

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E ENGENHARIA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

AMANDA KLAMER DE ALMEIDA

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE FILMES FINOS DE
PAH/PAA COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA NO TRATAMENTO
MICROBIOLÓGICO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS PARA REUSO**

Caxias do Sul
2017/2

AMANDA KLAMER DE ALMEIDA

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE FILMES FINOS DE
PAH/PAA COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA NO TRATAMENTO
MICROBIOLÓGICO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS PARA REUSO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção da aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso – Bacharelado em Química, sob a orientação acadêmica da Prof^a. Dr^a Janaina da Silva Crespo e coordenação da Prof^a. Dr^a. Anna Celia Arruda.

Caxias do Sul
Período 2017/2

AMANDA KLAMER DE ALMEIDA

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE FILMES FINOS DE
PAH/PAA COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA NO TRATAMENTO
MICROBIOLÓGICO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS PARA REUSO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção da aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso – Bacharelado em Química da Universidade de Caxias do Sul.

Caxias do Sul, 14 de julho de 2017.

Banca examinadora

Prof^a. Dr^a. Janaína da Silva Crespo (UCS)
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Eliena Jonko Birriel (UCS)

Prof^a. Dr^a. Jadna Catafesta (UCS)

AGRADECIMENTOS

A Deus, que todos os dias me dá força e novas oportunidades.

À esta universidade e todo seu corpo docente, além da direção e a administração, que realizam seu trabalho com tanto amor e dedicação, trabalhando incansavelmente para que nós, alunos, possamos contar com um ensino de extrema qualidade.

À minha orientadora Prof^a.Dr^a Janaína da Silva Crespo, pela orientação, apoio, sugestões e aprendizado.

À Prof^a.Dr^a Anna Célia Silva Arruda, pela correção do trabalho.

À doutoranda Fabiana Zarpelon por toda a ajuda prática e teórica.

Aos meus pais, ao meu irmão e ao meu namorado, pelo amor, incentivo e por não medirem esforços para a realização dos meus sonhos.

Aos meus amigos, em especial a Jordana que esteve comigo em todos os momentos de minha vida acadêmica.

A todos, que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

“Não se pode esperar por um mundo melhor sem aperfeiçoar os indivíduos. Para isso, cada um deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

Marie Curie

RESUMO

A nanotecnologia oferece a perspectiva de grandes avanços que permitam melhorar a qualidade de vida e ajudar a preservar o meio ambiente, através da produção de econanomateriais que podem ser usados para o tratamento de água. O objetivo principal deste estudo é testar a eficiência bactericida de nanopartículas de prata (AgNPs) incorporadas em filmes finos de polieletrólitos, utilizando um reticulante natural e um sintético, visando o desenvolvimento de novos materiais que possam ser utilizados como agentes bactericidas na desinfecção de efluentes industriais para águas de reuso. Para a preparação dos filmes, substratos de vidros foram imersos em soluções aquosas de PAH (hidroclorato de polialilamina) e PAA (poliácido acrílico), por 15 minutos em cada uma, num processo repetido por 21 vezes. Na sequência, foram imersos em solução de AgNO_3 por 4 horas e em seguida, foram irradiados com o auxílio de uma lâmpada de UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) durante 24 horas. Para o processo de reticulação, os filmes foram imersos em dois reticulantes diferentes, o glutaraldeído e enzima transglutaminase, por 30 minutos e depois de secos foram analisados em um espectrofotômetro. Os filmes então foram testados com o efluente em tempos de 5, 120 e 360 minutos. Os resultados preliminares da espectroscopia UV-Vis mostraram que, os filmes contendo AgNPs e reticulados separadamente com os dois reticulantes, apresentaram uma única banda situada próxima a 400 nm, o que evidencia a presença de nanopartículas de prata nesse material. Os resultados para o tratamento de efluente foram positivos em relação a *E. coli* para todos os filmes, apresentado uma eficiência crescente com o aumento do tempo para o glutaraldeído e uma eficiência máxima no tempo de 2 horas para o filme reticulado com a enzima. Considerando a ação inibidora satisfatória para a *E. coli*, os filmes apresentaram um grande potencial para serem utilizados como auxiliares no tratamento microbiológico de efluente industrial.

Palavras-chave: Filmes finos. Polieletrólitos. Nanopartículas. Efluente industrial.

ABSTRACT

The nanotechnology offers the prospect of great advances that can improve the quality of life and help preserve the environment by producing eco-materials that can be used for water treatment. The main objective of this study is to test the bactericidal efficiency of silver nanoparticles (AgNPs) incorporated in fine films of polyelectrolytes, using a natural and synthetic crosslinker, aiming the development of new materials that can be used as bactericidal agents in the disinfection of industrial effluents for reuse waters. For the preparation of the films, glass substrates were immersed in aqueous solutions of PAH (polyallylamine hydrochloride) and PAA (polyacrylic acid) for 15 minutes each, in a 21-fold repeat. Subsequently, they were immersed in AgNO₃ solution for 4 hours and then irradiated with a UV lamp ($\lambda = 254$ nm) for 24 hours. For the crosslinking process, the films were immersed in two different crosslinkers, glutaraldehyde and transglutaminase enzyme, for 30 minutes and then dried in a spectrophotometer. The films were then tested with the effluent at times of 5, 120 and 360 minutes. Preliminary results of UV-Vis spectroscopy showed that the films containing AgNPs and crosslinked separately with the two crosslinkers presented a single band near 400 nm, which shows the presence of silver nanoparticles in this material. The results for effluent treatment were positive for *E. coli* for all films, with increasing efficiency with increasing time for glutaraldehyde and maximum time efficiency of 2 hours for the enzyme-crosslinked film. Considering the satisfactory inhibitory action for *E. coli*, the films had great potential to be used as auxiliaries in the microbiological treatment of industrial effluent.

Keywords: Thin films. Polyelectrolytes. Nanoparticles. Industrial effluent

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de preparação do filme e estrutura idealizada de um filme contendo bicamada	10
Figura 2 - Representação esquemática do processo de obtenção de filmes por <i>dip coating</i>	12
Figura 3 - Representação do equilíbrio dos polieletrólitos PAH e PAA em meio....	15
Figura 4 - Estrutura molecular do glutaraldeído	18
Figura 5 - Representação das cadeias poliméricas dos polieletrólitos PAH e PAA e sua conformação nas multicamadas	25
Figura 6 - Espectro UV-Vis dos filmes finos reticulados	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Percentuais de redução de <i>E. coli</i> no efluente após o tratamento com os filmes.....	28
--	----

ABREVIATURAS

LBL	<i>Layer-by-layer</i>
AgNPs	Nanopartículas de prata
PAH	Hidrocloreto de polialilamina
PAA	Poliácido acrílico
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Au	Ouro
Ag	Prata
Pt	Platina
Nm	Nanometro
μm	Micrometro
Mm	Milímetro
Ka	constante de acidez
Rpm	Rotação por minuto
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS	2
1.1.1 Objetivo geral	2
1.1.2 Objetivos específicos.....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 ÁGUA E EFLUENTE INDUSTRIAL	3
2.2 NANOTECNOLOGIA.....	4
2.2.1 Nanopartículas Metálicas	5
2.2.1.1 Nanopartículas de Prata (AgNPs)	6
2.3 FILMES FINOS	7
2.3.1 Tipos de Filmes Automontados e Mecanismos de Adsorção	8
2.4 POLIELETRÓLITOS	13
2.4.1 Classificação dos Polieletrólitos	13
2.5 RETICULAÇÃO	16
2.5.1 Reticulante Glutaraldeído	17
2.5.2 Reticulante Transglutaminase	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 LIMPEZA DOS SUBSTRATOS DE VIDROS	20
3.2 PREPARAÇÃO DOS FILMES FINOS.....	20

3.3 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS POR IRRADIAÇÃO ULTRAVIOLETA	21
3.4 RETICULAÇÃO DOS FILMES FINOS COM GLUTARALDEÍDO	21
3.5 RETICULAÇÃO DOS FILMES FINOS COM ENZIMA TRANSGLUTAMINASE ..	21
3.6 ESPECTROSCOPIA UV-VIS DOS FILMES FINOS	22
3.7 PERFILOMETRIA DO FILMES FINOS	22
3.8 AVALIAÇÃO DA DESINFECÇÃO DO EFLUENTE INDUSTRIAL COM OS FILMES FINOS	22
3.8.1 Contagem de <i>E. coli</i> no Efluente Industrial Após a Desinfecção	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 PRODUÇÃO DOS FILMES FINOS E PERFILOMETRIA	25
4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POR UV-VIS	26
4.3 DESINFECÇÃO DO EFLUENTE INDUSTRIAL COM OS FILMES FINOS	27
5 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

Uma das questões mais preocupantes para o mundo todo é a falta de água potável. Sabe-se que 70% da superfície da terra é coberta por água, porém 98% dessa água é salgada, o que a torna imprópria para o consumo. Os outros 2% de água potável precisam ser divididos por todos os habitantes e em todos os seus usos. Grande parte desse bem precioso sofre com a poluição, devido ao crescimento de cidades com o aumento da população e a necessidade de produção industrial. Assim, o desenvolvimento de estudos específicos para minimizar os impactos ambientais que podem ser causados pelos efluentes gerados no processo industrial é de primordial importância. O reuso de águas industriais tem sido incentivado no Brasil, uma vez que esta prática traz inúmeros benefícios econômicos e ambientais. No entanto, não existe ainda no país uma legislação que especifique os parâmetros físico-químicos e microbiológicos aceitáveis para esta prática. Desta forma, esses parâmetros dependem da aplicação futura da água a ser reutilizada (BRASIL, 2012).

