

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E ENGENHARIAS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II - ENQ0271AD
PROF. DR. MARCELO GIOVANELA

LETÍCIA TIZATTO BERNARDI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DE MICROESFERAS DE
QUITOSANA COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA A DESINFECÇÃO DE
EFLUENTES INDUSTRIAIS**

CAXIAS DO SUL
2019

LETÍCIA TIZATTO BERNARDI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DE MICROESFERAS DE
QUITOSANA COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA A DESINFECÇÃO DE
EFLUENTES INDUSTRIAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como parte dos requisitos para obtenção da
aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão
de Curso – Engenharia Química, sob a orientação
do Prof. Dr. Marcelo Giovanela e coordenação da
Prof. Dr^a. Camila Baldasso.

**CAXIAS DO SUL
2019**

RESUMO

O tratamento terciário de efluentes industriais, através do uso de nanopartículas de prata (AgNPs) ancoradas em matrizes poliméricas, é uma alternativa bastante promissora em relação às técnicas convencionais para a eliminação de micro-organismos, visando à melhoria da qualidade final desses efluentes. Neste contexto foram preparadas microesferas de quitosana contendo AgNPs por meio de um planejamento experimental do tipo 2³, com o objetivo de obter o material com a maior atividade bactericida para sua posterior aplicação na desinfecção de um efluente industrial. As AgNPs foram inicialmente sintetizadas mediante a redução química de íons prata, utilizando o citrato de sódio e o boroidreto de sódio como estabilizante e redutor, respectivamente, sendo posteriormente caracterizadas por meio da técnica de espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-Vis). As microesferas de quitosana, por sua vez, foram preparadas a partir da dissolução de quitosana em ácido acético, com a adição das AgNPs e do agente reticulante, e posterior gotejamento em NaOH 1,5 mol L⁻¹. O planejamento experimental consistiu de 11 experimentos, onde foram variados a concentração de ácido acético (de 0,25 a 0,75 mol L⁻¹), o volume de glutaraldeído (de 30,0 a 60,0 µL) e o percentual de AgNPs no material (de 10 a 30%). A atividade bactericida do material foi avaliada por meio do teste de difusão em ágar com dois tipos de micro-organismos (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*), onde obteve-se a medida do halo de inibição para cada uma delas, utilizada como variável resposta do planejamento experimental. As microesferas que apresentaram a maior atividade bactericida foram então utilizadas na desinfecção de um efluente industrial, onde foi observado o percentual de inativação de coliformes totais e bactérias *Escherichia coli* para diferentes tempos de contato, além da quantidade de prata lixiviada para o efluente por meio da técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). O material também foi submetido a diversas técnicas de caracterização, incluindo a difração de raios X (DRX), a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), e a termogravimetria (TGA). Os resultados revelaram que as microesferas com maior atividade bactericida (preparadas com ácido acético 0,75 mol L⁻¹, 60,0 µL de glutaraldeído e 30% de AgNPs) reduziram 47% dos coliformes totais e 100% das bactérias *E. coli* do efluente industrial testado ao final de 3 h de tratamento. A quantidade de prata lixiviada para o efluente foi menor que o limite de detecção do método para todos os ensaios, estando abaixo do limite máximo permitido para descarte por leis estaduais e nacionais. Por fim, foi possível concluir que o material apresentou alta atividade bactericida para ser utilizado como auxiliar no tratamento terciário de efluentes industriais, além da baixa contaminação do meio reacional.

Palavras-chave: Nanopartículas de prata, Glutaraldeído, Quitosana, Tratamento Terciário, Efluentes Industriais.

ABSTRACT

The tertiary treatment of industrial wastewater, through the use of silver nanoparticles (AgNPs) anchored in polymeric matrixes, is a promising alternative when compared to conventional techniques of removal of microorganisms, in pursuance of a high quality of these effluents. In this sense, chitosan beads containing AgNPs were prepared according to a 2^3 experimental design, in order to obtain the material with the highest antibacterial activity and their subsequent application for the disinfection of industrial wastewater. The AgNPs were initially synthesized by chemical reduction of Ag^+ ions, using sodium citrate and sodium borohydride as stabilizing agent and reducer, respectively, being characterized afterwards by means of ultraviolet and visible (UV-Vis) absorption spectroscopy. The chitosan beads were prepared by dissolution of chitosan in acetic acid, with addition of the AgNPs and cross-linking agent, followed by dipping in NaOH 1.5 mol L^{-1} . The design of experiments consisted of 11 tests, with variation of acetic acid concentration (from 0.25 to 0.75 mol L^{-1}), glutaraldehyde volume (from 30.0 to $60.0 \mu\text{L}$) and percentage of AgNPs present in the material (from 10 to 30%). The antibacterial activity was assessed through agar diffusion test with two types of micro-organisms (*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*), measuring the zone of inhibition for each of them, using these values as the response variable in the design of experiments. The beads which presented the highest antibacterial activity were then used for the disinfection of an industrial wastewater, where two factors were evaluated: the percentage of inactivation of fecal coliforms and *Escherichia coli* for different contact times and the total amount of silver leached to the effluent, this one obtained through inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). The material also underwent several characterization techniques, including X-ray diffraction (XRD), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and thermal gravimetric analysis (TGA). The results revealed that the chitosan beads with the highest antibacterial activity (prepared with acetic acid 0.75 mol L^{-1} , $60.0 \mu\text{L}$ of glutaraldehyde and 30% of AgNPs) reduced 47% of total fecal coliforms and 100% of *E. coli* bacteria in the industrial effluent after 3 h of treatment. The amount of silver leached to the effluent was lower than the detection limit of the method for all the experiments, therefore being under the maximum limit for disposal of industrial wastewater allowed by national and state laws. Finally, it was possible to conclude that the material presented high antibacterial activity to be used as an auxiliary in the tertiary treatment of industrial wastewater, with low contamination of the reactional medium.

Key-words: Silver nanoparticles, Glutaraldehyde, Chitosan, Tertiary Treatment, Industrial Wastewater.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema simplificado das etapas de tratamento de efluente	17
Figura 2 – Estrutura bacteriana.....	19
Figura 4 – Estrutura da parede celular de bactérias Gram-positivas.....	20
Figura 4 – Estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas	21
Figura 5 – Espectro eletromagnético.....	26
Figura 6 – Estrutura química da celulose	29
Figura 7 – Estrutura química da quitosa.....	29
Figura 8 – Ação das AgNPs frente a bactérias de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : (a) antes do tratamento com AgNPs; (b) e (c) tratadas com AgNPs.....	32
Figura 9 – Estrutura química do glutaraldeído.....	32
Figura 10 – Reação de reticulação entre a quitosana e o glutaraldeído	33
Figura 11 – Representação do planejamento fatorial 2^3 : (a) visão geométrica; (b) lista de experimentos.....	35
Figura 12 – Solução de quitosana em ácido acético, após agitação magnética	38
Figura 13 – Solução de quitosana em ácido acético, após 24 h sob repouso.....	38
Figura 14 – Microesferas de quitosana com AgNPs e reticuladas com glutaraldeído.....	39
Figura 15 – Amostras dispostas na incubadora do tipo shaker antes do ensaio de desinfecção do efluente industrial	41
Figura 16 – Fluxograma simplificado do sistema de tratamento de efluentes de uma indústria metalúrgica	42
Figura 17 – Espectros de absorção na região do UV-Vis das soluções contendo AgNPs	45
Figura 18 – Teste de difusão em ágar evidenciando os halos de inibição: (a) bactéria <i>E. coli</i> ; (b) bactéria <i>S. aureus</i>	47
Figura 19 – Diagrama de Pareto para o planejamento fatorial 2^3	50
Figura 20 – Valores observados vs valores preditos para o modelo	51
Figura 21 – Perfil de superfície de resposta para o planejamento fatorial 2^3 para: (a) concentração ácido acético (mol L^{-1}) vs volume glutaraldeído (μL); (b) concentração ácido acético (mol L^{-1}) vs percentual de AgNPs na amostra (%) e (c) volume glutaraldeído (μL) vs percentual de AgNPs na amostra (%).....	52

