. 1217-1221, 1997
- BOARI, C. A.; **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo**. Tese de Doutorado em Ciência dos Alimentos – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- BOE- HANSEN, R.; ALBRECHTSEN, H. J.; ARVINA, E.; JORGESEN, C.; Bulk water phase and biofilm growth in drinking water at low nutrient conditions. **Water Research**, v. 36, p. 4477–4486, 2002
- BRASIL. Portaria nº 2914 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**. Ministério da Saúde, 2011
- BRITO, D. V. D.; OLIVEIRA, E. J.; MATOS, C.; ABDALLAH, V. O. S.; An Outbreak of Conjunctivitis Caused by Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian Newborn Intensive Care Unit. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7 n. 4, p. 234-235, 2003

CARMENA, D.; CARDONA, G. A.; SÁNCHEZ-SERRANO, L. P.; Current situation of Giardia infection in Spain: Implications for public health. **World Journal of Clinical Infectious Diseases**, v.2, n.1, p.1-12, 2012

CASANI, S.; KNOCHER, S.; Application of HACCP to water reuse in the food industry. **Food Control**, v. 13, p. 315–327, 2002

CHEN, C.; ZHANG, X.; HE, W.; LU, W.; HAN, H.; Comparison of seven kinds of drinking water treatment processes to enhance organic material removal: A pilot test. **Science of the Total Environment**, v. 382, p. 93–102, 2007

CHEN, H.; WANG, H.; YANG, L.; XIAO, Y.; ZHENG, M.; LIU, Y.; FU, H.; High Specific Surface Area Rice Hull Based Porous Carbon Prepared for EDLCs. **International Journal Electrochemical Science**, v. 7, p. 4889 – 4897, 2012

CHERIA, J.; ROUABHIA, M.; MAATALLAH, M.; BAKHROUF, A.; Phenotypic stress response of *Pseudomonas aeruginosa* following culture in water microcosms. **Journal Water and Health**, v. 10, p. 130–139, 2012

CORWIN, C. J.; SUMMERS, R. S.; Christopher J.; Adsorption and desorption of trace organic contaminants from granular activated carbon adsorbers after intermittent loading and throughout backwash cycles. **Water Research**, v. 45, p. 417-426, 2011

COSTERTON, J. W., STEWART, P. S., GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318–1322, 1999

DELGADO, L. F.; CHARLES, P.; GLUCINA, K.; MORLAY, C.; The removal of endocrine disrupting compounds, pharmaceutically activated compounds and cyanobacterial toxins during drinking water preparation using activated carbon-A review. **Science of the Total Environment**, v. 435-436, p. 509-525, 2012

DIZAJ, S. M.; LOTFIPOUR, F.; BARZEGAR- JALALI, M.; ZARRINTAN, M. H.; ADIBKIA, K.; Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 44, p. 278–284, 2014

DUNNE JÚNIOR, W. M.; Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 155-166, 2002

EMADZADEH, D.; LAU, W. J.; RAHBARI-SISAKHT, M.; DANESHFAR, A.; GHANBARI, M.; MAYAHID, A.; MATSUURA, T.; ISMAIL, A. F.; A novel thin film nanocomposite reverse osmosis membrane with superior anti-organic fouling affinity for water desalination. **Desalination**, v. 368, p. 106–113, 2015

FUENTEFRIA, D. B.; FERREIRA, A. E.; GRÄF, T.; CORÇÃO, G.; *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, 2008

GAVINHO B.; **Desenvolvimento de imunógeno bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* conjugado ao toxóide tetânico**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011

GIBERT, O.; LEFÈVRE, B.; FERNÁNDEZ, M.; BERNAT, X.; PARAIRA, M.; CALDERER, M.; MARTÍNEZ-LLADO, X.; Characterising biofilm development on granular activated carbon used for drinking water production. **Water Research**, v. 47, p. 1101-1110, 2013

GORDON, O.; SLENTERS, T. V.; BRUNETTO, P. S.; VILLARUZ, A. E.; STURDEVANT, D. E.; OTTO, M.; LANDMANN, R.; FROMM, K. M.; Silver coordination polymers for prevention of implant infection: Thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 4208-4218, 2010

GU, H.; Patterned biofilm formation to investigate bacteria-surface interactions. Dissertation, Syracuse University, 2014

GUO, Y.; ROCKSTRAW, A. D.; Physicochemical properties of carbons prepared from pecan shell by phosphoric acid activation. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1513–1521, 2007