Diante desse problema surgem pesquisas para o desenvolvimento de novos materiais a fim de tratar a água poluída e torná-la apta ao reuso. Uma alternativa é utilizar a nanotecnologia, que é uma ciência interdisciplinar e que foca nas propriedades dos materiais em escala nanométrica, para sintetizar nanopartículas metálicas, com enfoque a nanopartículas de prata que possuem ação bactericida comprovada, além de apresentarem vantagens sobre outros desinfetantes tradicionais, por possuírem alta eficiência e estabilidade química (GANGADHARAN et al., 2010).

Filmes finos automontados com polieletrólitos são utilizados para o tratamento de efluente industrial. São fabricados por diversos métodos, mas o que ganha maior destaque por ser mais utilizado é o método que se baseia na automontagem de multicamadas poliméricas diferenciadas por meio da técnica de camada por camada (do inglês “*layer-by-layer*” – LBL) por *Dip Coating*. O *Dip Coating* consiste em imergir verticalmente um substrato em uma solução contendo

a substância de interesse e depois retirá-lo da mesma. O processo de imersão e emersão deve apresentar velocidade controlada e sem nenhum tipo de vibração, a fim de permitir uma deposição homogênea (GROSSO, 2011).

Visando o desenvolvimento de materiais que possam ser utilizados como agentes bactericidas na desinfecção de efluentes industriais para águas de reuso, neste trabalho pretende-se testar a eficiência bactericida de nanopartículas de prata (AgNPs) incorporadas em filmes finos de polieletrólitos para tratamento de efluentes industriais.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste estudo é testar a eficiência bactericida de AgNPs incorporadas em filmes finos de polieletrólitos, utilizando um reticulante natural e um sintético.

1.1.2 Objetivos específicos

Este trabalho tem os seguintes objetivos específicos:

- a) Preparar filmes finos, utilizando o (Hidrocloreto de polialilamina) PAH como policação e o (Poliácido acrílico) PAA como poliânion;
- b) Sintetizar AgNPs por meio de irradiação direta dos filmes finos de PAH/PAA com luz ultravioleta, após a imersão dos mesmos em solução de nitrato de prata;
- c) Caracterizar os filmes finos de PAH/PAA através de um espectrofotômetro;
- d) Reticular os filmes finos utilizando um reticulante natural e outro sintético;
- e) Avaliar a desinfecção de uma amostra de efluente com os filmes finos de PAH/PAA em tempos variados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ÁGUA E EFLUENTE INDUSTRIAL

A água, essencial ao surgimento e à manutenção da vida em nosso planeta, é indispensável para o desenvolvimento das diversas atividades criadas pelo ser humano, e apresenta por essa razão, valores econômicos sociais e culturais. Além de dar suporte à vida, a água pode ser utilizada para o transporte de pessoas e mercadorias, geração de energia, produção e processamento de alimentos, processos industriais diversos, recreação e paisagismo, além de assimilação de poluentes, sendo essa, talvez, uma das aplicações menos nobres deste recurso tão essencial (HESPANHOL; MIERZWA, 2005).

Muito embora o nosso planeta tenha três quartos de sua superfície coberta pela água, apenas uma pequena parcela referente à água doce pode ser aproveitada, sem grandes investimentos para adequar suas características físicas, químicas e biológicas.

Levando-se em consideração a crescente preocupação da sociedade com a qualidade das águas em função do aumento da carga poluente lançada nos corpos hídricos, em julho de 2012, o Conselho Nacional de Recursos Hídricos (CNRH) publicou a Moção nº 61. Esta moção recomenda a promoção de ações de ciência e tecnologia para melhoria de técnicas de monitoramento e de tratamento de água de abastecimento e de efluentes, visando à remoção de micropoluentes e eliminação de micro-organismos patogênicos emergentes.

O tratamento dos efluentes gerados na indústria é atualmente uma prática obrigatória, prevista em âmbito federal nas Resoluções 357/2005 e 430/2011 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (BRASIL, 2011). Nas estações de tratamento de efluentes industriais no Brasil, usualmente ocorre a mistura dos diferentes tipos de efluentes gerados, incluindo por vezes o efluente sanitário que contém altas concentrações de coliformes totais (RESENDE, 2012).

O grupo de coliformes totais são bactérias do tipo bastonetes Gram (-) não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C. O grupo inclui cerca de 20 espécies, dentre as quais encontram-se bactérias originárias do trato gastrointestinal de humanos, bem como de outros animais de sangue quente. Sua contagem em água e alimentos é menos representativa como indicação de contaminação fecal do que a contagem de coliformes fecais ou *Escherichia coli* (*E. coli*) (JUNQUEIRA; SILVA, 1995).

Os processos de tratamento a serem adotados, as suas formas construtivas e os materiais a serem empregados são considerados a partir dos seguintes fatores:

- a) a legislação ambiental regional;
 - b) o clima;
 - c) a cultura local;
 - d) os custos de investimento;
 - e) os custos operacionais;
 - f) a quantidade e a qualidade do lodo gerado na estação de tratamento de efluentes industriais; a qualidade do efluente tratado;
 - g) a segurança operacional relativa aos vazamentos de produtos químicos utilizados ou dos efluentes;
 - h) explosões; geração de odor;
 - i) a interação com a vizinhança;
 - j) confiabilidade para atendimento à legislação ambiental;
- possibilidade de reuso dos efluentes tratados (GIORDANO, 2016).

2.2 NANOTECNOLOGIA

Segundo Dúran, Mattoso e Morais (2006), o domínio da nanotecnologia encontra-se compreendido desde dimensões atômicas até aproximadamente o comprimento de onda da luz visível, ou seja, entre 0,1 e 100nm. Nessa região as

propriedades dos materiais podem ser controladas e determinadas. A nanotecnologia ainda encontra-se em fase inicial, pois ainda há muito a ser estudado e compreendido sobre as propriedades dos materiais em nanoescala. É uma área de pesquisa muito ampla e interdisciplinar, pois se baseia em diversos tipos de materiais, como polímeros, cerâmicas, metais, semicondutores, compósitos e biomateriais e nanoestruturados. Estes materiais podem formar blocos de construção, como nanotubos, nanofibras e nanopartículas, que se formam a partir de átomos e moléculas. Sendo assim, os objetivos principais da nanotecnologia são a síntese controladas desses blocos de construção e seu subsequente arranjo para formar materiais e/ou dispositivos nanoestruturados.

A nanotecnologia diz respeito a materiais e sistemas cujas estruturas e componentes exibem propriedades e fenômenos físicos, químicos e/ou biológicos significativamente novos e modificados devido à sua escala nanométrica. O objetivo é explorar estas propriedades por meio do controle de estruturas e dispositivos em níveis atômico, molecular e supramolecular e aprender a fabricar e usar esses dispositivos de maneira eficiente. Manter a estabilidade de interfaces e a integração dessas nanoestruturas em escalas micrométricas e macroscópica é a chave para o progresso da nanotecnologia. Uma vez que seja possível o controle das características de tamanho, será também possível melhorar as propriedades dos materiais e as funções dos dispositivos, além do que atualmente sabemos fazer ou até mesmo consideramos como factível (DÚRAN; MATTOSO; MORAIS, 2006).

2.2.1 Nanopartículas Metálicas

Uma das aplicações da nanotecnologia é para o tratamento de efluente industrial, utilizando a síntese de nanopartículas metálicas que são incorporadas em filmes finos e possuem atividade antimicrobiana.

As nanopartículas metálicas têm representado um enorme potencial científico e tecnológico, devido às propriedades químicas e eletrônicas únicas, como alta atividade catalítica e estabilidade química (BESSON et al., 2005). As

nanopartículas de metais nobres como ouro (Au), prata (Ag) e platina (Pt), em particular, despertam muito interesse por suas múltiplas propriedades físicas e químicas, sendo estudadas em vários campos.

As nanopartículas metálicas são termodinamicamente instáveis e têm a tendência de se agregarem e crescerem. Assim, o grande desafio atualmente consiste exatamente em preparar nanomateriais estáveis (ou seja, que permaneçam nessa escala de tamanho sem sofrer decomposição, agregação e crescimento) e monodispersos. Tanto em relação ao tamanho quanto à forma de suas partículas, de tal modo que possam ser manipulados, dispersos e depositados sobre substratos, sem perder suas características (CASANOVA, 2010).