Figura 22 – Remoção de bactérias <i>E. coli</i> e coliformes totais em função do tempo de tratamento do efluente industrial	53
Figura 23 – Difrátogramas de raios X para a quitosana comercial e reticulada	55
Figura 24 – Espectro de FT-IR para quitosana comercial e reticulada.....	57
Figura 25 – Curvas de TGA e DTG da quitosana comercial	58
Figura 26 – Curvas de TGA e DTG da quitosana reticulada	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais classificações para o reuso da água no Brasil	14
Quadro 2 – Principais aplicações da quitosana.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise de variância (ANOVA)	36
Tabela 2 – Matriz do planejamento experimental.....	40
Tabela 3 – Matriz resultante do planejamento fatorial 2^3	48
Tabela 4 – Efeitos estimados do planejamento fatorial 2^3	48
Tabela 5 – ANOVA para o planejamento fatorial 2^3	50

SIGLAS, TERMOS E ABREVIATÖES

AgNPs	- Nanopartículas de prata
CONAMA	- Conselho Nacional do Meio Ambiente
CuNPs	- Nanopartículas de cobre
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DOE	- Planejamento de experimentos
DRX	- Difratação de raios X
FT-IR	- Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
MET	- Microscopia eletrônica de transmissão
OAFT	- <i>One-factor-at-a-time</i>
RNA	- Ácido ribonucleico
TGA	- Termogravimetria
UV	- Ultravioleta
UV-Vis	- Ultravioleta e visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	OBJETIVO GERAL	12
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	A ESCASSEZ E O REUSO DA ÁGUA	13
2.2	TRATAMENTO DE EFLUENTES	15
2.3	DESINFECÇÃO DE EFLUENTES	17
2.3.1	Micro-organismos patogênicos	18
2.3.1.1	Bactérias	18
2.3.2	Técnicas de desinfecção de efluentes	22
2.3.2.1	Cloração	22
2.3.2.2	Dióxido de cloro	23
2.3.2.3	Ozonização	24
2.3.2.4	Radiação ultravioleta (UV)	25
2.3.2.5	Desenvolvimento de novas técnicas de desinfecção	27
2.4	QUITOSANA	28
2.5	NANOTECNOLOGIA	30
2.5.1	Nanopartículas metálicas	30
2.5.1.1	Nanopartículas de prata (AgNPs)	31
2.6	AGENTE RETICULANTE: GLUTARALDEÍDO	32
2.7	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	34
2.7.1	Planejamento fatorial 2^k	34
2.7.2	Análise estatística	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1	MATERIAIS	37
3.2	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	37
3.2.1	Síntese das AgNPs	37
3.2.2	Caracterização das AgNPs	37
3.3	PREPARAÇÃO DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA E PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	38
3.3.1	Preparação das microesferas e incorporação das AgNPs	38
3.3.2	Planejamento experimental	39

3.3.3	Avaliação da atividade bactericida	40
3.4	DESINFECÇÃO DO EFLUENTE INDUSTRIAL	41
3.4.1	Amostra de efluente industrial	42
3.5	QUANTIFICAÇÃO DA PRATA LIXIVIADA PARA O EFLUENTE APÓS ENSAIO DE DESINFECÇÃO	43
3.6	CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA COM AGNPS.....	43
3.6.1	Difração de raios X (DRX)	43
3.6.2	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	43
3.6.3	Termogravimetria (TGA)	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS AGNPS	45
4.2	ATIVIDADE BACTERICIDA DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA E PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	46
4.3	DESINFECÇÃO DO EFLUENTE INDUSTRIAL	53
4.4	QUANTIFICAÇÃO DA PRATA LIXIVIADA PARA O EFLUENTE APÓS O ENSAIO DE DESINFECÇÃO	54
4.5	CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA COM AGNPS.....	54
4.5.1	Difração de raios X (DRX)	55
4.5.2	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	56
4.5.3	Termogravimetria (TGA)	57
5	CONCLUSÃO	60
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	62
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
	ANEXO A	70

1 INTRODUÇÃO

O constante crescimento da população, da urbanização das cidades e da atividade industrial, em todo o mundo, tem causado impactos ambientais consideráveis. A preocupação com o meio ambiente e com os recursos hídricos têm levado as indústrias a se adequarem às novas e cada vez mais exigentes leis sobre a geração e o descarte de efluentes. Além disso, o reuso de águas utilizadas em processos industriais também tem sido incentivado, uma vez que práticas como essa trazem inúmeros benefícios, tanto ambientais quanto econômicos. Entretanto, para que as águas provenientes de efluentes industriais possam ser reutilizadas, torna-se necessária a utilização e a implementação de um sistema que seja eficiente, uma vez que os micro-organismos podem trazer riscos à saúde, principalmente quando essa água entrará em contato direto com o ser humano após o seu tratamento.

Diversas técnicas têm sido utilizadas nesse contexto; todavia, a maior parte delas tem limitações ou desvantagens quando implementadas em larga escala. Por isso, o desenvolvimento de novas tecnologias para a remoção de micro-organismos, em escala industrial, é de extrema importância.

A boa estabilidade química e a elevada atividade bactericida das nanopartículas de prata (AgNPs) contra uma ampla gama de micro-organismos tem incentivado o estudo da sua combinação com diversas matrizes poliméricas, buscando materiais com melhores propriedades para tal finalidade. A quitosana, por exemplo, é um polissacarídeo, derivado do processo de desacetilação da quitina, um dos mais abundantes polímeros naturais, e tem sido proposta como um material atraente para diversos usos, por ser renovável e de baixo custo. Além de possuir excelentes propriedades como biodegradabilidade, atoxicidade e boa capacidade de adsorção, a quitosana possui ainda alta atividade bactericida.

Dentro desse contexto, esse trabalho teve por objetivo a preparação e a caracterização de microesferas de quitosana contendo AgNPs, e reticuladas com glutaraldeído, visando à obtenção de um material que apresente atividade bactericida para o tratamento terciário de efluentes industriais.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade bactericida de microesferas de quitosana contendo AgNPs na desinfecção de efluentes industriais.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar as AgNPs obtidas por redução química, utilizando o boroidreto de sódio como agente redutor e o citrato de sódio como agente estabilizante, por meio da técnica de espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-Vis);

Avaliar a atividade bactericida das microesferas de quitosana com AgNPs preparadas através de um planejamento experimental do tipo 2^k por meio da medida dos halos de inibição, utilizando o teste de difusão em ágar;

Avaliar a eficiência do processo de desinfecção de uma amostra de efluente industrial, submetendo as microesferas de quitosana com AgNPs que apresentaram a maior atividade bactericida no planejamento experimental à agitação constante durante um ou mais períodos de tempo;

Quantificar o teor de prata lixiviado para o efluente durante o ensaio de desinfecção pelas microesferas de quitosana com AgNPs por meio da técnica de espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES).

Caracterizar, química, morfológica e termicamente, as microesferas de quitosana com AgNPs que apresentaram a maior atividade bactericida e foram utilizadas na desinfecção do efluente, por meio das técnicas de difração de raios X (DRX), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e termogravimetria (TGA).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A ESCASSEZ E O REUSO DA ÁGUA

A água é um recurso essencial para a vida na Terra, sendo a substância mais abundante na natureza: cerca de dois terços do planeta são formados por água. Apesar disso, aproximadamente 97,5% dessa água é salgada, e dos 2,5% de água doce restantes, boa parte é de difícil acesso, podendo estar no subsolo ou sob a forma de geleiras (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS, 2005). Consequentemente, apenas uma pequena parte da água disponível no planeta é apropriada e acessível para o consumo.

Além disso, o crescimento populacional, a migração rural para os centros urbanos e o aumento do consumo têm prejudicado a quantidade e a qualidade dos recursos hídricos superficiais e subterrâneos. Estimativas preveem que em 2025 cerca de 1,8 bilhões de pessoas estarão vivendo com escassez absoluta de água, e dois terços da população mundial poderão estar com o recurso no limite para suprir as demandas da agricultura, indústria, meio ambiente, energia e fins domésticos (SCHOMAKER; KEATING; CHENJE, 2007; NAVARRO-ORTEGA, 2014).