HENDRICK, D. W.; Water treatment unit processes: Physical and chemical, 1<sup>st</sup> ed. 2006, p. 744

HEYDORN, A.; ERSBOLL, B.; HENZTZER, M.; Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms. **Microbiology**, v. 146, p. 2409–15, 2000

ISHIZAKI, C.; MARTY, I.; Surface oxide structures on a commercial activated carbon. **Carbon**, v. 19, n. 6. p. 409-412. 1981

JEONG, S. J.; YOON, S. S.; BAE, I. K.; JEONG, S. H.; KIM, J. M.; LEE, K.; Risk factors for mortality in patients with bloodstream infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact of bacterial virulence and strains on outcome. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, p. 1- 6, 2014

JUNG, K. W.; KOO, H. C.; KIM, K. W.; SHIN, S.; KIM, S. H.; PARK, Y. H.; Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 7, p. 2171–2178, 2008

KENNEDY, L. J.; KUMAR, A. G.; RAVINDRAN, B.; SEKARAN, G.; Copper impregnated mesoporous activated carbon as a high efficient catalyst for the complete destruction of pathogens in water. **Environmental Progress**, v. 27, n. 1, 2008

KEYASHIAN, M.; Chapter 17 – Water Systems for Pharmaceutical Facilities Fermentation and Biochemical Engineering Handbook, 3<sup>rd</sup> Ed., 363–376, 2014

LEMIRE, J. A.; HARRISON, J. J.; RAYMOND, J. T.; Turner. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nature Review Microbiology**, p. 1-14, 2013

LIAKAKOU, E. T.; HERACLEOUS, E.; TRIANTAFYLLIDIS, K. S.; LEMONIDOU, A. A.; K-promoted Ni-Mo catalysts supported on activated carbon for the hydrogenation reaction of CO to higher alcohols: Effect of support and active metal. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 165, p. 296–305, 2015

LI, L.; QUINLIVAN, P. A.; KNAPPE, D. R. U.; Effects of activated carbon surface chemistry and pore structure on the adsorption of organic contaminants from aqueous solution. **Carbon**, v. 40, p. 2085–2100, 2002

LI, P.; AILIJANG, N.; CAO, X.; LEI, T.; LIANG, P.; ZHANG, X.; HUANG, X.; TENG, J.; Pretreatment of coal gasification wastewater by adsorption using activated carbons and activated coke. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 482, p. 177–183, 2015

LIN, Y. E.; VIDIC, R. D.; STOUT, E. J.; YU, V. L.; Negative effect of high pH on biocidal efficacy of copper and silver ions in controlling *Legionella pneumophila*. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2711-2715, 2002

LOUREIRO, L. F. **Avaliação de adsorção do herbicida 2,4-D em carvão ativado em pó e granular por meio de análises de isotermas de adsorção utilizando diferentes qualidades de água**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES, 2012

LOVEDAY, H. P.; WILSON, J. A.; KERR, K.; PITCHERS, R.; WALKER, J. T.; BROWN, J.; Association between healthcare water systems and *Pseudomonas aeruginosa* infections: a rapid systematic review. **Journal of Hospital Infection**, v. 86, p. 7-15, 2014

LU, M.; WU, X. J.; ZENG, D. C.; LIAO, Y.; Distribution of PCDD/Fs and organometallic compounds in sewage sludge of wastewater treatment plants in China. **Environmental Pollution**, v. 171, p. 78-84, 2012

LUTSENKO, S.; LE SHANE, E. S.; SHINDE, U.; Biochemical basis of regulation of human copper-transporting ATPases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 463, 134–148, 2007

MAHORE, J. G.; WADHER, K. J.; UMEKAR, M. J.; Ion exchange resins: Pharmaceutical applications and recent advancement. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 1, p. 8-13, 2010.

