

I-109 – DESINFECÇÃO MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE ZINCO ENCAPSULADAS EM ZEÓLITA

Luciano André Deitos Koslowski⁽¹⁾

Engenheiro Químico pela Universidade Regional de Blumenau- FURB, Mestre em Química pela Universidade Regional de Blumenau-FURB. Doutor em Engenharia Química pela Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Docente do Centro de Educação do Alto Vale do Itajaí-CEAVI, Universidade do Estado de Santa Catarina-UDESC.

Adrieny Taliny Comper⁽²⁾

Graduada de Engenharia Sanitária pelo Centro de Educação do Alto Vale do Itajaí-CEAVI, Universidade do Estado de Santa Catarina-UDESC. Bolsista do Programa de Iniciação à Pesquisa (PROIP/UDESC).

André Lourenço Nogueira⁽³⁾

Engenheiro Químico pela Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC. Doutorado em Engenharia Química pela Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC. Pós-Doutorado em Engenharia Química-UFSC. Docente Pesquisador do Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos da Universidade da Região de Joinville-Univille.

Marian Natalie Meisen⁽⁴⁾

Bióloga pela Universidade Regional de Blumenau- FURB, Mestre em Engenharia Ambiental pela Universidade Regional de Blumenau-FURB. Pesquisadora da Universidade Regional de Blumenau-FURB.

Silvana Licodiedoff⁽⁵⁾

Engenheira de Alimentos pela Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai das Missões-URI. Doutora em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal do Paraná-UFPR. Pós-Doutorado pelo Programa de Engenharia de Alimentos –UFSC. Docente Pesquisadora do Departamento de Engenharia Química da Universidade Regional de Blumenau-FURB.

Endereço⁽¹⁾: Rua Getúlio Vargas, 2822 – Bela Vista – Ibirama – SC- CEP: 89.217-365 - Brasil - Tel: (47) 3357-8484 - e-mail: luciano.koslowski@udesc.br

RESUMO

A importância da água na manutenção da vida deve ser considerada indispensável para o desenvolvimento econômico, manutenção dos ciclos biológicos, geológicos e químicos, além de manter em equilíbrio os ecossistemas. O aumento de doenças hídricas relacionadas à água representa segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), quase 25% de todos os leitos hospitalares do mundo. Neste contexto pesquisas tem sido intensamente desenvolvidas para enfrentar os problemas associados à qualidade das águas. A utilização da nanotecnologia no tratamento de água e efluentes tem sido amplamente explorada para aplicação como agente antibacteriano, constituindo uma proposta vantajosa devida a sua excelente eficiência bactericida e fungicida. O presente estudo visa investigar e comparar a utilização de nanopartículas de zinco (ZnONPs) funcionalizadas com nanopartículas de zinco encapsuladas em zeólita (ZnNPZe) como forma de avaliação da atividade antibacteriana no tratamento de água contaminada com a bactéria Gram negativa *E.coli* . (organismo indicador de contaminação fecal). O estudo buscou comprovar o efeito bactericida das nanopartículas de zinco, empregando as variáveis tempo de residência (1, 2 e 3 h), temperatura (25 e 35°C) e condição de agitação. Os resultados demonstram que a cinética de desinfecção apresenta resultados mais significativos para o tempo de residência de 3h, cuja redução da atividade antimicrobiana foi de 85,12% para as nanopartículas de ZnONP e 94,12% para as nanopartículas funcionalizadas de ZnONPZe. Os dados obtidos sugerem que o agente antibacteriano nanoestruturado e sintetizado neste trabalho apresentou relevante ação bactericida.

PALAVRAS-CHAVE: Nanopartículas, Zinco, Desinfecção da água, Zeólita, Cinética.

INTRODUÇÃO

Recentemente a preparação de nanopartículas tem recebido uma grande atenção por parte da comunidade acadêmica devido às propriedades catalíticas, ópticas, eletrônicas, magnéticas e bactericidas (Sifontes, 2010). As propriedades diferenciadas que muitos materiais apresentam quando em escala manométrica, comparadas aos de dimensões micrométricas, têm como um dos motivos principais a alta relação entre superfície e volume,

determinando que ocorra um aumento no número de átomos que estão na região interna das partículas (Zarbin, 2007).