O Brasil é um país privilegiado, pois possui em seu território as mais extensas bacias hidrográficas do planeta, que contemplam, segundo Olic (2003), de 12 a 15% da água doce disponível no mundo. Desse volume, entretanto, aproximadamente 80% da água superficial encontra-se na Amazônia, distante dos maiores centros populacionais e industriais do país, enquanto apenas 20% está distribuída pelo restante do país, que abrange cerca de 95% da população brasileira (DI BERNARDO; DANTAS, 2005; MANCUSO; SANTOS, 2003).

Nos grandes centros urbanos e regiões metropolitanas do Brasil, a demanda já não consegue ser suprida pelas fontes de água disponíveis. Em função desse problema e do acelerado desenvolvimento industrial, há um grande interesse de diversos setores em reduzir os impactos da poluição da água, e moderar o consumo e a geração de efluentes. Gradativamente, as indústrias vão precisar adotar estratégias para minimizar o uso da água em seus processos, e para reutilizar o que for residual, pois a aplicação de políticas de cobrança para o uso da água e para o lançamento de efluentes, tornará o processo cada vez mais oneroso para a empresa (MATSUMURA; MIERZWA, 2008).

Apesar da reciclagem da água de efluentes industriais já estar sendo adotada em diferentes regiões do mundo, o Brasil ainda não possui leis ou resoluções que determinem o reuso da água na indústria. A Resolução 430/2011 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (BRASIL, 2011), contudo, estabelece a obrigatoriedade do tratamento de efluente, e a qualidade necessária para o seu lançamento em corpos receptores. Em vista disso, e do custo cada vez mais elevado para a captação da água, a prática já vem sendo estudada e aplicada no país, principalmente para usos não potáveis e processos industriais (RESENDE, 2012).

O Manual de Conservação e Reuso de Água para a Indústria (FIESP, 2005) ressalta que a prática do reuso das águas do efluente, após tratamento, proporciona diversos benefícios para a indústria. Alguns desses benefícios são de grande importância, como: econômicos, já que a empresa não vai precisar acrescentar a cobrança pelo uso da água no custo dos seus produtos, aumentando a competitividade; ambientais, ao reduzir o lançamento de efluentes e a captação de águas superficiais e subterrâneas; e sociais, com o reconhecimento da sociedade que espera da empresa um comportamento social e ambientalmente responsável.

O reuso da água, ao longo do tempo, foi sendo classificado com base na maneira como ele ocorre, no grau de planejamento e na finalidade para qual ele se destina, conforme mostra o Quadro 1. É importante, porém, que a empresa adote medidas para a minimização do consumo de água e geração de efluentes, antes de implementar um sistema de reuso (FILHO, 2009).

Quadro 1 – Principais classificações para o reuso da água no Brasil

(continua)

Classificação	Definição
Reuso indireto não planejado	A água utilizada em alguma atividade humana é descartada no meio ambiente e utilizada novamente de maneira não intencional e não controlada.
Reuso indireto planejado	Efluentes tratados são descartados no meio ambiente de forma planejada e são utilizados à jusante, de maneira controlada.
Reuso direto planejado	Efluentes tratados são encaminhados do seu ponto de descarga até o ponto de reuso, não sendo descartados no meio ambiente.
Reuso em cascata	Efluente gerado em um processo industrial é utilizado sem tratamento em um processo subsequente, já que o efluente gerado atende aos requisitos de qualidade de água do processo

(conclusão)

Classificação	Definição
Reuso de efluentes tratados	Efluentes gerados localmente são tratados de forma adequada para obter a qualidade necessária ao uso pretendido.

Fonte: Filho (2009).

A água de reuso pode ser utilizada em diversas situações, dependendo da particularidade dos processos e produtos de cada indústria, como em caldeiras, refrigeração de equipamentos, lavagem de matérias-primas, incorporação aos produtos, combate a incêndios, entre outras aplicações. Cada aplicação exige um determinado padrão de qualidade da água a ser utilizada, e é com base nisso que o tratamento de efluente deve ser realizado. Nos casos de contato de seres humanos com essa água, posteriormente ao seu tratamento, ele deve conter, obrigatoriamente, uma etapa de desinfecção (SILVA; ORSINE, 2011).

2.2 TRATAMENTO DE EFLUENTES

Os efluentes podem ser classificados como domésticos ou industriais. O primeiro é resultante, de maneira geral, do esgoto de prédios, casas ou edifícios comerciais; o segundo, de empresas de qualquer segmento, e que possuem características químicas, físicas e biológicas que podem variar de acordo com o ramo de atividade, processos e produtos de cada uma delas. Para obter a água de reuso, existem tratamentos específicos para cada tipo de efluente, que são classificados como preliminar, primário, secundário e terciário, e que são utilizados de acordo com a qualidade inicial e a qualidade final desejada desse efluente (FILHO, 2009; IBRAHIN; IBRAHIN; CANTUÁRIA, 2015).

O tratamento preliminar é a primeira etapa no ciclo de tratamento dos efluentes, e emprega, sobretudo, processos físicos com a finalidade de remover sólidos grosseiros, areia e gorduras. Os mecanismos usualmente utilizados são o peneiramento, através do gradeamento, a sedimentação, por meio de desarenadores, e em alguns casos caixas para a remoção de gorduras (TOSETTO, 2005; IBRAHIN; IBRAHIN; CANTUÁRIA, 2015).

O tratamento primário, por sua vez, é empregado para remover os sólidos em suspensão sedimentáveis e flutuantes que passaram pelo tratamento preliminar. São

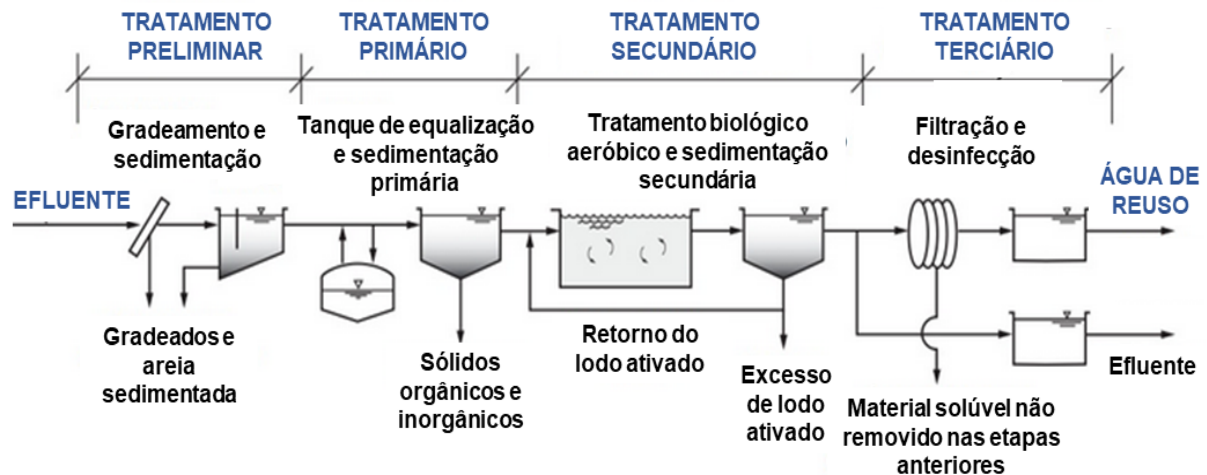
utilizados processos físico-químicos, através de duas etapas: a floculação e a decantação. Nessa fase ocorre a sedimentação e a neutralização da carga do efluente, a partir de um tanque de equalização e adição de produtos químicos. Em seguida, ocorre a separação de partículas sólidas do líquido, com o objetivo de clarificar o efluente, utilizando floculadores e um decantador para remover sólidos orgânicos e inorgânicos que, isolados ou em flocos, apresentam densidade maior que a do líquido, e sedimentam gradativamente. Na maior parte dos casos, mesmo após a realização do tratamento primário, o efluente ainda não está adequado para ser reutilizado, e nem para ser lançado em um corpo hídrico, e por essa razão, é necessário o tratamento secundário (TOSETTO, 2005; DEZOTTI, 2008; IBRAHIN; IBRAHIN; CANTUÁRIA, 2015).