2.2.1.1 Nanopartículas de Prata (AgNPs)

A Ag é conhecida pela comunidade médica por sua eficácia antimicrobiana desde o início do século XVIII. O efeito antimicrobiano da Ag tem sido utilizado em diferentes campos da medicina como, por exemplo, na profilaxia da oftalmia neonatal, na cicatrização de feridas e em biomateriais (LIMA, 2011). Sais de Ag, principalmente o nitrato de Ag, já foram usados para o tratamento de úlceras (KLASEN, 2000). A atividade antimicrobiana da Ag foi reconhecida pelo meio acadêmico no século XIX; no entanto, somente na década de 1920 seu uso foi aprovado pela *US Food and Drug Administration* (FDA).

Com o descobrimento dos antibióticos, por volta de 1940, e sua introdução no uso medicinal, os colóides à base de nanopartículas metálicas acabaram sendo descartados. Todavia, as bactérias se tornam cada vez mais resistentes aos antibióticos disponíveis no mercado, forçando assim o desenvolvimento constante de novas drogas, o que na maioria das vezes, não acompanha a velocidade de imunogenicidade dos vírus e bactérias (GIBBS, 1999).

A área médica ainda busca a maior eficiência de fármacos seja com novos compostos farmacêuticos, bem como a reatividade desses compostos,

principalmente os de ação contra microorganismos. Particularmente, as nanopartículas metálicas e de seus óxidos provaram, no decorrer dos anos, terem aplicações medicinais pela ação dos íons e metais reduzidos contra bactérias patológicas graças à interação com as células vivas. Dentre esses metais, a Ag provou ser desde a antiguidade, um antibiótico potente, e o único limitante para seu uso no combate a infecções é o seu alto custo de obtenção (GARCIA, 2011). Partículas de Ag em dimensões maiores (micrométricas) causam a obstrução das membranas celulares, promovendo um envenenamento por prata, conhecido por argiria. Isto não acontece com o uso de partículas de Ag em dimensões nanométricas. Essas partículas são tão finamente dispersas e estão em baixa concentração que podem circular pelas membranas celulares sem ocasionar danos aos organismos superiores, visto que a concentração efetiva para a atuação contra micro-organismos é de $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ e a concentração tóxica para os seres humanos é de 10 mg.L^{-1} (OLIVEIRA apud TOLEDO et al., 2016).

A síntese das AgNPs ocorre por meio da redução de sais de Ag solúveis com agentes de redução, tais como citrato, glicose, etilenoglicol ou boroidreto de sódio. Esta redução pode ser realizada em meio aquoso, bem como em solventes orgânicos (CHERNOUSOVA, 2013). Alguns exemplos de aplicação das AgNPs são na biomedicina, em materiais dentários, no revestimento de aço inoxidável, em cremes protetores solares, no tratamento de água e em catálise. As AgNPs também vêm sendo amplamente utilizadas como agentes bactericidas na desinfecção da água e no tratamento microbiológico de efluentes (XU et al., 2011).

2.3 FILMES FINOS

Segundo Jesus (2009), a fabricação de filmes finos vem crescendo na área científico-tecnológica devido a sua interdisciplinaridade, que envolve química, física, biologia e engenharia de materiais. Metodologias de obtenção de filmes finos constituem uma área em contínuo avanço, sendo empregadas em diferentes matérias em setores até então desconhecidos.

Filme é o termo que se aplica à matéria condensada restrita a duas dimensões, disposta em camadas inseridas em uma superfície. Quanto à espessura os filmes finos podem ser classificados em nanométricos, micrométricos e milimétricos referindo-se as faixas de 0,1-100 nm, 0,1-100 μm e 0,1-100mm, respectivamente.

O substrato é a superfície que suporta fisicamente um filme fino. Este deve fornecer um suporte mecânico sem influencia nas características do filme depositado (MINASSIAN-SARAGA et al., 1994). Existem diversos tipos de substratos cada um com uma finalidade específica. Os tipos de substratos mais utilizados são vidros modificados, metais, cerâmicas policristalinas e monocristalinas e óxidos metálicos (JESUS, 2009).

Com relação aos filmes o termo deposição refere-se aos métodos nos quais átomos ou moléculas são adicionados à superfície dos filmes que está sendo preparado sobre um determinado substrato, que por sua vez é uma fase condensada distinta da fase que atua como fonte do material.

O processo de formação das multicamadas pode ser feito de diversas maneiras, incluindo as técnicas de *spin coating*, *casting* e *dip coating*. Uma breve descrição dessas técnicas é apresentada em trabalhos anteriores (JESUS, 2009; POPIOLSKI, 2011).

2.3.1 Tipos de Filmes Automontados e Mecanismos de Adsorção

A técnica recebe o nome de automontagem, pois consiste na adsorção espontânea de camadas ultrafinas de materiais sobre substratos sólidos a partir de suas soluções, sem intervenção externa. O tipo de adsorção depende da afinidade do suporte com os materiais, e dos materiais entre si (PATERNO et al. 2001). Os filmes nanoestruturados obtidos por LBL podem ser classificados em dois grandes grupos: filmes obtidos por adsorção química e filmes obtidos por adsorção física (DURÁN; MATOSSO; MORAIS, 2006).

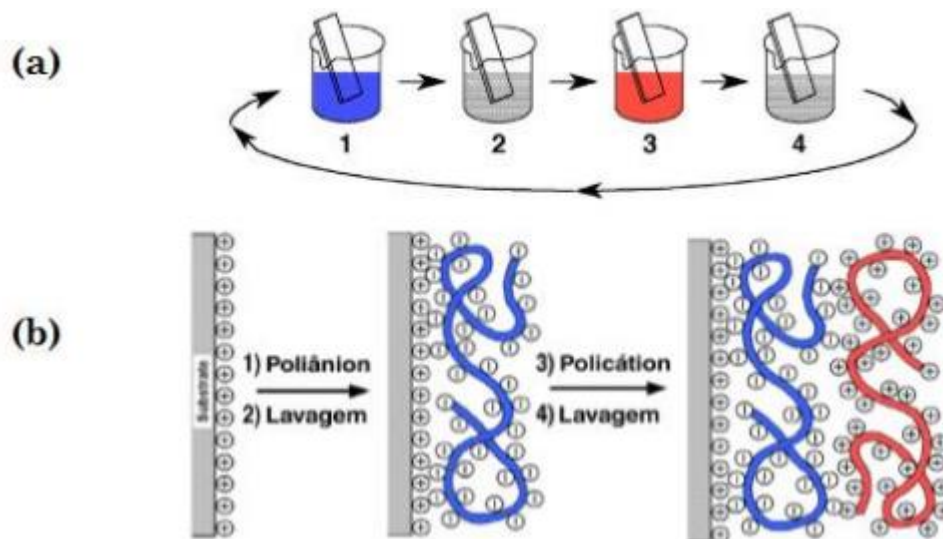
Na adsorção química, as camadas são adsorvidas sobre o suporte através do estabelecimento de ligações químicas, formando camadas monomoleculares. Uma vez que a adsorção ocorre via reação química, o material depositado deve ter afinidade pelo suporte e ainda manter funcionalidades disponíveis para a adsorção de uma camada subsequente. No entanto, a continuidade de deposição depende de reações químicas com alto rendimento, o que pode ser significativamente diminuído pela presença de impurezas, que podem proteger os grupos funcionais, e por fatores de geometria molecular, como impedimentos estéreos. Tais fatores ocasionam uma constante diminuição de material adsorvido a cada camada depositada, o que resulta na interrupção do processo de preparação do filme.

Na adsorção física, por outro lado, as camadas são adsorvidas por meio de interações físicas, tais como atração eletrostática, ligações de hidrogênio e interação hidrofóbica. As energias envolvidas nesses tipos de interação são obviamente menores do que aquelas de uma adsorção química. Contudo, como estas interações são comuns em sistemas poliméricos, o grande número de ligações estabelecidas entre as cadeias dos polímeros e o suporte torna as camadas fortemente aderidas e estáveis. Além disso, esta variedade de interações permite que um número maior de materiais possa ser depositado, sem necessidade de reações químicas.

Anos mais tarde, essa técnica foi reformulada por Decher e colaboradores, passando a basear-se na interação eletrostática entre camadas contendo grupos com cargas opostas (PATERNO et al., 2001).

Essa técnica caracteriza-se pela formação de filmes através do depósito de camadas alternadas de materiais de cargas opostas, com etapas de lavagem entre as camadas. A Figura 1 ilustra, esquematicamente, o mecanismo de preparação de um filme por LBL via interação eletrostática entre um polícatión e um poliânion, e a estrutura idealizada de um filme contendo uma bicamada.

Figura 1 - Mecanismo de preparação do filme e estrutura idealizada de um filme contendo bicamada



Fonte: Zarpelon (2013)

(a) Representação esquemática do processo de preparação de um filme pela técnica LBL sobre um substrato sólido.