Talebian, 2013, reporta o efeito antibacteriano das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) frente a um amplo espectro de microrganismos. Desta forma os autores empregaram cinco tipos de cepas bacterianas *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Escheria coli*, *Enterococcus faecalis*, e *Bacillus subtilis*, e seis materiais nanoestruturados provenientes de diferentes óxidos metálicos: MgO, TiO₂, Al₂O₃, CuO, CeO₂ e ZnO. De acordo com os resultados obtidos pelos autores, as nanopartículas de MgO, TiO₂, CuO e CeO₂ causaram apenas uma sutil inibição do crescimento das bactérias. Por outro lado, as nanopartículas de ZnO levaram a uma significativa inibição do crescimento bacteriano. No que tange os resultados alcançados neste estudo, os autores concluíram que as nanopartículas de ZnO possuem grande potencial para uso como agente bacteriostático, podendo ter aplicações inclusive no controle de infecções.

Portanto, uma das superfícies na qual as nanopartículas de zinco podem ser aderidas é a zeólita, que são aluminossilicatos hidratados constituídos por estruturas cristalinas em três dimensões de tetraedros de SiO₄ e de AlO₄, interligados pelos quatro vértices por oxigênio. Nesta configuração, as cargas negativas dos tetraedros de AlO₄ são compensadas por cátions intersticiais (Na⁺, K⁺, Ca²⁺ e Ba²⁺) resultando em uma estrutura com grandes cavidades (canais), a qual a água e outras moléculas sofrem dessorção com potencial movimentação, permitindo assim a troca iônica e hidratação reversível (DANA 1981). Portanto, após a etapa de aquecimento, as moléculas de água nos canais desprendem-se facilmente e de maneira contínua, deixando a estrutura intacta. Após a desidratação completa da zeólita, os canais podem ser preenchidos novamente com água ou outras substâncias.

O presente trabalho apresenta o desenvolvimento de metodologia para obtenção de nanopartículas de óxido de zinco encapsuladas em zeólita 4 A, com a finalidade de serem testadas no tratamento de água para consumo por meio de avaliação da cinética de desinfecção microbiológica.

Os estudos presumem que a utilização das nanopartículas de zinco encapsuladas na zeólita 4 A vislumbra em novas possibilidades de manipulação, processamento e combinação de materiais proporcionando aplicações com funcionalidades interessantes no processo de desinfecção de água para consumo humano.

MATERIAIS E MÉTODOS

No presente estudo foi realizada na primeira etapa a síntese e encapsulamento das nanopartículas de óxido de zinco na zeólita 4 A. Na segunda etapa foram realizados os ensaios microbiológicos para comparar a atividade antibacteriana empregando como espécie indicadora a bactéria *Escherichia coli*.

PRIMEIRA ETAPA: SÍNTESE E ENCAPSULAMENTO DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO NA ZEÓLITA 4 A

O desenvolvimento de nanoestruturas com propriedades antibacterianas para aplicações diversas, tem sido amplamente estudado pela utilização de diversos materiais como as nanopartículas de prata (Nogueira et al., 2014), óxido de zinco (Liu et al., 2009), dióxido de titânio (Xing et al., 2012) e dióxido de estanho (Talebian et al., 2014). Neste sentido, o presente estudo realizou a síntese das nanopartículas de zinco e posterior encapsulamento na zeólita 4A, de forma a avaliar a atividade antibacteriana. Os testes foram realizados na Universidade da Região de Joinville-Univille, no Laboratório de Meio Ambiente, na cidade de Joinville-SC no período de abril a outubro de 2016. A primeira etapa deste estudo foi promover a síntese da zeólita por meio da adição de 0,8 g de hidróxido de sódio (NaOH) dissolvidos em 80 mL de água deionizada. A solução foi dividida em duas partes iguais (45 mL cada), cuja primeira fração recebeu 17,4 g de silicato de potássio e 8,0 g de alumina, sob agitação até completa homogeneização. Na etapa seguinte procedeu-se a mistura das duas frações até completa formação de gel. O material proveniente da mistura foi transferido para um reator de aço e mantido em estufa por um período 5 horas a temperatura de 100°C. O produto obtido, foi adicionado em acetato de zinco dihidratado (CH₃COO)₂Zn·2H₂O (99,995%) como sal precursor, monoetilenoglicol como agente redutor, poli(vinil pirrolidona) – PVP (Mw = 55.000 g.mol⁻¹), como agente estabilizante, e água deionizada como iniciador das reações de hidratação e condensação responsáveis pela nucleação das nanopartículas.