No tratamento secundário visa-se remover, por meio de processos unitários biológicos, a matéria orgânica dissolvida ou em suspensão, como carboidratos, proteínas e lipídios. A remoção é efetuada por meio de reações bioquímicas, onde micro-organismos se alimentam da matéria orgânica, convertendo-a em gás carbônico e água. Para tratamento biológico aeróbio, costuma-se utilizar as técnicas de filtração biológica, na qual há formação de cultura biológica no meio filtrante, onde a matéria orgânica é absorvida; lodos ativados, em que o efluente é misturado, agitado e aerado com um lodo que possui micro-organismos, formando uma suspensão de fácil sedimentação; e lagoas de estabilização, que são uma espécie de reator onde ocorre degradação biológica, e o número de micro-organismos patogênicos existentes é reduzido pela estabilização da carga orgânica, realizada pela oxidação bacteriológica. Já no tratamento biológico anaeróbio, o efluente é introduzido em um reator anaeróbio, aquecido ou não, com a intenção de agilizar a decomposição das substâncias orgânicas presentes (TOSETTO, 2005; FILHO, 2009; IBRAHIN; IBRAHIN; CANTUÁRIA, 2015).

No tratamento terciário, também chamado de pós-tratamento, o objetivo é obter um efluente de qualidade superior, pela remoção do material solúvel não removido nas etapas anteriores, como, por exemplo, nitrogênio, fósforo, sódio e bactérias patogênicas, que são nutrientes que ainda estão presentes no efluente nessa etapa. Ocorre também a remoção de outras substâncias, compostos orgânicos ou metais pesados, dependendo da origem desse efluente (FILHO, 2009). Além disso, segundo Tosetto (2005), o tratamento terciário visa à desinfecção das águas do efluente para

que seja possível o seu reuso. A Figura 1 apresenta, de forma simplificada e esquemática, todas as etapas no tratamento de efluentes.

Figura 1 – Esquema simplificado das etapas do tratamento de efluentes



Fonte: Adaptado de Metcalf e Eddy (2016).

O que define, por fim, um sistema de tratamento, é a seleção de uma ou mais técnicas combinadas para que se obtenha a redução do contaminante de interesse. Essa escolha deve basear-se no conhecimento do efluente em questão, e nos mecanismos envolvidos e potencial de cada técnica (FIRJAN, 2005). Também é importante observar, principalmente para a etapa terciária, o destino de uso do efluente depois de tratado (TOSETTO, 2005).

2.3 DESINFECÇÃO DE EFLUENTES

Os processos de desinfecção de efluentes são aqueles nos quais se deseja inativar ou destruir os organismos patogênicos ou outros micro-organismos indesejados. Esse processo é necessário para viabilizar o reuso da água desse efluente, pois apesar de as etapas anteriores resultarem em um efluente com boas características, e removerem até 99% de determinados micro-organismos, isso não é suficiente para atingir as exigências necessárias para a reutilização. Para garantir a segurança das pessoas que vão entrar em contato ou utilizar as águas de reuso, a desinfecção deve ser o ponto de partida, seja por meios químicos ou físicos (VARGAS, 2008; LOVATEL, 2014).

A água contaminada com micro-organismos patogênicos representa uma ameaça para a saúde pública, visto que é uma das principais causas para a transmissão de doenças. Todos os anos, cerca de quatro milhões de pessoas sofrem de doenças transmitidas através do consumo ou contato com água contaminada, e 2,2 milhões de pessoas morrem devido a isso (EL-LIETHY; ELWAKEEL; AHMED, 2018). Em um sistema de reuso de água, inclusive para o caso de reuso de efluentes tratados, quanto maior for a exposição humana a essa água, maior deve ser a sua segurança em termos de micro-organismos, controlados, geralmente, através de indicadores de coliformes fecais e totais (TOSETTO, 2005).

2.3.1 Micro-organismos patogênicos

O contato com a água contaminada pode causar inúmeras doenças em seres humanos. Os micro-organismos são divididos, de maneira geral, em quatro grupos: vírus, bactérias, fungos e parasitas (protozoários e helmintos). A hepatite A, por exemplo, é uma infecção viral transmitida através do contato com fezes humanas. Além disso, cólera, tuberculose e febre tifoide são doenças causadas por bactérias, enquanto a giardíase e disenteria amebiana são infecções adquiridas através de parasitas intestinais, e todas elas podem ser transmitidas pela água (GOLÇALVES, 2003; SALVATIERRA, 2014).

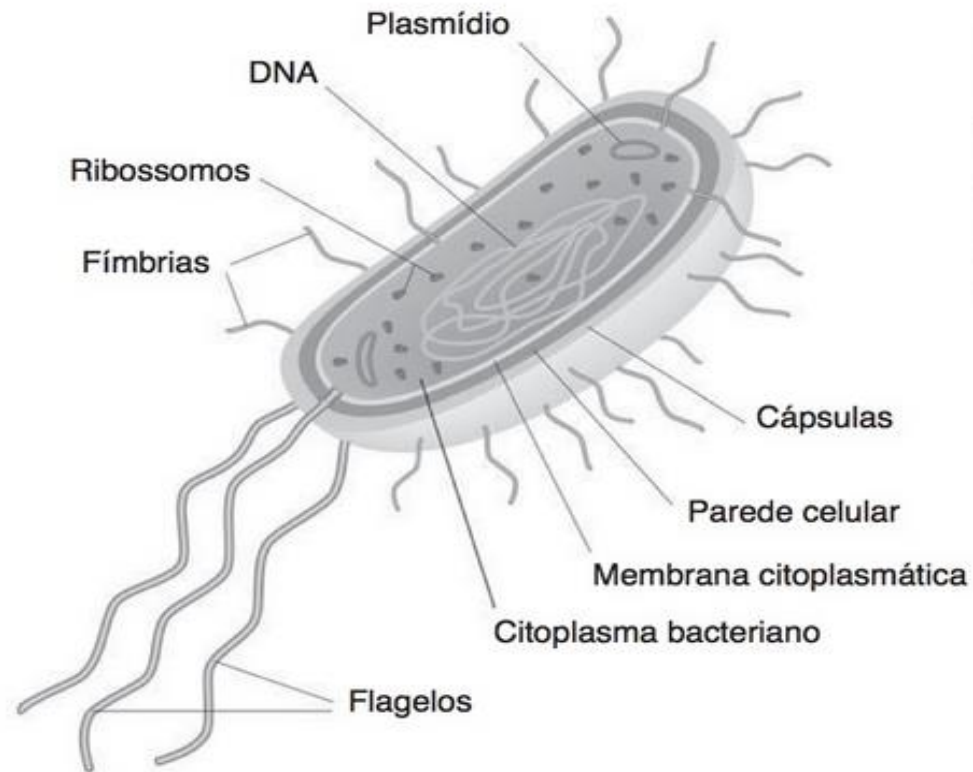
2.3.1.1 Bactérias

As bactérias são organismos unicelulares, procariotas (sem núcleo definido) e que se reproduzem por divisão binária simples. Além disso, só é possível identificá-las e analisar suas características morfológicas com o auxílio de um microscópio óptico, visto que são de escala micrométrica. Os seres humanos possuem cerca de dez vezes mais células bacterianas do que células humanas, o que é chamado de microbiota normal e habitualmente não acarreta em doenças para o hospedeiro. Quando a microbiota normal está equilibrada nos seres humanos, inibe o desenvolvimento de micro-organismos potencialmente perigosos e que causam doenças (GONÇALVES, 2003; BROOKS, 2014; SALVATIERRA, 2014).

As bactérias são diferenciadas de acordo com as suas características morfológicas em cocos, bacilos e espirilos (SALVATIERRA, 2014). Na Figura 2, é

possível observar as diversas estruturas internas e externas das bactérias, ainda que nem todas sejam iguais, e alguns grupos possuam certas características particulares.