(b) Estrutura idealizada de um filme contendo as duas primeiras camadas de polieletrólitos.

Após a adsorção do poliânion (etapa 1), a rede de cargas da superfície torna-se negativa. Este substrato é então imerso em uma solução de lavagem para a remoção do material fracamente adsorvido (etapa 2). Em seguida, imerge-se o substrato em uma solução contendo o polieletrólito carregado positivamente (etapa 3) que gera uma nova rede de cargas positivas na superfície, seguida novamente da imersão em uma solução de lavagem (etapa 4). Como resultado final, obtém-se uma bicamada de polieletrólitos sobre o substrato. Este processo pode ser repetido várias vezes, possibilitando a montagem de filmes com estruturas e espessuras desejadas (ZARPELON, 2013).

A versatilidade da técnica está na formação de novas arquiteturas moleculares, baseadas em ligações não-covalentes. As interações eletrostáticas entre os poli-íons em solução e a superfície são fundamentais para a estrutura final do filme. É importante ressaltar que a estruturação das moléculas também

pode ocorrer por outros tipos de interação como quimiossorção, ligações de hidrogênio, interações de van der Waals, interações hidrofóbicas, entre outras (TANG et al., 2006).

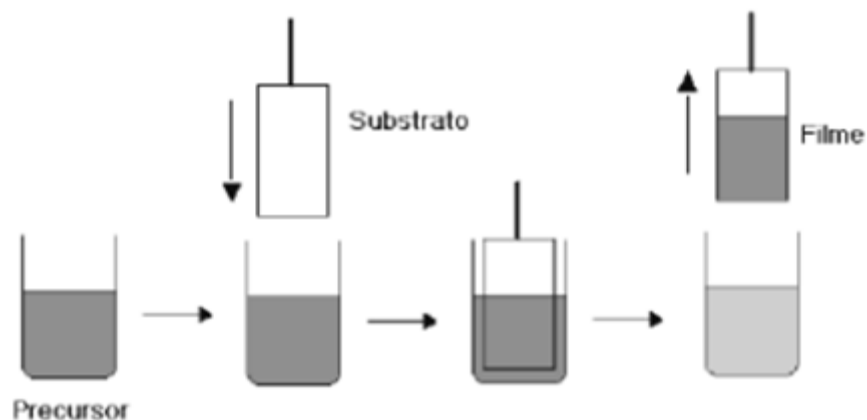
Outro benefício oferecido por essa técnica reside na capacidade de revestir peças de geometrias complexas mantendo, de maneira simples, a mesma estruturação de filmes depositados sobre superfícies planas. Os filmes obtidos a partir da técnica de LBL podem ser montados sobre superfícies de diferentes tamanhos e formas, incluindo metais, vidro, silício, e polímeros com morfologias diferentes, membranas porosas e colóides (DAL'ACQUA, 2013).

2.3.1.1 LBL por Dip Coating

A técnica de *dip coating* (revestimento por imersão) é ideal para preparar filmes finos a partir de soluções químicas, uma vez que é um processo de baixo custo e que oferece um bom controle da espessura, além de não desperdiçar solução. Por essas razões, essa técnica está se tornando cada vez mais comum, não só em laboratórios de pesquisa e de desenvolvimento, mas também na indústria (GROSSO, 2011).

O *dip coating* consiste em imergir verticalmente um substrato em uma solução contendo a substância de interesse e depois retirá-lo da mesma. O processo de imersão e emersão deve apresentar velocidade controlada e sem nenhum tipo de vibração, a fim de permitir uma deposição homogênea. Além disso, o tempo de deposição também é um fator importante na qualidade do filme. A Figura 2 esquematiza o processo de obtenção de filmes pela técnica de *dip coating*.

Figura 2 - Representação esquemática do processo de obtenção de filmes por *dip coating*



Fonte: Jesus (2009)

O tempo de permanência do substrato na solução antes da sua retirada também é um fator de controle importante. Assim, para se obter filmes de qualidade, além das características do substrato e da solução precursora (solvente, concentração, viscosidade, tipo de precursor, dentre outros), é necessária a utilização de um equipamento que promova a imersão e a emersão do substrato com alta estabilidade (OLIVEIRA; ZARBIN, 2005).

A obtenção de nanoestruturas pela técnica de LBL tem se mostrado bastante atraente sob o ponto de vista tecnológico, por se tratar de uma técnica simples e econômica que pode ser aplicada a diferentes tipos de materiais. Por meio da técnica LBL é possível fabricar filmes com camadas de vários tipos de materiais, depositadas em qualquer sequência desejada, gerando nanoestruturas com propriedades pré-determinadas. Os filmes obtidos por LBL são caracterizados por nanoestruturas organizadas em camadas ultrafinas, cuja espessura pode ser previamente fixada e controlada através da variação de parâmetros experimentais, como pH, concentração e força iônica das soluções. Uma vez que a adsorção dos materiais pode ser medida por diferentes tipos de interações, uma variedade de materiais pode ser depositada por LBL, abrindo a possibilidade de aplicação

tecnológica de materiais cuja processabilidade, por meio de métodos convencionais, é ainda problemática (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2012).

É possível que, num futuro próximo, diferentes tipos de dispositivos eletrônico-moleculares possam ser desenvolvidos com base em filmes nanoestruturados por LBL, já que até então outras metodologias de fabricação de filmes não permitiam a produção de sistemas funcionais eficazes. Aplicações em outras áreas podem também surgir, dependendo da disponibilidade de outros materiais de interesse.

2.4 POLIELETRÓLITOS

Um polieletrólito é um polímero no qual os monômeros são sais de grupos iônicos e não-metálicos, provenientes do encadeamento de moléculas menores. Em solução, esses grupos são parcialmente ionizados, e dessa forma pode-se obter diversas densidades de carga na cadeia (SELVAN et al., 1998). São em geral, solúveis em solventes polares (SILVA, 2006). Sendo assim, os polieletrólitos são preparados em solução aquosa e são utilizados para fabricação de filmes automontados camada por camada.

O polieletrólito é em geral uma macromolécula filamentosa. Com uma profusão de cargas elétricas ao longo do corpo da molécula. Se as cargas forem negativas atrairão cargas elétricas positivas (cargas elétricas de sinais opostos se atraem e cargas elétricas de sinais iguais se repelem) e se as cargas forem positivas, atrairão cargas elétricas negativas (CHISSINI, 1997).

2.4.1 Classificação dos Polieletrólitos

Os polieletrólitos podem ser classificados de acordo com vários critérios. Com base na origem, eles podem ser naturais ou sintéticos. Em relação à composição, eles podem ser homopolímeros (resultante da polimerização de um único monômero) ou copolímeros (resultante da polimerização de dois ou mais

monômeros). Baseado na arquitetura molecular podem ser lineares ou ramificados (possuem pequenas cadeias laterais), e podem ou não possuir ligações cruzadas entre as cadeias. Finalmente, quanto à natureza química dos grupos ionizáveis, eles podem ser classificados como políácidos, polibases e polianfóteros (KOLAPALLI ; LANKALAPALLI, 2009).

Segundo Silva (2006), outra classificação dos polieletrólitos é quanto à natureza eletroquímica dos grupos ionizáveis. Os políácidos com grupos carboxila ($-\text{COOH}$) e o grupo sulfônico ($-\text{SO}_3\text{H}$) podem dissociar em poliânions e prótons H^+ . As polibases com grupos amina ($-\text{NH}_2$) podem se ligar a um próton gerando policátions. Polieletrólitos que possuem tanto grupos ácidos e básicos são denominados polianfóteros, sendo carregados positivamente ou negativamente em pH baixo ou alto, respectivamente.

Outra classificação dos polieletrólitos é dada em função do pKa (cologaritmo da constante de acidez, ou seja, $\text{pKa} = -\log K_a$) do grupo ácido. Dado um ácido fraco HA, sua dissolução em água fica sujeito a um equilíbrio (equação 1).