MALACHOVÁ, K.; PRAUS, P.; RYBKOVÁ, Z.; KOZÁK, O.; Antibacterial and antifungal activities of silver, copper and zinc montmorillonites. **Applied Clay Science**, v. 53, p. 642–645, 2011

MARTIN, R. J.; SHACKLETON, R. C.; Comparison of two partially activated carbon fabrics for the chlorine and other impurities from water. **Water Research**, v. 24, n. 4, p. 477-484, 1990

MARSH, H.; RODRÍGUEZ-REINOSO, F. **Activated Carbon**. Elsevier: Oxford, UK, Amsterdam, The Netherlands, San Diego, CA, London. First Edition, v. 1, 2006

MAURIN, G.; Modelling of Physisorption in Porous Solids. **Adsorption by Powders and Porous Solids**, 2° ed., p. 191–235, 2014

MILLER, C. J.; WILSON, L. G.; AMY, G. L.; BROTHERS, K.; Fate of organochlorine compounds during aquifer storage and recovery: The Las Vegas experience. **Ground Water**, v. 31, n. 3, p. 410-413, 1993

MIZAN, M.F.R.; JAHID, I.K.; HA, S.D.; Microbial biofilms in seafood: a food-hygiene challenge, **Food Microbiology**, v. 49, p. 41-55, 2015

NA, L.; JIAN, Z.; QING-FANG, C.; Activated carbon surface groups qualitative and quantitative analysis. **Chemical journal of chinese universities**, v. 23, n. 3 p.548-554, 2012

NIEDERSBERG, C.; **Ensaio de adsorção com carvão ativado produzido a partir da casca do tungue (*Aleurites fordii*), resíduo do processo de produção de óleo**. Dissertação de mestrado, Universidade de Santa Cruz do Sul, 2012.

NOWICKI, P.; KAZMIERCZAK, J.; PIETRZAK, R.; Comparison of physicochemical and sorption properties of activated carbons prepared by physical and chemical activation of cherry. **Stones Powder Technology**, v. 269, p. 312–319, 2015

OKMAN, I.; KARAGÖZ, S.; TAY, T.; ERDEMB, M.; Activated carbons from grape seeds by chemical activation with potassium carbonate and potassium hydroxide. **Applied Surface Science**, v. 293, p. 138-142, 2014

OLIVEIRA, L. F. S.; **Estudo da formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* em carvão ativado impregnado com prata**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Goiás, 2014

OZDEMIR, I.; SAHIN, M.; ORHAN, R.; ERDEM, M.; Preparation and characterization of activated carbon from grape stalk by zinc chloride activation. **Fuel Processing Technology**, v. 125, p. 200–206, 2014

PARK, S. H., Mc CLAIN, S.; TIAN, Z. R.; SUIB, S. L.; KARWACKI, C.; Surface and Bulk Measurements of Metals Deposited on Activated Carbon. **Chemistry of Materials**, v. 9, p. 176-183, 1997

PEREIRA, E.; OLIVEIRA, L. C. A, VALLONE, A.; SAPAG, K.; PEREIRA, M.; Preparação de carvão ativado em baixas temperaturas de carbonização a partir de rejeitos de café: utilização de FeCl<sub>3</sub> como agente ativante. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1296-1300, 2008

POYTON, R. O.; MC EWEN, J. E.; Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, p. 563-607, 1996

PRIYA, J. L.; PRAJNA, L.; MOHANKUMAR, V.; Genotypic and phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from post-cataract endophthalmitis patients. **Microbial Pathogenesis**, v. 78, p. 67-73, 2015

RAMAN, N.; JEYAMURUGAN, R.; SUDHASAN, S.; KARUPPASAMY, K.; MITU, L.; Metal based pharmacologically active agents: Synthesis, structural elucidation, DNA interaction, in vitro antimicrobial and in vitro cytotoxic screening of copper(II) and zinc(II) complexes derived from amino acid based pyrazolone derivatives. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 6, p. 235-247, 2013

RANDERATH, K.; YANG, P. F.; DANNA, T. F.; REDDY, R.; WATSON, W. P.; RANDERATH, E.; Bulky adducts detected by <sup>32</sup>P-postlabeling in DNA modified by oxidative damage in vitro. Comparison with rat lung I-compounds. **Mutation Research**, v. 250, p. 135-144, 1991

RENNER, L. D.; WEIBEL, D. B.; Physicochemical regulation of biofilm formation. **Materials Research Society**, v. 36, p. 347-355, 2011

RIETVELD, L. C.; MEIJER, L.; SMEETS, P. W. M. H.; VAN DER HOEK, J. P.; Assessment of Cryptosporidium in wastewater reuse for drinking water purposes: A case study for the city of Amsterdam, The Netherlands. **Water**, v. 35, n. 2, p. 211-215, 2009