Figura 2 – Estrutura bacteriana

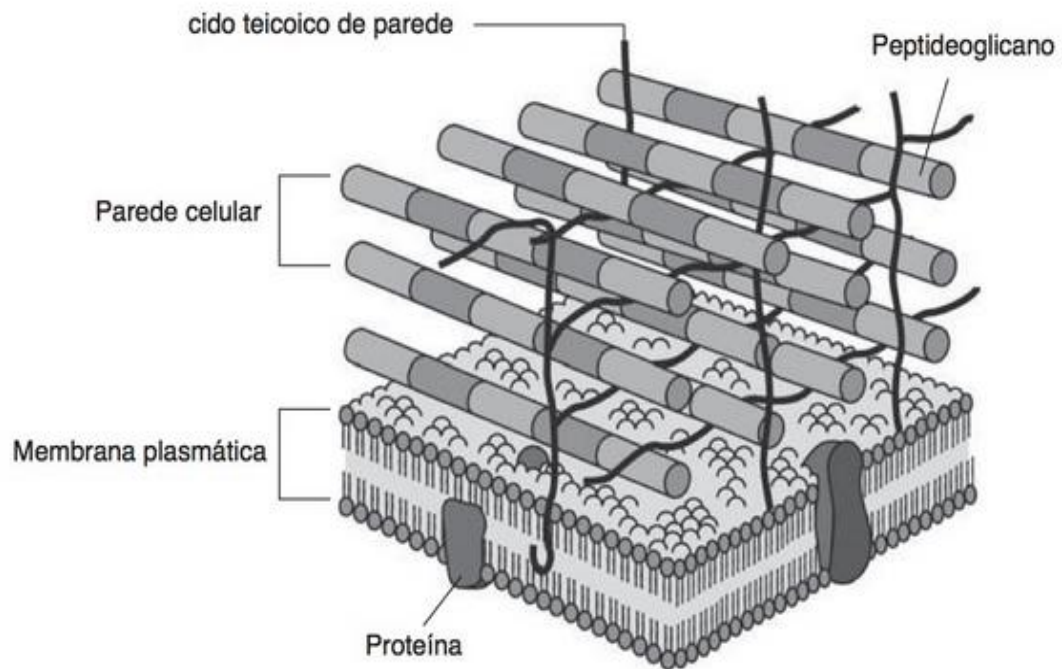


Fonte: Salvatierra (2014).

As bactérias também são classificadas, de acordo com as suas características tintoriais, em Gram-positivas ou Gram-negativas. A parede celular das bactérias confere, de modo geral, proteção à célula bacteriana, e é química e estruturalmente diferente nos dois grupos (BROOKS, 2014).

A Figura 3 apresenta a estrutura da parede celular do grupo de bactérias Gram-positivas, que é mais espessa e composta por uma única camada constituída por proteína e ácidos teicoicos. Esse tipo de bactéria pode causar doenças como difteria, tétano e botulismo (SALVATIERRA, 2014).

Figura 3 – Estrutura da parede celular de bactérias Gram-positivas

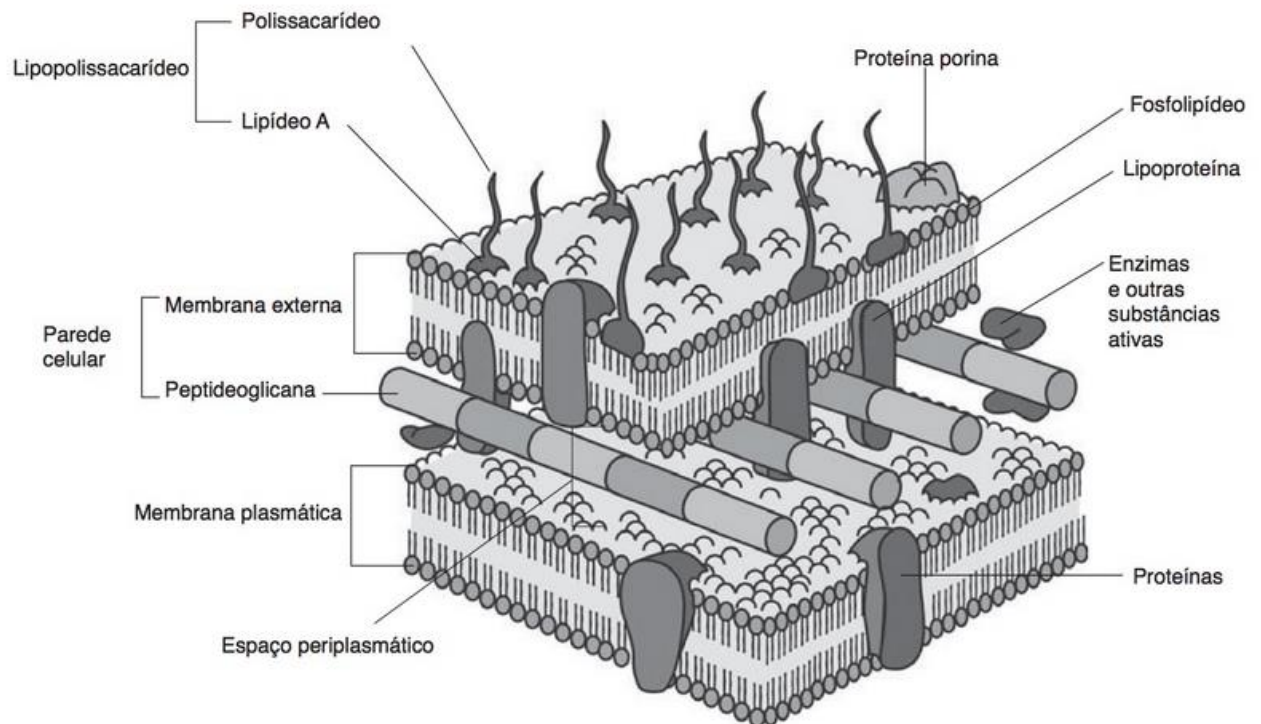


Fonte: Salvatierra (2014).

A *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é um exemplo de bactéria Gram-positiva. Ela é anaeróbia facultativa, apresentando-se sob a forma de cocos que geralmente são dispostos em cachos irregulares. Essa bactéria costuma ser encontrada com maior frequência na cavidade respiratória e na pele, e o processo de infecção do hospedeiro está associado, frequentemente, à alguma diminuição no sistema imunológico que facilita o acesso dos micro-organismos (LOVATEL, 2014; SALVATIERRA, 2014).

A Figura 4, por sua vez, apresenta a estrutura da parede celular do grupo de bactérias Gram-negativas, que é formada por duplas camadas, sendo a primeira constituída de lipossacarídeos, fosfolipídeos e lipoproteínas, e a segunda de peptidoglicanos. Esse tipo de bactéria pode causar leptospirose, febre tifoide, salmonelose e diversas outras doenças (BROOKS, 2014; SALVATIERRA, 2014).

Figura 4 – Estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas



Fonte: Salvatierra (2014).

A *Escherichia coli* (*E. coli*), da família das *Enterobacteriaceae*, é um exemplo de bactéria Gram-negativa. Ela é anaeróbia facultativa, em forma de bacilo, e costuma habitar o trato intestinal de seres humanos e animais. A *E. coli* faz parte da microbiota normal, e geralmente permanece inofensiva no intestino humano; no entanto, pode provocar doenças, geralmente em hospedeiros debilitados ou imunodeprimidos. Genericamente, essas bactérias também são chamadas de coliformes (BROOKS, 2014; SALVATIERRA, 2014).

As vias respiratórias e urinárias, boca e trato genital, ou seja, locais do corpo onde as mucosas entram em contato com a pele, além de cortes e queimaduras, são geralmente portas de entrada para as bactérias patogênicas. Esses micro-organismos podem se adaptar a diversos ambientes como solo, água e matéria orgânica, e devido a isso tem uma sobrevivência muito maior, aumentando também a possibilidade de transmissão de doenças (BROOKS, 2014).