A síntese das nanopartículas de ZnO foi realizada em um reator de borossilicato de 250 ml fixado em um condensador de refluxo instalado para evitar a emissão de gases. Inicialmente, adicionou-se no sistema reacional o monoetileno glicol (100 mL), seguido pelo acetato de zinco di-hidratado (8,76 g), sendo o sistema mantido com agitação contínua e temperatura ambiente até a completa solubilização do sal precursor. Na etapa seguinte, procedeu-se a adição de 1,0 g de PVP seguido de 1,0 mL de água deionizada. A amostra obtida foi submetida à caracterização de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

SEGUNDA ETAPA: ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

Nesta etapa, realizada no laboratório de Microbiologia da Universidade Regional de Blumenau-FURB foi utilizado cepa da *E.coli* imersa em caldo TSB com a transferência de 200 μ L para um tubo com 3 mL de solução de NaCl 0,85%. Desta forma a solução atingiu turbidez correspondente a 0,5 na escala de McFarland (109 bactérias por mL do meio). A solução obtida foi espalhada em placas com Ágar Muller Hinton e o pó nanoestruturado diluído em 200 μ L de água em um vidro de relógio com a solução mantida em contato com papel filtro para absorção desta solução. Os papéis filtros foram depositados no centro da placa já inoculada com a bactéria. As placas foram mantidas incubadas no período de 24h na faixa de temperatura de 35-37°C, sendo posteriormente avaliadas quanto à presença de halos de inibição.

Os testes de avaliação antibacteriana das ZnONP e ZnONPZe foram realizadas conforme metodologia preconizada no Standard Methods (ASTM E2149) por meio do modelo de contagem do Número Mais provável (NMP), utilizando a bactéria *E.coli* como bioindicador de contaminação fecal. A espécie *E. coli* corresponde a um grupo de bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, com temperatura ótima de crescimento de 35 a 37°C. Neste sentido, pretendeu-se analisar os efeitos das ZnNP e ZnNPZe na taxa de mortalidade destes microorganismos.

A análise de controle foi realizada empregando frascos estéreis graduados com capacidade para 100 mL, e flaconetes com meio de cultura, com cartelas estéreis com 97 cavidades e seladora Quanti-Tray, marca IDEXX. A análise de quantificação foi realizada meio da inserção de 3,0 g do pó nanoestruturado em 100 ml de água deionizada e esterilizada. A preparação do inóculo foi realizada solubilizando 0,8 g de ágar bacteriológico em 100 mL de água destilada.

A solução foi autoclavada durante o intervalo de tempo de 15 min a 121°C e pressão de 10 kg/cm². A solução obtida foi mantida em cabine de segurança biológica, com certa quantidade desconhecida de bactérias *E.coli* e incubada por 18h à temperatura de 37°C e agitação de 130 rpm.

Durante o período de incubação, a solução apresentou aspecto visual turvo, sendo comprovado o crescimento bacteriológico. Na etapa final foi adicionado 1 ml de solução aquosa diluída de *E.coli* para o tempo de 3 horas sob agitação e temperatura controlada de 35°C.

RESULTADOS OBTIDOS

As nanopartículas de óxido de zinco encapsuladas na zeólita foram caracterizadas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (Shimadzu, modelo SSX-550) para avaliação morfológica quanto a sua forma geométrica e tamanho médio conforme apresentado na Figura 1.

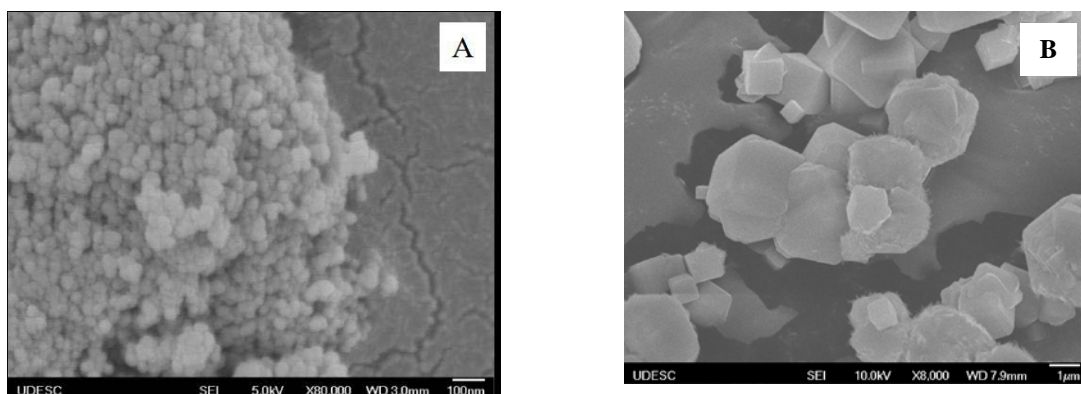


Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura: ZnONP(a)-ZnONPZe(b)