RIGOBELLO, E. S.; DANTAS, A. D. B.; DI BERNARDO, L.; VIEIRA, E. M.; Removal of diclofenac by conventional drinking water treatment processes and granular activated carbon filtration. **Chemosphere**, v. 92, p. 184-191, 2013

SABHARWAL, N.; CHHIBBER, S.; HARJAI, K.; New possibility for providing protection against urinary tract infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* by non-adjuvanted flagellin 'b' induced immunity. **Immunology Letters**, v. 162, p. 229–238, 2014

SAKA, C.; BET, TG-DTG, FT-IR, SEM, iodine number analysis and preparation of activated carbon from acorn shell by chemical activation with ZnCl<sub>2</sub>. **Journal of analytical and applied pyrolysis**, v. 95, p. 21-24, 2012

SANDSTEAD, H. H.; Human Zinc Deficiency: Discovery to Initial Translation. **Advances Nutrition**, v. 4, n. 1, p. 76-81, 2013

SANDSTEAD, H. H.; PENLAND, J.G.; ALCOCK, N.W.; DAYAL, H. H, CHEN, X. C.; LI, J. S. ; ZHAO, F.; YANG, J. J.; Effects of repletion with zinc and other micronutrients on neuropsychologic performance and growth of Chinese children. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 470-475, 1998

SAUER, K.; CAMPER, A. K.; EHRlich, G. D.; COSTERTON, J. W.; DAVIES, D. G.; *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **Bacteriology**, v. 184, n. 4 1140-1154, 2002

SAVAGE, N.; DIALLO, M.; DUNCAN, J.; STREET.; SUSTICH, R.; **Nanotechnology Applications for Clean Water**, ed. William Andrew Inc., p. 3-15, 2009

SCHETTINO, A. M. J.; **Ativação química do carvão de casca de arroz utilizando NaOH**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2004

SHARMA, G.; RAO, S.; BANSAL, A.; DANG, S.; GUPTA, S.; GABRANI, R.; *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets. **Biologicals**, p. 1-7, 2013

SHOAI B, M.; AL-SWAIDAN, H.; Optimization and characterization of sliced activated carbon prepared from date palm tree fronds by physical activation. **Biomass and Bioenergy**, v. 73, p. 124-134, 2015

SILVA, A. S. **Avaliação da Capacidade de Remoção de Saxitoxinas por Diferentes Tipos de Carvão Ativado em Pó (CAP) Produzidos no Brasil**. Universidade de Brasília. Dissertação de mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, 2005

SILVA, C. H. P. M.; LINS, A. P.; CRUZ, C. S. O.; GREENBERG, W.; STEWART, T.; Caracterização dos biofilmes formados em filtros de carvão ativado de sistemas de purificação de água em laboratórios clínicos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, n. 4, p. 243-253, 2006

SING, K. S. W.; EVERETT, D. H.; HAUL, R. A. W.; MOSCOU, L.; PIEROTTI, R. A.; ROUQUEROL, J.; SIEMIENIEWSKA, T.; Reporting Physisorption Data For Gas/Solid Systems With Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity, **Pure & Applied Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 603-619, 1985

SINGH, P. K.; WELSH, M. J.; GREENBERG, E. P.; **Methods of inhibiting and treating bacterial biofilms by metal chelators**. United States Patent Application Publication, 2013.

SMALLMAN, R. E.; NGAN, A. H. W.; Atoms and Atomic Arrangements. **Modern Physical Metallurgy**, ed. 8<sup>a</sup>, p. 1- 41, 2014

SOUSA, J. C.; PANA, J. B.; PAJARES, J. A.; PIS, J. J.; Activated carbons from semianthracite by steam activation. Effect of coal preoxidation and burn-off. **Studies in Surface Science and Catalysis**, v. 87, p. 603-612, 1994

STRATCHOUNSKIL, L.; KOZLOV, R. S.; RECHEDKO, G. K.; STETSIOUKL, O. U.; CHAVRIKOVA, E. I.; Antimicrobial resistance patterns among aerobic Gram-negative bacilli

isolated from patients in intensive care units: results of a multicenter study in Russia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 4, n. 9, 1998

SWAIN, P.; NAYAK, S. K.; SASMAL, A.; BEHERA, T.; BARIK, S. K.; SWAIN, S. K.; MISHRA, S. S.; SEN, A. K.; DAS, J. K.; JAYASANKAR. Antimicrobial activity of metal based nanoparticles against microbes associated with diseases in aquaculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 2491–2502, 2014