Em função do que foi mencionado anteriormente, observa-se que diversos métodos de desinfecção vêm sendo aplicados para o tratamento terciário de efluentes, principalmente quando se deseja uma água para reuso.

2.3.2 Técnicas de desinfecção de efluentes

A desinfecção é um processo que tem por objetivo a inativação de micro-organismos patogênicos presentes na água ou no efluente, e que para isso, utiliza um agente químico ou não químico. A inativação dos micro-organismos pode ser feita por separação física, ação oxidativa, ou alteração do material genético celular, utilizando-se os seguintes mecanismos de ação:

- a) destruição ou desarranjo da estrutura celular;
- b) interferência no metabolismo energético, tornando as enzimas não funcionais;
- c) interferência na biossíntese e no crescimento celular, alterando funções como a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e coenzimas (DANIEL et al, 2001; DI BERNARDO; DANTAS, 2005).

A desinfecção é um processo seletivo, ou seja, não elimina todos os organismos patogênicos, mas busca inativar especialmente aqueles que ameaçam a saúde humana. Para isso, os agentes químicos que mais vêm sendo utilizados são os oxidantes cloro, ozônio e dióxido de cloro, enquanto a radiação UV se destaca entre os agentes físicos (GONÇALVES, 2003; DI BERNARDO; DANTAS, 2005).

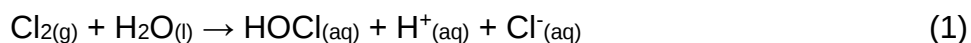
Um desinfetante ideal deve apresentar eficácia para inativar os micro-organismos patogênicos desejados, segurança para manuseio e aplicação, não apresentar toxicidade para o ser humano e outras formas de vida, ser estável e de fácil identificação e quantificação (METCALF; EDDY, 2016). É importante, portanto, abordar as técnicas de desinfecção mais aplicadas, observando a eficiência da desinfecção, mas também os subprodutos e toxicidade relacionados em cada um desses processos (DANIEL et al, 2001).

2.3.2.1 Cloração

A cloração é o processo de desinfecção mais utilizado em todo o mundo, tanto para águas de abastecimento quanto para efluentes sanitários e industriais, tendo em vista que essa tecnologia é largamente conhecida e possui viabilidade econômica e operacional para a sua aplicação. O cloro líquido ou gasoso e os hipocloritos de sódio e de cálcio são as formas mais comuns com os quais essa técnica vem sendo

aplicada. A ação desinfetante do cloro e de seus componentes ocorre principalmente por ser um forte agente oxidante, que oxida diretamente o material celular. Porém, alguns trabalhos relatam outros mecanismos envolvidos nessa técnica, como inibição enzimática e danificação do material genético (GONÇALVES, 2003; SALLES, 2008; SANTOS et al, 2013).

Os compostos de cloro reagem com água formando ácido hipocloroso (HOCl), que se dissocia em íons hipoclorito (OCl⁻) e hidrônio (H⁺) (Equações 1 e 2). A quantidade de HOCl e OCl⁻ em solução é chamada de cloro residual livre disponível e depende do pH do meio. Quanto maior a concentração de OCl⁻, maior a ação desinfetante e oxidante, e geralmente, quanto maior o pH, menor a reatividade do cloro (MEYER, 1994).



O ácido hipocloroso formado na Equação 1 é eficaz contra *E. coli* e *S. aureus*, devido a sua rápida penetração nas células bacterianas e reação com uma enzima essencial no metabolismo celular das bactérias. Entretanto, o cloro pode promover danos a tubulações, além de não ser eficaz contra outros micro-organismos, como cistos de *Giardia lamblia* e dos protozoários *Cryptosporidium spp.* Ademais, o tempo de contato necessário com o efluente é geralmente maior, se comparado a outros desinfetantes. Por fim, o cloro pode ainda reagir com a matéria orgânica dissolvida na água formando compostos organoclorados como trihalometanos, que estão associados ao câncer de estômago e de cólon (GONÇALVES, 2003; SANTOS et al., 2013).

2.3.2.2 Dióxido de cloro

O dióxido de cloro (ClO₂) é um agente bactericida muito utilizado em sistemas de tratamento de águas em substituição ao cloro, e possui ação desinfetante igual ou superior ao mesmo (DANIEL, et al., 2001). Lapolli et al. (2005) confirmou também a viabilidade de aplicação do ClO₂ como desinfetante eficiente para efluentes.

O ClO₂, em condições atmosféricas, é um gás instável, irritante, de coloração amarelada-avermelhada e de odor desagradável, e que apresenta um potencial de oxidação extremamente alto. A ação desinfetante se dá por meio de oxidação, sem a

formação de HOCl, e o mecanismo bactericida pode incluir a inativação de enzimas importantes para os micro-organismos ou a alteração da síntese de proteínas (METCALF; EDDY, 2016).

Em comparação ao cloro, o ClO_2 é mais atrativo devido ao fato de ser eficiente na desinfecção de efluentes sem a formação de trialometanos. Também possui outras vantagens, como a de suas propriedades bactericidas não serem influenciadas pelo pH e por serem mais eficientes para vírus, *Cryptosporidium spp.* e *Giardia lamblia*. Contudo, ainda não é uma alternativa viável para aplicação em pequena escala, devido ao alto custo e dificuldades de operação, além de produzir subprodutos como cloritos e cloratos (DANIEL, et al., 2001; LAPOLLI, et al., 2005).

2.3.2.3 Ozonização

A ozonização é uma técnica pouco utilizada ainda no Brasil, porém já é amplamente utilizada na Europa e nos Estados Unidos, principalmente no tratamento de águas de abastecimento. Segundo Daniel et al. (2001), o ozônio é o agente desinfetante com a melhor relação custo/benefício no tratamento de águas. No entanto, quando se trata da desinfecção de efluentes, principalmente sanitários, sua aplicação tornou-se economicamente competitiva apenas nas últimas duas décadas, com os avanços relacionados principalmente à geração de ozônio. O interesse nesse oxidante reside no fato de ser um excelente desinfetante, principalmente na inativação de vírus, mas também na de bactérias e protozoários, além de não formar compostos organoclorados, como os trialometanos, não aumentar a concentração de sólidos dissolvidos, e não perder eficiência na presença de amônia (LAPOLLI et al., 2003; SALLES, 2008).

O ozônio é uma forma alotrópica do oxigênio, um oxidante extremamente reativo, muito volátil e pouco estável. Sua ação desinfetante se dá por meio do residual de oxigênio molecular remanescente e a inativação dos micro-organismos ocorre pela desintegração da parede celular, levando à neutralização das células em milésimos de segundo. Sua instabilidade e seu alto poder oxidante são características desejáveis, pois a primeira não deixa resíduos perigosos no efluente, e a segunda diminui a concentração e o tempo de contato necessário para a desinfecção. Segundo Lapolli et al. (2003), o poder desinfetante do ozônio é cerca de 10 vezes superior ao do cloro, para todos os tipos de micro-organismos, e é efetivo inclusive na inativação

do *Cryptosporidium spp.* e *Giardia lamblia*, na qual o processo de cloração é ineficaz (DANIEL et al., 2001; METCALF; EDDY, 2016).