As características morfológicas das nanopartículas visualizadas nas imagens de microscopia apresentadas na Figura 1(a) indicam que as nanopartículas de óxido de zinco apesar de se apresentarem aglomeradas na forma de um fino pó seco, apresentam tamanho médio de grãos inferior a 50 nm (Tuzecumen, 2013). A Figura 1(b) apresenta cristais típicos da zeólita, de faces cristalinas características tamanho variando na faixa de 1 μ m. Neste sentido, não foi detectada por meio desta técnica a presença de material amorfo, sendo o processo de síntese da zeólita a razão estequiométrica de $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ diretamente proporcional a velocidade de crescimento do cristal (Shao, 2002).

A atividade antibacteriana foi avaliada empregando como método qualitativo o teste de disco-difusão em ágar. Os testes foram realizados empregando como padrão uma concentração de 100 ppm de nanopartículas de óxido de zinco para análise do crescimento das colônias de bactérias nas placas de Petri conforme apresentado nas Figuras 2(a)- ZnONP, 2(b)- ZnONPZe a temperatura de 35°C.

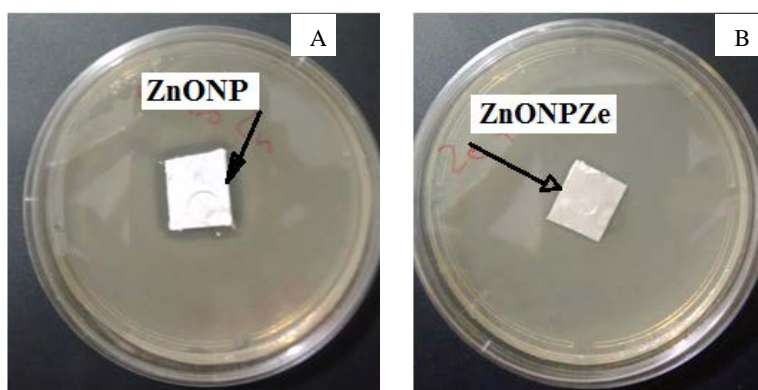


Figura 2: Teste disco-difusão em ágar: ZnONP(a)-ZnONPZe(b)

Os resultados evidenciam a formação do halo de inibição para o óxido de zinco sintetizado bem como aquele encapsulado com a zeólita.

Na etapa seguinte, foram designadas as análises em triplicata utilizando as seguintes variáveis: agitação, tempo de residência (1h-2h-3h) e temperatura (35°C), com o objetivo de avaliar a maior taxa de desinfecção de *E.coli*. Os dados obtidos permitiram comparar a funcionalidade das nanopartículas de óxido de zinco em pó (ZnONP) e nanopartículas de óxido de zinco encapsulado em zeólita (ZnONPZe). Os dados comparativos da eficiência de desinfecção estão apresentados na Figura 3.

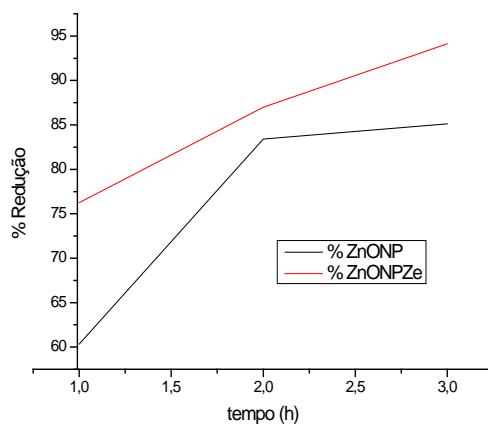


Figura 3: Redução de *E. Coli* para a cinética de desinfecção com ZnONP e ZnONPZe.