TIAN, G.; WANG, W.; MUA, B.; KANG, Y.; WANG, A.; Facile fabrication of carbon/attapulgite composite for bleaching of palm oil. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, p. 1–7, 2015

TIAN, Y.; ZHENG, Y.; WU, B.; WU, X.; LIU, J.; ZHENG, C.; Modeling surface water-groundwater interaction in arid and semi-arid regions with intensive agriculture. **Environmental Modelling & Software**, v. 63 p. 170-184, 2015

TRINH, T. K.; KANG, L. S.; Response surface methodological approach to optimize the coagulation–flocculation process in drinking water treatment. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, p. 1126-1135, 2011

TSUJI, A.; KANEKO, Y.; TAKAHASHI, K.; OGAWA, M.; GOTO, S.; The effects of temperature and pH on the growth of eight enteric and nine glucose non-fermenting species of gram-negative rods. **Microbiology and Immunology**, v. 26, p.15-24, 1982

TSUNEDA, S.; AIKAWA, H.; HAYASHI, H.; YUASA, A.; HIRATA, A.; Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. **FEMS Microbiology Letters**, v. 223, p. 287-292, 2003

VALH, J. V.; LE MARECHAL, A. M.; VAJNHANDL, S.; JERIC, T.; SIMON, E.; **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences Treatise on Water Science**, v. 4, Maribor, Slovenia, p. 685-706, 2011

VAN DER MERWE, M. M.; BANDOSZ, T. J.; A study of ignition of metal impregnated carbons: the influence of oxygen content in the activated carbon matrix, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 282, p. 102–108, 2005

VELÁZQUEZ-TRUJILLO, A.; BOLAÑOS-REYNOSO, E.; PLIEGO-BRAVO, Y. S.; Optimization of activated carbon production from bamboo. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 9, n. 3, p. 359-366, 2010

XIANG, T. S.; ZAO, T. S.; LIANG, L. Y.; PING, J. F.; SHENG, Y. D.; Preparation and antibacterial property of copper loaded activated carbon microspheres. **Journal of Inorganic Materials**, p. 299-305, v. 25, n. 3, 2010.

WALLIS, C.; STAGG, C. H.; MELNICK, J. L. The hazards of incorporating charcoal filters into domestic water systems. **Water Research**, v. 8, p. 111 – 113, 1974

WANG, X.; GAO, Y.; WANG, J.; WANG, Z.; CHEN, L.; Functionalized graphene as Chemical Adsorbers of Polysulfides. **Nano Energy**, v. 12, p. 810–815, 2015

WILLIAMS Q. Water, the Solid Earth, and the Atmosphere: The Genesis and Effects of a Wet Surface on a Mostly Dry Planet. **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, from Treatise on Geophysics**, v. 9, p. 121-143, 2007

WINKLER, A.; HOPMAN, R.; LAWRENCE, D.; MILLIGAN, J. A.; NAPPER, D.; O'BRIEN, D.; VAN BUREN, A. M. VAN EIJK, H. M. J.; VAN TONGEREN, W. G. J. M.; Safe and hygienic water treatment in food factories. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 568–573, 2005

WU, M.; GUO, Q.; FU, G.; Preparation and characteristics of medicinal activated carbon powders by CO<sub>2</sub> activation of peanut shells. **Powder Technology**, v. 247, p. 188-196, 2013

YANG, T.; LUA, A. C.; Characteristics of activated carbons prepared from pistachio-nut shells by physical activation. **Journal of Colloid and Interface Science**, n. 267, p. 408–417, 2003

YORGUN, S.; YILDIZ, D.; Preparation and characterization of activated carbons from Paulownia wood by chemical activation with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 53, p.122-131, 2015

ZHANG, D.Y.; LI, W. G.; ZHANG, S. M.; LIU, M.; ZHAO, X. Y.; ZHANG, X. C.; Bacterial Community and Function of Biological Activated Carbon Filter in Drinking Water Treatment. **Biomedical Environmental Science**, v. 24, n. 2, p. 122-131, 2011

ZHANG, J.; AMINI, A.; O'NEAL, J.; BOYER, T. H.; ZHANG, Q.; Development and validation of a novel modeling framework integrating ion exchange and resin regeneration for water treatment. **Water Research**, v. 84, p. 255-265, 2015