A constante de acidez, ou constante de dissociação ácida K_a , é definida como (equação 2):

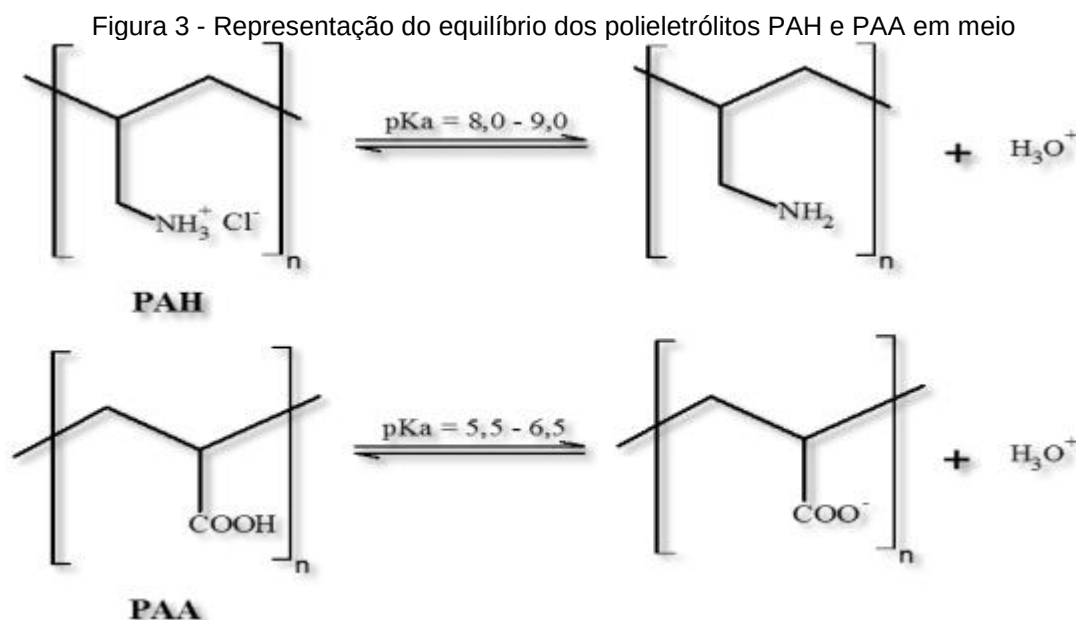
$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (2)$$

A constante de acidez K_a é proporcional à concentração dos íons formados. Quanto maior o valor de K_a , mais ionizado é o ácido e consequentemente maior a sua força de ionização. Como o pKa é o cologaritmo da constante de acidez, um baixo valor de pKa indica um aumento da acidez.

A utilização de polieletrólitos fracos na técnica LBL pode produzir sistemas com propriedades interessantes, pois sofrem mudanças no seu grau de ionização

quando o pH da solução é alterado. O aumento da força iônica da solução causa um aumento na repulsão entre as cargas eletrostáticas da molécula do polieletrólito, resultando em alterações na espessura e rugosidade do filme automontado (FARIA, 2016).

A Figura 3 apresenta o equilíbrio químico que se estabelece quando os polieletrólitos (PAA) e (PAH), são colocados em meio aquoso.



Fonte: Adaptado por Choi e Rubner (2005)

O PAH é uma polibase fraca e possui um valor de pKa entre 8,0 - 9,0. Quando o pH < 8,0, o PAH encontra-se parcialmente protonado, isto é, carregado na forma NH_3^+ , assim sua cadeia aproxima-se da conformação linear, devido à repulsão das cargas da cadeia. Com o pH do meio acima do valor de pKa, o PAH encontra-se com parte dos seus grupos amino (NH_2) desprotonados e a cadeia apresenta-se mais enovelada.

O PAA é um poliácido fraco e possui um valor de pKa entre 5,5 - 6,5. Sendo assim, em pH < 5,5, o PAA está mais protonado, ou seja, a maioria dos seus grupos COOH estão na forma não ionizada. Como não há repulsões eletrostáticas entre os grupos ionizáveis, a cadeia do polímero apresenta uma

conformação enovelada. Por outro lado, em $\text{pH} > 6,5$, o PAA está mais desprotonado, com a maioria dos seus grupos $-\text{COOH}$ na forma de carboxilato ($-\text{COO}^-$), e sua cadeia apresenta conformação mais linear, devido à repulsão entre os grupos carregados (CHOI; RUBNER, 2005).

A utilização de polieletrólitos fracos pode produzir sistemas com propriedades interessantes, pois essas espécies sofrem mudanças no seu grau de ionização quando o pH da solução é alterado. O aumento da força iônica da solução causa um aumento na repulsão entre as cargas eletrostáticas da molécula do polieletrólito, resultando em alterações na espessura e rugosidade do filme automontado (HUSSEIN, 2015).

Nas soluções em que o PAH e o PAA apresentam pH iguais a 8,0 e 4,0 respectivamente, as cadeias do PAA possuem baixo grau de ionização ($\sim 7\%$) em relação às cadeias de PAH ($\sim 68\%$). Nesses valores de pH , durante a formação do filme, o grau de ionização do PAA é aumentado de $\sim 7\%$ para $\sim 63\%$ (CHOI; RUBNER, 2005). Dessa forma, a maioria dos grupos $-\text{NH}_3^+$ do PAH neutralizam as cargas dos grupos $-\text{COO}^-$, restando uma pequena fração de grupos $-\text{NH}_3^+$ livres nas multicamadas (DECHER; SCHLENOFF, 2002). O grau de ionização do PAA aumenta ainda mais quando o filme é colocado em contato com uma solução de pH maior do que 2,5, como é o caso das soluções de AgNPs, (que são incorporadas aos filmes finos após a automontagem) que apresentam pH igual a 6,0 (ZARPELON, 2013).

2.5 RETICULAÇÃO

O uso de polímeros naturais para obtenção de filmes pode apresentar como desvantagem, a alta solubilidade em água. A hidrossolubilidade dos biopolímeros aumenta a velocidade de degradação, podendo limitar a aplicação do material. Uma das maneiras de contornar este problema é realizar ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas, tornando o polímero insolúvel em meio aquoso. Estas ligações podem ser obtidas através do processo de reticulação, alterando assim

propriedades como estabilidade térmica, mecânica e a solubilidade do material em água (BANEGAS, 2008). A reticulação polimérica é um processo que ocorre quando cadeias poliméricas lineares ou ramificadas são interligadas por pontes de ligações formando uma rede polimérica tridimensional, processo também conhecido como *crosslinking* (formação de ligações cruzadas). A reticulação pode ser de natureza química, formada por ligações covalentes irreversíveis, ou reticulação física, formada por várias ligações reversíveis (ligações iônicas). De uma maneira geral, com o aumento da reticulação, as estruturas tendem a perder sua fluidez e se tornam mais rígidas (LAMY et. al., 2008).

A reticulação pode ser ainda química ou via enzimática, uma alternativa mais adequada para utilização em alimentos. No entanto, o grau e o tipo de reticulação podem diferir de acordo com o agente reticulante. Muitos agentes químicos de reticulação são disponíveis comercialmente, e a maioria dos grupos reativos usados para imobilizar proteínas (glutaraldeído, brometo de cianogênio, etc) é capaz de produzir ligações estáveis com resíduos específicos sob condições brandas (por exemplo, pH neutro). A reticulação química apresenta desvantagens de citotoxicidade e alta reatividade. Uma alternativa que vem sendo estudada é a reticulação com agentes menos tóxicos. Assim, métodos enzimáticos podem ser promissora e usados, pois atuam como catalisadores, não participam dos produtos finais (PRATA, 2006).

2.5.1 Reticulante Glutaraldeído

O glutaraldeído é uma molécula bifuncional que interage fortemente com compostos que possuem grupos amino na sua estrutura e com menor intensidade com o grupo tiol. O mecanismo de reação do glutaraldeído com os grupos NH_2 está relacionado com a interação que ocorre entre os grupos aldeído e os grupos amino livres dos compostos originando a formação de uma base de Schiff ($\text{C}=\text{N}$), embora no caso de glutaraldeído (diluído em água) e proteínas se acredite que ocorra a formação de duplas ligações etilênicas conjugadas. Este fato ganha apoio

pela estabilidade desta interação, irreversível e bastante resistente a variações de pH e temperatura, o que normalmente não é observado para interações que envolvem simplesmente uma base de Schiff (MONTEIRO JR., 1999).

Nos poucos trabalhos em que se arrisca a comentar sobre a estrutura da interação com grupo amino sugerem-se três estruturas:

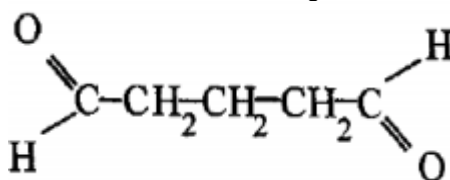
a) há a formação de apenas uma base de Schiff com um dos grupos aldeídos do glutaraldeído, o outro grupo permanece livre e é utilizado para uma reação subsequente;

b) os dois grupos aldeído de uma única molécula de glutaraldeído reagem com duas aminas formando uma ligação cruzada;

c) a ligação cruzada é formada por mais de uma molécula de glutaraldeído.

A Figura 4 representa a estrutura molecular do glutaraldeído.

Figura 4 - Estrutura molecular do glutaraldeído



Fonte: Costa Jr (2008)

2.5.2 Reticulante Transglutaminase

Transglutaminases são distribuídas extensamente em vários organismos, incluindo vertebrados, invertebrados, plantas e microorganismos, e são responsáveis por certos eventos biológicos tais como a queratinização epidermal, coagulação do sangue e regulação das membranas do eritrócito (RAY-NENG et al., 2005). Os estudos na produção da transglutaminase por microorganismos começaram recentemente, sendo a enzima obtida a partir de fermentação microbiana (PRATA, 2006).