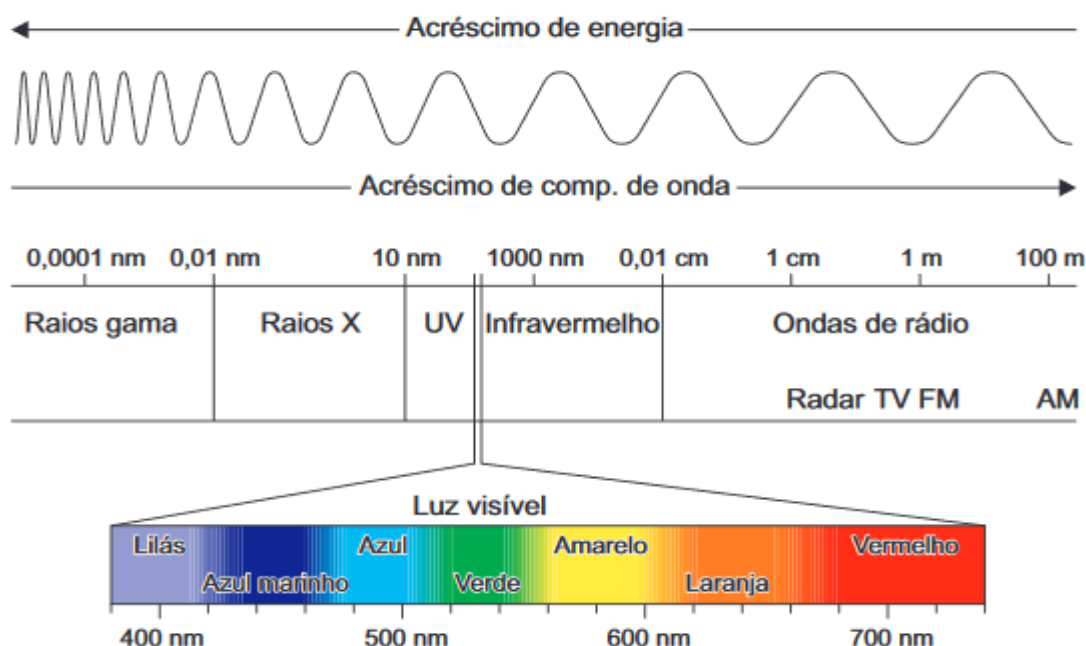
No entanto o ozônio também possui limitações e desvantagens, como o fato de ser eficaz somente no momento em que é adicionado ao meio, pois se decompõe em oxigênio ao destruir as células, e, portanto, não tem ação residual. Além disso, os subprodutos de desinfecção, geralmente influenciados pela composição do efluente e não do ozônio diretamente, podem causar uma eventual toxicidade a organismos aquáticos, danificando o seu DNA. Nos seres humanos, a toxicidade está relacionada quase que exclusivamente com a aspiração direta, extremamente perigosa; e apresenta um elevado custo para implantação (SALLES, 2008; METCALF; EDDY, 2016).

2.3.2.4 Radiação ultravioleta (UV)

A aplicação da radiação UV na desinfecção de efluentes evoluiu a partir do final do século XX, basicamente depois da década de 1990, apesar de sua ação germicida já ter sido comprovada antes disso. Essa técnica não é competitiva economicamente em relação à cloração, porém quando é necessária a implantação de uma etapa de descloração (para remover os subprodutos tóxicos de cloro), ela se torna altamente atrativa, com a grande vantagem de não gerar compostos organoclorados, como trihalometanos. Além disso, nenhum tipo de produto é adicionado à corrente líquida, pois a desinfecção com UV atua por meio físico, e se deve à exposição dos micro-organismos à radiação emitida por lâmpadas específicas, que ocorrem em canais ou dutos sob pressão chamados de reatores fotoquímicos, fotorreatores ou reatores UV (DANIEL et al., 2001; GONÇALVES et al., 2003).

A luz é caracterizada como parte do espectro de ondas eletromagnéticas de diversos comprimentos de onda, que vão de ondas de rádio até raios X (Figura 5). A luz UV assume comportamento corpuscular (fótons), já que possui comprimentos de onda curtos, e a quantidade de energia dos fótons é inversamente proporcional ao comprimento de onda da luz (GONÇALVES et al., 2003).

Figura 5 – Espectro eletromagnético



Fonte: Gonçalves et al. (2003).

A radiação infravermelha é incapaz de causar modificação química nos compostos, devido ao seu comprimento de onda relativamente alto e baixa energia associada. Já na radiação UV, a energia dos fótons é suficiente para romper uma ou mais ligações químicas entre os átomos (GONÇALVES et al., 2003).

A alteração do material genético é o mecanismo de desinfecção por radiação UV, que penetra na parede celular dos micro-organismos e é absorvida pelos ácidos nucleicos (DNA e RNA), que são responsáveis pelo seu desenvolvimento. Os danos causados a eles interferem na síntese e divisão celular, processos normais que acontecem nas células. As moléculas de DNA dos micro-organismos que devem ser inativados absorvem radiações com comprimento de onda entre 200 e 300 nm, que alteram sua composição e dificultam a replicação do ácido nucleico (GONÇALVES et al., 2003; METCALF; EDDY, 2016).

A técnica de desinfecção por radiação UV tem como vantagens: ser eficaz na inativação de micro-organismos (na dosagem correta); ser um processo físico, ou seja, não necessita de geração, transporte ou estocagem de produtos químicos; não gerar efeitos residuais prejudiciais à vida aquática ou a seres humanos; e o tempo de contato ser menor quando comparado a outros desinfetantes. Por outro lado, em alguns casos, os micro-organismos podem reparar e reverter os efeitos destrutivos do UV, mecanismo conhecido como fotorreativação ou recuperação no escuro, a turbidez

ou sólidos em suspensão no efluente podem prejudicar a eficiência da inativação, e qualquer irregularidade no equipamento pode causar danos aos operadores do sistema, já que a radiação UV causa lesões nos olhos e câncer de pele (GONÇALVES et al., 2003; VARGAS, 2008; LOVATEL, 2014).

2.3.2.5 Desenvolvimento de novas técnicas de desinfecção

O fato de todas as técnicas relacionadas possuírem vantagens e desvantagens, na desinfecção de água e efluentes, tem instigado a pesquisa de novos materiais e tecnologias eficientes, e de baixo custo para esse fim. A combinação de materiais tem se mostrado interessante, uma vez que determinadas propriedades obtidas não são encontradas em materiais convencionais (JOSÉ; PRADO, 2005; ELTZ, 2017).

Diversos materiais híbridos, combinando a flexibilidade dos compostos orgânicos com a estabilidade térmica e química de materiais inorgânicos, vêm sendo estudados, devido as suas propriedades bactericidas, e têm demonstrado bons resultados na remoção de micro-organismos (JOSÉ; PRADO, 2005). El-liethy, Elwakeel e Ahmed (2018), por exemplo, sintetizaram novos desinfetantes magnéticos à base de tioureia-formaldeído contendo íons Ag^+ ou Au^{3+} para a desativação de micro-organismos patogênicos na água, e obtiveram resultados acima de 93% para todos os micro-organismos testados no trabalho.

Além disso, a utilização de nanopartículas metálicas, em várias aplicações biotecnológicas, representa uma das áreas mais investigadas da ciência de materiais atualmente. Essas aplicações requerem a funcionalização química apropriada das nanopartículas com moléculas orgânicas ou a sua incorporação em matrizes poliméricas adequadas (DALLAS; SHARMA; ZBORIL, 2011). Lovatel (2014), nesse âmbito, estudou a eficiência de híbridos de alginato de sódio e montmorilonita com AgNPs ancoradas na eliminação de micro-organismos de efluentes industriais. Os resultados indicaram uma redução de 98,5% em termos de coliformes fecais, e foram aproximadamente 16% superiores se comparados ao tratamento do efluente com a radiação UV.

Estudos sobre híbridos de quitosana com AgNPs, suas propriedades e seu potencial bactericida também estão ganhando ênfase na literatura, como nos estudos realizados por Sanpui et al. (2008), Neto (2010), González-Campos et al. (2012), Neves (2013), Pereira (2017) e Biao (2017), que mostraram que a associação desses

dois materiais apresenta um grande potencial na inativação de micro-organismos presentes em efluentes sanitários e industriais. Para aumentar a estabilidade e reduzir o risco da quitosana ser solubilizada em meio ácido, quando submetida ao tratamento de efluentes, ainda é possível utilizar agentes reticulantes na síntese dos materiais, como o glutaraldeído, glioxal, benzoquinona, ciclodextrina, ácido iminodiacético, ácido nitriloacético, entre outros (MIGNEAULT, 2004; WEI et al., 2008; FARIA, 2017).