Os dados da cinética de desinfecção indicam que os resultados mais significativos foram obtidos com o tempo de residência de 3h, cuja redução da atividade antimicrobiana foi de 85,12% para as nanopartículas de ZnONP e 94,12% para as nanopartículas de ZnONPZe. Os dados obtidos sugerem que o agente antibacteriano nanoestruturado e sintetizado neste trabalho apresentou relevante ação bactericida. O óxido de zinco sintetizado e empregado nestes ensaios, por se encontrar na escala nanométrica de tamanho, possui uma elevada relação área superficial-volume, sendo assim capaz de promover uma maior taxa de mortalidade de bactérias. Li et al. (2011), sugere que as ZnONPs são capazes de promover ruptura de um grande número de membranas celulares bacterianas, resultando na quebra do conteúdo intracelular por meio da liberação de íons Zn^{2+} que interrompe vários processos celulares em bactérias gram-negativas. A maior eficiência da cinética de desinfecção por meio do encapsulamento das nanopartículas na zeólita 4A pode ser justificada pela estrutura tridimensional (tectossilicatos) formados por canais e cavidades, permitindo deste modo a adsorção química e a troca iônica dos íons Zn^{2+} no sítio ativo da zeólita (Shamelli, 2011). Neste contexto, sugere-se associar o aumento da área ativa das nanopartículas (ZnONPZe) nestas cavidades e significativo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) diretamente relacionada aos mecanismos de letalidade das células bacterianas.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que as nanopartículas de ZnONPs são capazes de promover ruptura de um grande número de membranas celulares bacterianas, resultando na quebra do conteúdo intracelular por meio da liberação de íons Zn^{2+} que interrompe vários processos celulares em bactérias gram-negativas. Desta forma percebe-se que a interação química entre ZnONPs e a membrana celular da bactéria, permite uma interação física entre as nanopartículas de óxido de zinco e a membrana celular da bactéria, sendo possível afirmar que o tempo de contato influencia na redução da atividade microbiana. Comprovou-se também, que a temperatura deve ser considerada quando o intuito é promover a seleção de espécies. Por fim, ressalta-se que seja necessária sequência aos estudos, com a finalidade de atingir os padrões impostos pela Portaria vigente (MS 2.914/2011), garantindo a potabilidade necessária para o abastecimento humano no quesito avaliado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA; AWWA; WEF. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 2005. Washington.
2. LIU, Y.; HE, L.; MUSTAPHA, A.; LI, H.; HU, Z.Q.; LIN, M. Antibacterial Activities of Zinc Oxide Nanoparticles Against Escherichia coli O157:H7. *J. Appl. Microbiol.*, v. 107, p. 1193-1201, 2009.
3. NOGUEIRA, A.L.; MACHADO, R.A.F.; DUTRA, G.B.; SOUZA, A.Z.; FRANCO, C.V. Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Produced with a Bifunctional Stabilizing Agent, *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 53, p. 3426-3434, 2014.
4. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-
5. Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite
6. 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
7. SHAMELLI, K.; AHMAD, M.B.; ZARGAR, M.; YUNUS, W. M. Z. W.; IBRAHIM, N. A. Fabrication of silver nanoparticles doped in the zeolite framework and antibacterial activity. *International Journal of Medicine*. p. 331-341, doi:10.2147/IJN.S16964., 2011.
8. SHAO, C.; KIM HY, Li X.; PARK S.J.; LEE DR. Synthesis of high-silica-content mordenite with different SiO_2/Al_2O_3 ratios by using benzene-1, -diol as additives, *Materials Letters*. Set: 56 (1-2) 24-29, doi:10.1016/S0167-577X(02)00411-1., 2002.
9. TALEBIAN, N.; AMININEZHAD, S.M.; DOUDI, M. Controllable Synthesis of ZnO Nanoparticles and Their Morphology-Dependent Antibacterial and Optical Properties. *J. Photoch. Photobio. B*, v. 130, p. 132-139, 2014.
10. XING, Y.; LI, X.; ZHANG, L.; XU, Q.; CHE, Z.; LI, W.; BAI, Y.; LI, K. Effect of TiO_2 Nanoparticles on the Antibacterial and Physical Properties of Polyethylene-Based Films. *Prog. Org. Coat.*, v. 73, p. 219-224, 2012.
11. TALEBIAN, Nasrin; AMININEZHAD, SeyedehMatin; DOUDI, Monir. Controllable synthesis of ZnO nanoparticles and their morphology-dependent antibacterial and optical properties. *Journal Of Photochemistry And Photobiology*. Isfahan, p. 66-73. fev. 2013.
12. TUZEMEN, E.S.; ELAGOZ, S.; SAHIN, H.; KARA, K.; ESEN, R.; BULUT, A. Effects of Annealing on Reflectance of ZnO Grown by PFCVAD. *Fen Bilimleri Dergisi*, v. 25(2), p. 41-50, 2013.