A maioria das enzimas de interesse para modificações de proteínas são enzimas de *crosslinking* covalente e somente a transglutaminase está comumente

disponível para catalisar formação de ligações covalentes entre moléculas de proteína em uma escala comercial (DICKINSON, 1997). No entanto, seu uso é ainda pouco explorado e não existem na literatura trabalhos que utilizem esta enzima para alterar propriedades de barreira de micropartículas para liberação controlada (PRATA, 2006).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e os métodos utilizados para a realização deste trabalho.

3.1 LIMPEZA DOS SUBSTRATOS DE VIDROS

Os substratos de vidros (slides de vidros, We Enable Science) que foram utilizados para a deposição dos filmes, foram lavados com detergente comercial, utilizando um algodão para esfregá-los, após foram colocados em um Ultrassom de marca Unique USC 1400 contendo Extran neutro a 10% (v/v) por 10 minutos. Posteriormente, foram sonificados durante 3 minutos em uma solução de NaOH 1,0 mol/L e em seguida sonificados novamente durante 10 minutos em uma solução de acetona (Didática SP). Ao final de cada etapa, os substratos foram lavados abundantemente com água destilada. Para secagem dos substratos, os mesmo foram colocados em uma estufa de marca Nova Ética 420-1D a 50°C por aproximadamente 20 minutos.

3.2 PREPARAÇÃO DOS FILMES FINOS

Os filmes finos automontados foram preparados no equipamento Stracto Sequence VI – Nanostrata, dispositivo automatizado e controlado por software do próprio equipamento utilizado para a preparação de multicamadas por *dip coating*. Nesse equipamento, os substratos foram imersos em uma solução aquosa de PAH ($M_w = 15.000$ g/mol, Sigma-Aldrich) na concentração de $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$, por 15 minutos, após foram retirados dessa solução e imersos em água obtida a partir de um sistema Milli-Q, por 2 minutos. Este processo foi repetido por duas vezes por 1 minuto, após, utilizando o mesmo processo de deposição e enxague, em que foi

realizada a imersão em uma solução de PAA ($M_w = 345.000$ g/mol, Polysciences) na concentração de $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$, utilizando os mesmos tempos de imersão e lavagem. Este procedimento foi repetido sequencialmente por 21 vezes, que é o número de camadas dos filmes.

3.3 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS POR IRRADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

Os filmes finos foram inicialmente imersos durante 4 horas na solução composta por 50 mL de nitrato de prata (AgNO_3 , Merck) $0,2196 \text{ mmol/L}$ e 40 mL de citrato de sódio tribásico dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich) $0,2745 \text{ mmol/L}$.

Em seguida, os mesmos foram removidos e enxaguados por imersão durante 30 segundos em água deionizada, sendo finalmente irradiados com uma lâmpada de UV ($\lambda=254\text{nm}$) (Ushio Inc., UER20 -172 V) durante 24 horas, visando à formação das AgNPs.

3.4 RETICULAÇÃO DOS FILMES FINOS COM GLUTARALDEÍDO

Os filmes finos contendo AgNPs foram reticulados com uma solução de glutaraldeído 2,5% v/v por 30 minutos, ao abrigo da luz. Em seguida foram enxaguados em água deionizada por 30 segundos e colocados para secar por 24 horas, também ao abrigo da luz. Essa reticulação é feita a fim de minimizar a solubilidade dos filmes finos.

3.5 RETICULAÇÃO DOS FILMES FINOS COM ENZIMA TRANSGLUTAMINASE

Os filmes finos contendo AgNPs foram reticulados com uma solução de 2,5% m/v da enzima transglutaminase (Activa YG) fornecida pela Ajinomoto. A reticulação foi feita de duas formas, primeiro em temperatura ambiente de 23°C , em uma sala com temperatura controlada, por 30 minutos e após com outros

filmes, a reticulação foi feita a 50°C, controlada por termômetro, por 30 minutos, que é a temperatura ótima de atividade dessa enzima. Ambos os filmes foram enxaguados em água deionizada por 30 segundos e colocados para secar por 24 horas, também ao abrigo da luz.

3.6 ESPECTROSCOPIA UV-VIS DOS FILMES FINOS

Os filmes finos reticulados com glutaraldeído e com a transglutaminase, e contendo as AgNPs foram analisados em um espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution 60 na faixa de comprimento de onda situada entre 200 e 800 nm, a fim de verificar se houve a incorporação das nanopartículas. O branco da análise consistiu no registro de um espectro, nas mesmas condições, de um substrato de vidro contendo apenas os filmes finos reticulados com glutaraldeído e com a enzima, nas duas temperaturas.

3.7 PERFILOMETRIA DO FILMES FINOS

Para a determinação da espessura do filme contendo AgNPs reticulado com glutaraldeído utilizou-se a técnica de perfilometria de contato que consiste em determinar o perfil de uma superfície fixa mediante o deslizamento de uma ponta de diamante sobre o substrato. Os filmes foram depositados em silício, com a formação de um degrau entre o filme e o substrato. As medidas foram realizadas no perfilômetro da Taylor Robson, modelo Form Talysurf Intra do Laboratório de Caracterização de Superfícies em Nanoescala (LACASUNE) na UCS. Foram realizadas cinco medidas em diferentes regiões do filme, sendo o resultado a média das 5 medidas.

3.8 AVALIAÇÃO DA DESINFECÇÃO DO EFLUENTE INDUSTRIAL COM OS FILMES FINOS

No ensaio, os substratos de vidro contendo esses filmes foram inicialmente colocados no fundo de Erlenmeyers de 500 mL (um por frasco). Em seguida, os mesmos foram recobertos com 250 mL do efluente industrial fornecido pela empresa Tramontina, proveniente da limpeza da cozinha e do refeitório e das descargas dos sanitários. Na sequência, os Erlenmeyers foram agitados em shaker refrigerado NT 715, a 180 rpm por 5, 120 e 360 minutos. Ao término desse procedimento, as amostras de efluente foram acondicionadas em frascos âmbar, previamente sanitizados e esterilizados, e encaminhados ao Laboratório de Análise e Pesquisa em Alimentos (LAPA) para a contagem de coliformes totais e da *E. coli*. Para fins de comparação, a contagem de micro-organismos foi igualmente realizada no efluente industrial antes da desinfecção.

3.8.1 Contagem de *E. coli* no Efluente Industrial Após a Desinfecção

A contagem de *E. coli* foi realizada com base no Método 991.14 da The Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (2012).

Esse método consiste na inoculação de 1 mL do efluente industrial sobre um Petrifilm™ da 3M que posteriormente é incubado em uma estufa para cultura bacteriológica, a 35°C e por 24 horas. O Petrifilm™ contém nutrientes do meio Vermelho Violeta Bile (VRB), um agente geleificante solúvel em água fria, um indicador de atividade glicuronidásica e um indicador tetrazólico que facilita a enumeração da colônia. A maioria das bactérias *E. coli* (cerca de 97%) possui glicuronidase que forma um precipitado azul associado à colônia. O intervalo contável para esses microrganismos nesse método é de 15 a 150. As placas são hidratadas com a amostra e agentes de geleificação causam a solidificação do meio. Um gás é formado como resultado da fermentação da lactose por bactérias coliformes (incluindo a *E. coli*). As colônias de coliformes produzem ácido, fazendo com que o indicador de pH torne a cor do gel vermelho mais escuro. O gás retido ao redor das colônias vermelhas indica coliformes confirmados.

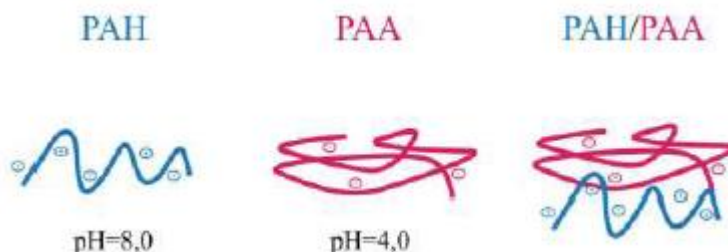
Para fins de interpretação, todas as colônias azuis associadas com gás foram contadas como *E. coli* e colônias vermelhas com gás foram consideradas coliformes totais.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRODUÇÃO DOS FILMES FINOS E PERFILOMETRIA

A espessura dos filmes finos está diretamente ligada ao pH dos polieletrólitos. Nesse trabalho, foram utilizados dois polieletrólitos fracos de cargas opostas, o PAH que possui um pKa entre 8,0 e 9,0 e o PAA que possui um pKa entre 5,5 e 6,5. Como o valor de pH do PAH é igual a 8 ele está parcialmente protonado, ou seja, carregado na forma -NH_3^+ . As cadeias poliméricas estão mais distendidas, devido à repulsão entre as cargas eletrostáticas, e as camadas geradas nos filmes são mais finas. Como o valor de pH do PAA é igual a 4, ou seja, inferior ao seu pKa, esse encontra-se protonado, ou seja, a maioria dos grupos ácidos está na forma não ionizada (-COOH). Nessa condição de pH, as cadeias poliméricas ficam mais enoveladas (Figura 5), gerando camadas mais espessas nos filmes (CHOI; RUBNER, 2005).