ZHAO, Y.; WANG, Z.; ZHAO, X.; LI, W.; LIU, S.; Antibacterial action of silver-doped activated carbon prepared by vacuum impregnation. **Applied Surface Science**, v. 266, p. 67- 72, 2013

ZHU, J.; DENG, B.; YANG, J.; GANG, D.; Modifying activated carbon with hybrid ligands for enhancing aqueous mercury removal. **Carbon**, v. 47, p. 2014 - 2025, 2009

ZUIM, D. R.; CARPINÉ, D.; DISTLER, G. A. R.; SCHEER, A. P.; P.; MAFRA, L. I.; MAFRA, M. R.; Adsorption of two coffee aromas from synthetic aqueous solution onto granular activated carbon derived from coconut husks. **Journal of Food Engineering**, n. 104, p. 284–292, 2011.

## 9 ANEXOS

### Anexo A: Catálogo do carvão ativado impregnado com 0,5% de prata da Calgon Carbon®.



# 1184

0.5% Silver Impregnated Activated Carbon

### Description

Type 1184 is a silver-impregnated coconut shell activated carbon specifically designed for bacteriostatic properties and trace removal. It is manufactured from coconut shells by high-temperature steam activation under rigidly controlled conditions. The silver impregnation of type 1184 carbon imparts bacteriostatic properties that inhibit bacterial growth on the carbon filter media. Silver exhibits a self-sterilizing property called the oligodynamic effect that, although not fully understood, is recognized as an effective method for controlling microbial growth. The coconut base carbon substrate is specifically designed to be effective for adsorbing trace organic compounds such as trihalomethanes (THMs) and pesticides, as well as disinfection by-products and taste and odor compounds. The product is registered by the US EPA (#58295-3).

### Typical Properties

1184

|                                 |           |
|---------------------------------|-----------|
| Ball Pan Hardness [ASTM D-3802] | 98        |
| Ash Content [ASTM D-2866]       | 4% w/w    |
| Bulk Density [ASTM D-2854]      | 0.48 g/cc |
| Moisture Content [ASTM D-2867]  | < 5% w/w  |
| US Mesh Size [ASZM D-2862]      | 20x50*    |

\*20x50 is a standard mesh size. Please inquire about alternative particle sizes available

### Typical Pressure Drop

*Based on Backwashed and Segregated Bed*

## Anexo A1: Descrição e especificações técnicas do carvão ativado pela Calgon carbon®.

PRODUCT BULLETIN



### FILTRASORB® 400-M

Granular Activated Carbon for Municipal Specifications

#### Description

FILTRASORB 400-M is a granular activated carbon (GAC) developed by Calgon Carbon Corporation for the removal of contaminants from municipal drinking water. These contaminants include taste and odor compounds such as MIB and Geosmin, organic compounds known to be precursors to disinfection byproduct (DBP) formation, DBP compounds such as haloacetic acids and trihalomethanes, contaminants of emerging concern (CECs), such as endocrine disrupting compounds (EDCs) and pharmaceutical and personal care products (PPCPs), and other targeted organic contaminants.

This activated carbon is manufactured from select grades of bituminous coal through a process known as reagglomeration to produce a durable granular product capable of withstanding the abrasion associated with repeated backwashing, air scouring, hydraulic transport, and thermal reactivation. Activation is carefully controlled as measured by the iodine number for effective adsorption of a broad range of high and low molecular weight organic contaminants. The higher density of FILTRASORB brand GAC results in a product with both a greater adsorptive capacity on a volume basis and a longer life through multiple reactivation cycles.

#### Specifications

#### FILTRASORB 400-M

|  |                 |
|--|-----------------|
| Iodine Number                          | 1000 mg/g (min) |
| Moisture by Weight                     | 2% (max)        |
| Effective Size                         | 0.55 - 0.75 mm  |
| Uniformity Coefficient                 | 1.9 (max)       |
| Abrasion Number                        | 75 (min)        |
| Trace Capacity Number                  | 10 mg/cc (min)  |
| Screen Size by Weight, US Sieve Series |                 |
| On 12 mesh                             | 5% (max)        |
| Through 40 mesh                        | 4% (max)        |

#### Typical Properties\*

#### FILTRASORB 400-M

|                    |           |
|--------------------|-----------|
| Apparent Density   | 0.54 g/cc |
| Water Extractables | <1%       |
| Non-Wettable       | <1%       |

\*For general information only, not to be used as purchase specifications.