Figura 5 - Representação das cadeias poliméricas dos polieletrólitos PAH e PAA e sua conformação nas multicamadas



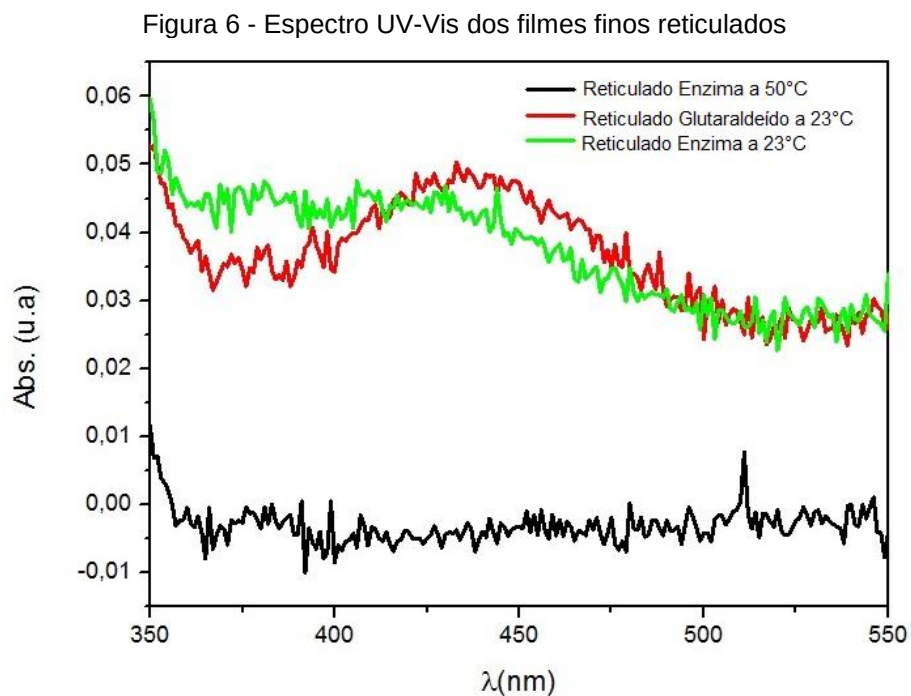
Fonte: Zarpelon (2013)

O ensaio de perfilometria foi utilizado para a determinação da espessura do filme fino produzido nesse trabalho e reticulado com o glutaraldeído.

De acordo com os valores obtidos, fez-se a média das espessuras que foi igual a 0,325 μm .

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POR UV-VIS

Os espectros UV-Vis dos filmes reticulados com o glutaraldeído e com a enzima transglutaminase (Figura 6) mostram que houve incorporação das AgNPs apenas nos filmes contendo os reticulantes a temperatura de 23°C, pois observou-se uma única banda situada entre 380 e 450 nm, o que evidencia a presença de AgNPs nesses materiais (REVINA et al., 2001). Os picos de absorção presentes nesse espectro mostram que há uma agregação das nanopartículas, devido ao alargamento do pico de absorção (SONG et al., 2009). Geralmente, uma banda em torno de 400 nm indica a presença de AgNPs de formato esférico (NOGUEZ, 2007), ou seja, as AgNPs contidas na filme e que foram obtidas por redução do sal de prata possuem formato esférico.



Fonte: o autor (2017)

Observa-se no espectro que não houve nenhuma banda para o filme reticulado com a enzima transglutaminase a temperatura de 50°C. Provavelmente,

ocorreu uma solubilização do filme com o aumento da temperatura ou ainda o aumento da temperatura pode ter oxidado a prata presente no filme. Uma investigação recente sobre o efeito antimicrobiano das AgNPs revelou que o mesmo está relacionado a outros fatores, além da dimensão, como forma e área de superfície das nanopartículas, sendo ainda sensível à alta temperatura (DRELICH et al., 2011).

O tamanho das AgNPs e a sua dispersão na solução interferem no seu desempenho antimicrobiano, quanto menor a nanopartícula, maior será sua ação antimicrobiana. Estabilizantes são acrescentados no processo de produção para prevenir a agregação das AgNPs. Nesse estudo foi adicionado o citrato de sódio para auxiliar na formação nas AgNPs durante a redução na lâmpada UV.

Em geral, agentes redutores como o citrato de sódio servem como estabilizantes dos coloides de prata, reduzindo a tendência de agregação. Os íons citrato possuem uma forte interação com a superfície dos nanocristalitos de prata, fazendo com que o crescimento dos cristais de prata seja mais lento. A redução com citrato de sódio, entretanto, produz nanopartículas com diâmetro médio de 40-60 nm, com formatos de nanohastes ou esferas (LIN et al., 2010).

4.3 DESINFECÇÃO DO EFLUENTE INDUSTRIAL COM OS FILMES FINOS

De acordo com os valores apresentados (Tabela 1), observou-se diferença nos percentuais de redução de *E. coli* nos tempos estudados e com os distintos reticulantes. Para os filmes reticulados com o glutaraldeído, houve um aumento no percentual de redução com o aumento do tempo em que o filme ficou em contato com o efluente, nos primeiros 5 minutos, o filme apresentou uma remoção de 22,8% e em 360 minutos, houve uma remoção de 48,7% de *E. coli* no efluente.

Tabela 1 - Percentuais de redução de *E. coli* no efluente após o tratamento com os filmes

Tempo de contato com o efluente (min)	Filmes	Redução de <i>E. coli</i> em relação ao efluente bruto (%)
5	Reticulado Glutaraldeído a 23°C	22,8
	Reticulado Enzima a 23°C	0
120	Reticulado Glutaraldeído a 23°C	28,6
	Reticulado Enzima a 23°C	31,4
360	Reticulado Glutaraldeído a 23°C	48,7
	Reticulado Enzima a 23°C	28,6

Fonte: o autor (2017)

Para os filmes reticulados com a enzima, o percentual de redução foi mais eficaz no tempo de 120 minutos com 31,4% de remoção, no tempo de 360 minutos o percentual foi de 28,6%, podendo essa diferença estar relacionada com o erro experimental associado ao tratamento do efluente e/ou a contagem da *E. coli*. O filme que apresentou apenas efeito bacteriostático, ou seja, não eliminou bactérias, mas impediu que houvesse proliferação (TAMAYO et al., 2014), foi o filme reticulado com a enzima a temperatura de 23°C por 5 minutos. Os filmes reticulados com a enzima na temperatura de 50°C não foram utilizados para o tratamento de efluente por não apresentarem banda característica de prata no espectro.

O mecanismo de ação da prata para ocasionar essa morte das bactérias, ainda não é totalmente conhecido, mas sabe-se que as AgNPs têm grande afinidade com grupos que possuem os elementos enxofre e fósforo, que são encontrados tanto nas membranas como no interior das bactérias. Sua interação ocorre com a membrana celular causando danos no processo de respiração

celular e, no interior das mesmas, interagem com o DNA impedindo a divisão celular e ocasionando a morte das bactérias (MORONES et al., 2005).

Apesar de a enzima transglutaminase ser um reticulante natural e não ser tóxica, ao contrário do glutaraldeído, apresentou um resultado antimicrobiano inferior ao reticulante químico, portanto, o melhor filme é o reticulado com o glutaraldeído, por apresentar uma ação antimicrobiana crescente com o passar do tempo.

5 CONCLUSÃO

A incorporação das nanopartículas foi comprovada através do espectro realizado com os filmes finos, que mostraram uma banda característica de prata para os dois reticulantes utilizados a temperatura de 23°C. Quando houve a elevação da temperatura de reticulação para 50°C, o espectro não apresentou nenhuma banda característica de prata.

Os filmes finos com as nanopartículas obtiveram um resultado positivo para o tratamento do efluente industrial na remoção da *E. coli*. Apenas um dos filmes mostrou-se bacteriostático, enquanto os outros mostraram-se bactericidas. A remoção para o filme reticulado com o glutaraldeído foi crescente com o aumento do tempo, apresentando um melhor resultado para o ensaio de 6 horas. Para os filmes reticulados com a enzima, a melhor porcentagem de remoção foi para o filme que ficou 2 horas em contato com o efluente.

Considerando-se o baixo impacto ambiental e a ação inibidora satisfatória, os filmes desenvolvidos neste trabalho apresentam um grande potencial para serem utilizados como auxiliares no tratamento microbiológico de efluentes industriais.

REFERÊNCIAS

ALVES, O. L. Nanotecnologia, nanociência e nanomateriais: quando a distância entre presente e futuro não é apenas questão de tempo. **Parcerias Estratégicas**, Brasília-DF, n. 18, ago. 2004. Disponível em: <http://seer.cgee.org.br/index.php/parcerias_estrategicas/article/viewFile/138/132>. Acesso em: 01 abr. 2017.

BANEGAS, R. S. **Filmes formados por goma guar**: efeito do plastificante e agente reticulante nas propriedades térmicas, mecânicas e absorção de água. 2008. 25f. Estágio supervisionado (graduação em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

BESSON, C.; FINNEY, E. E.; FINKE, R. G. A mechanism for transition-metal nanoparticle self- assembly, **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 127, p. 8179-8184, 2005.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 430 de 13 de maio de 2011**. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, DF, 13 Maio 2011. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acesso em: 15 mar. 2017.

BRASIL. Conselho Nacional de Recursos Hídricos. **Moção nº 61 de 10 de julho de 2012**. Recomenda promoção de ações de ciência e tecnologia para melhoria de técnicas de monitoramento e de tratamento de água de abastecimento e de efluentes, visando a remoção de micropoluentes emergentes e eliminação de micro-organismos patogênicos emergentes. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, DF, 14 Agosto 2012.

CASANOVA, M.C.R. **Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis**. 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciências na Área de Química Analítica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CHERNOUSOVA S.; EPPLE M. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticles, and metal. **Angewandte Chemie International Edition**, [S. l.], v. 52, p. 1636-1653, 2013.

CHOI, J.; RUBNER, M. F. Influence of the degree of ionization on weak polyelectrolyte multilayer assembly. **Macromolecules**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 116-124, 2005.

COSTA JÚNIOR, E. S. **Desenvolvimento de matriz de quitosana/ PVA, quimicamente reticulado para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial.** 2008. 151 f. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

DAL'ACQUA, N. **Preparação e Caracterização de Filmes Nanoestruturados Suportados em Membrana de Celulose contendo Nanopartículas de Au e TiO₂ para Produção de H₂.** 2013. 77f. Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em engenharia e ciência dos materiais, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2013.

DICKINSON, E. Enzymic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial stabilization. **Trends in Food Science & Technology**, [S. l.], v. 8, n. 10, p. 334-339, 1997.

DECHER, G.; SCHLENOFF, J. B. **Multilayer Thin Film: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials.** Tallahassee: Wiley-VCH, 2002.

DRELICH, J. et al. Vermiculite decorated with copper nanoparticles: Novel antibacterial hybrid material, **Applied Surface Science**, [S. l.], v. 257, p. 9435-9443, 2011.

DURÁN, N.; MATOSSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia:** introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e Exemplos de Aplicação. São Paulo: Artliber, 2006.

FARIA, A. C. R. **Preparação e caracterização de filmes finos automontados de polieletrólitos/tio₂/cdse para aplicação na geração de hidrogênio a partir da fotocatalise da água.** 2016. 111f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2016.

GANGADHARAN D. et al. Polymeric microspheres containing silver nanoparticles as a bactericidal agent for water disinfection. **Water Research**, [S. l.], v. 44, n. 18, p. 5481-5487, 2010.

GARCIA, M. V. D. **Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis.** 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

GIBBS, R.J.; **Silver colloids:** Do they work. Newark, [s. n.], 1999. 21p.

GIORDANO, G. **Tratamento e controle de efluentes industriais**. Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente. Apostila de Curso, Rio de Janeiro: UERJ, 2004.

GROSSO, D. How to exploit the full potential of the dip-coating process to better control film formation, **Journal of Materials Chemistry**, [S. l.], v. 21, p. 17033-17038, 2011.

HUSSEIN, A. K. Applications of nanotechnology in renewable energies—A comprehensive overview and understanding, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 42, p. 460-476, 2015.

JESUS, G. C. **Filmes automontados do cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano e ftalocianina de cobre obtidos pela técnica LbL: preparação, caracterização e aplicações**. 2009. 105 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Química na Área de Química Aplicada, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2009.

KLASEN, H. J. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. **Burns**, [S. l.], v. 26, p. 117-130, 2010.

LAMY, R. et al. Reticulação do colágeno corneano com radiação ultravioleta e riboflavina para tratamento do ceratocone: resultados preliminares de um estudo brasileiro. **Oftalmol**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 67, p.231-235, out. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72802008000500006>. Acesso em: 20 mai. 2017.

LANKALAPALLI, S.; KOLAPALLI, V. R. M. Polyelectrolyte Complexes: A Review of their Applicability in Drug Delivery Technology. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 71, p. 481–487, 2009.

LIMA, T. H. d. **Modificação do cimento ortopédico com nanopartículas de prata**. 2011. 127 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

Lin, J.-J. et al. Silver Nanoparticles: High Surface Clay-Supported Silver Nanohybrids. **Nanoparticles Technology**, [S. l.], v.1, 2010.

MIERZWA, José Carlos; HESPANHOL, Ivanildo. Água na Indústria: Uso racional e reuso. **São Paulo: Oficina de Textos**, São Paulo, [2005]. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=V1iXBAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT10&dq=água+de+reuso&ots=ingVQHaidA&sig=f7mwKQXZDxhxj_cYf3V2u97wVBw#v=onepage&q=água+de+reuso&f=false>. Acesso em: 20 out. 2016.

MINASSIAN-SARAGA, L. T. et al. Thin Films Including Layers: Terminology in Relation to Their Preparation and Characterization. **Pure and Applied Chemistry**, [S. I.], v. 66, n. 8, p. 1667-1738, 1994.

MONTEIRO JÚNIOR, O. A. C., **Preparação química e calorimétrica do biopolímero Quitosana**. 199. 128 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

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

NOGUEZ, C. Surface plasmons on metal nanoparticles: the influence of shape and physical environment, **The Journal of Physical Chemistry**, [S. I.], [2007], v. 111, p. 3806-3819, 2007.

OLIVEIRA, A. R. M.; ZARBIN, A. J. G. Um procedimento simples e barato para a construção de um equipamento "dip-coating" para deposição de filmes em laboratório. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, p. 141-144, out. 2008.

PATERNIO, L. G.; MATTOSO, L. H. C. e OLIVEIRA, O. N. d.; Filmes Poliméricos Ultrafinos Produzidos pela Técnica de Automontagem: Preparação Propriedades e Aplicações, **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 228-235, 2001.

POPIOLSKI, T. M. **Avaliação da incorporação de nanopartículas de ouro em filmes automontados de polieletrólitos fracos**. 2011. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Mestrado em Materiais, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2011.

PRATA, A. S. **Estudo dos parâmetros físico-químicos envolvidos na formação de microcápsulas produzidas por coacervação complexa**. 2006. 267 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos na Área de Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

RAY-NENG, C.; HSIU-O, H.; MING-THAU, S. Characterization of collagen matrices crosslinked using microbial transglutaminase. **Biomaterials**, [S. I.], v.26, p. 4229–4235, 2005.

RESENDE L. P. Reuso na indústria têxtil e lavanderias, **Hydro**, [S.I.], v. 66, p. 14-19, 2012.

REVINA, A. A. et al. Todoradze, M. G. Optical and Electrical Characteristics of Polymer Films Modified with Nanostructured Silver Aggregates. **High Energy Chemistry**. [S. I.], p. 74-78. jan. 2001.

SELVAN, S. T. et. al. Gold- Polypyrrole Core-Shell Particles in Diblock Copolymer Micelles, **Adv. Mater**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 132-134, 1998.

SILVA, M. C. d. **Propriedades ópticas do poliestireno sulfonado dopado com íons de neodímio**. 2006. 160 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A. Métodos de análises microbiológicas de alimentos. **Campinas**: ITAL, Campinas, v.40, p. 228, 1995.

SONG, K. C. et al. Preparation of colloidal silver nanoparticles by chemical reduction method. **J. Chem. Eng.**, [S. l.], v. 26, p. 153-155, 2009

TAMAYO, L. A. et al. Release of silver and copper nanoparticles from polyethylene nanocomposites and their penetration into *Listeria monocytogenes*. **Materials Science and Engineering**, [S. l.], v. 40, p. 24-31, 2014.

TANG, Z. et al. Biomedical Applications of Layer-by-Layer Assembly: From Biomimetics to Tissue Engineering, **Advanced Materials**, [S. l.], v. 18, p. 3203-3224, 2006.

TOLEDO, A. C. T.; Uso de nanopartículas de prata para avaliação da eficácia antimicrobiana nos sistemas de tratamento de água e efluentes em substituição aos produtos clorados. **Química Industrial**, São Paulo, 2016, v. 84, n. 753, p. 34-41. Disponível em: < <https://www.abq.org.br/rqi/2014/753/RQI-753-Indice-de-Artigos-RQI-Edicao-eletronica-no-11.pdf>>. Acesso em: 20 mai. 2017.

XU, X. et. al. Sorption of phosphate onto giant reed based adsorbent: FTIR, Raman spectrum analysis and dynamic sorption/desorption properties in filter bed, **Bioresource Technology**, [S. l.], , v. 102, p. 5278-5282, 2011.

ZARPELON, F. **Preparação, Caracterização e Aplicação de Filmes Finos de PAH/PAA com Nanopartículas de Prata no Tratamento Microbiológico de Efluentes Industriais para Reuso**. 2013. 82f. Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em engenharia e ciência dos materiais, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2013.