2.4 QUITOSANA

Obtida por meio da desacetilação da quitina, o segundo polímero natural mais abundante no mundo, biocompatível e biodegradável, a quitosana é atóxica, renovável e de baixo custo. Das duas, a quitina é a encontrada em maior abundância na natureza, e tem como principais fontes as carapaças de crustáceos como o caranguejo, o camarão e a lagosta, mas também em insetos, moluscos e na parede celular de fungos. Apesar de a quitina ter aplicações na indústria têxtil, alimentícia e de cosméticos, a sua principal utilização é na produção da quitosana, que possui ainda mais aplicações, como mostra o Quadro 2 (CRAVEIRO; CRAVEIRO; QUEIROZ, 1999; CRINI; BADOT, 2007; AZEVEDO et al., 2007).

Quadro 2 – Principais aplicações da quitosana

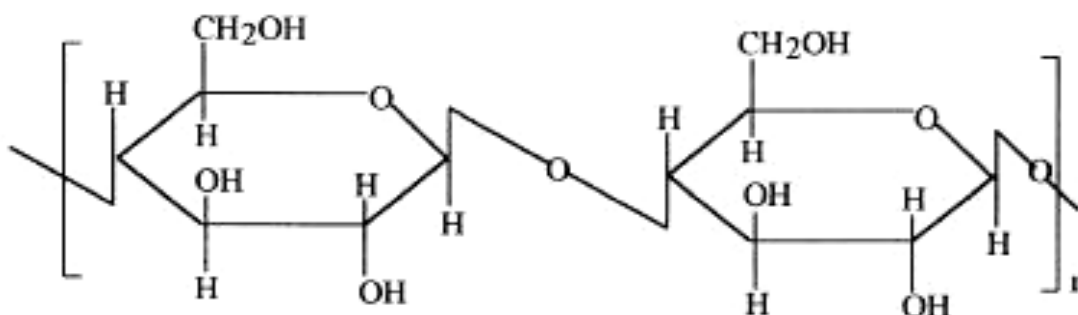
Área de aplicação	Exemplos de aplicação
Biomédica	Suturas cirúrgicas, implantes dentários, reconstituição óssea, lentes de contato, liberação controlada de fármacos em animais e humanos, e encapsulamento de materiais
Agricultura	Mecanismos defensivos e adubo para plantas
Tratamento de água	Floculante para clarificação, remoção de íons metálicos e redução de odores
Indústria alimentícia	Fibras dietéticas, redução do colesterol, conservante para molhos, fungicida e bactericida
Indústria de cosméticos	Esfoliante para a pele, tratamento de acne, hidratante capilar e creme dental
Biofarmacêutica	Antitumoral, hemostático e anticoagulante

Fonte: Azevedo et al., (2007); Crini e Badot, (2007).

A quitosana é um polissacarídeo com uma estrutura molecular quimicamente semelhante à da celulose, sendo diferenciada pelos grupos amino presentes na primeira que substituem os grupos hidroxila da segunda (Figuras 6 e 7,

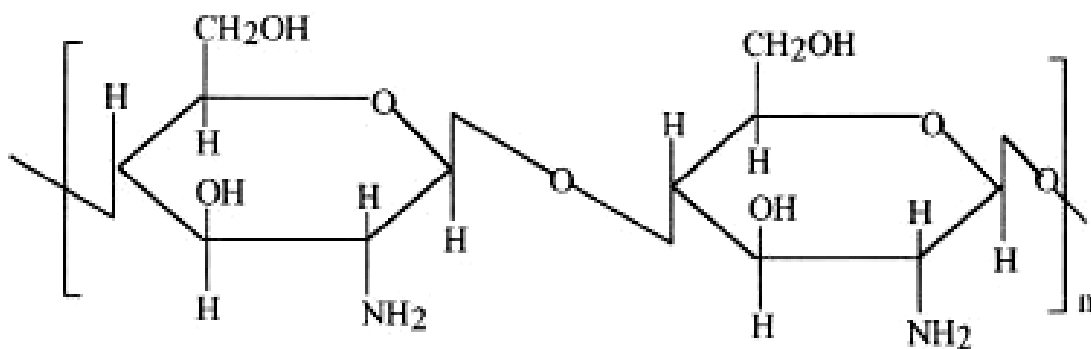
respectivamente). De modo geral, é insolúvel em água e ácidos minerais concentrados, e solúvel em ácidos orgânicos; porém, sua solubilidade pode variar de acordo com o processo de desacetilação. No estado sólido, é um material semicristalino, além de ser um excelente quelante, propriedade que permite que seja aplicada em diversas áreas (CRAVEIRO; CRAVEIRO; QUEIROZ, 1999; AZEVEDO et al., 2007).

Figura 6 – Estrutura química da celulose



Fonte: Azevedo et al. (2007).

Figura 7 – Estrutura química da quitosana



Fonte: Azevedo et al. (2007).

As microesferas de quitosana, se comparadas à quitosana em flocos, possuem área superficial cerca de 100 vezes maior e, em razão disso, sua capacidade de adsorção também é superior. A multifuncionalidade da quitosana permite que sejam preparadas microesferas para diferentes propósitos, com formas e tamanhos variados, além da possibilidade de combinação com diversos materiais para atingir as propriedades desejadas para cada aplicação (AZEVEDO et al., 2007).

Nos últimos anos, a utilização da quitosana na área de tratamento de efluentes tem recebido considerável atenção: no desenvolvimento de materiais à base de

quitosana utilizadas como matrizes poliméricas adsorventes para aplicação, por exemplo, na remoção de corantes de soluções aquosas, ou de íons metálicos; e na associação da mesma com AgNPs para fins de desinfecção, como citado anteriormente (CRINI; BADOT, 2007; VAKILI et al., 2014; BIAO, 2017).

2.5 NANOTECNOLOGIA

A Nanotecnologia é uma ciência que estuda materiais em escala nanométrica, compreendidos em um intervalo entre 1 a 100 nm, e com propriedades específicas que dependem principalmente de sua forma e tamanho. Nos últimos anos, ela tem sido um campo de pesquisa promissor, oferecendo melhora no desempenho de técnicas já utilizadas e contribuindo para o aparecimento de novas estratégias (SCHNEID, 2014; BORJES; GOMES; ENGELMANN, 2014).

As propriedades químicas, físicas e biológicas dos materiais são modificadas ao serem reduzidos à escala nanométrica. Maior resistência a tensões, ação antimicrobiana e alta capacidade de armazenamento de dados e de energia, são algumas dessas propriedades que permitem que os nanomateriais venham se destacando em diversas áreas do conhecimento, como medicina, ciência da computação, eletrônica, engenharia dos materiais, química, física e biologia. Novos materiais utilizando nanotubos, nanofios e nanopartículas metálicas vêm sendo desenvolvidos, em busca de propriedades ou funções ainda melhores (SCHNEID, 2014; SALAZAR, 2015).

2.5.1 Nanopartículas metálicas

A utilização de nanopartículas metálicas, nas mais diversas áreas do conhecimento, mas principalmente na Engenharia e Ciência dos Materiais, tem sido extensivamente investigada. Nas últimas décadas, as mesmas têm sido aplicadas como agentes antimicrobianos, pelas inúmeras nanopartículas que podem ser sintetizadas, sua alta atividade catalítica e estabilidade química, além de sua elevada área superficial, que permite que sejam eficientes em concentrações e volumes muito baixos. A relação superfície/volume também permite que as nanopartículas metálicas interajam diretamente com as membranas microbianas, e não somente através da

liberação de íons metálicos em solução (MORONES et al., 2005; DALLAS; SHARMA; ZBORIL, 2011).

Nanopartículas metálicas têm sido desenvolvidas e testadas com o objetivo de aumentar a eficiência dos processos de desinfecção da água, entre outras aplicações. A necessidade de contribuições para o avanço tecnológico nesse contexto é imprescindível, já que a demanda por água em todo o mundo tem crescido exponencialmente, e os corpos hídricos estão cada vez mais deteriorados. As AgNPs e nanopartículas de cobre (CuNPs) têm sido estudadas para esse fim, e apesar de ambas possuírem alta ação bactericida, estabilidade química, condutividade elétrica e alta atividade catalítica, resultados apontam que as AgNPs são mais eficientes na desinfecção da água de efluentes industriais (NETO, 2010; ELTZ, 2017).

2.5.1.1 Nanopartículas de prata (AgNPs)

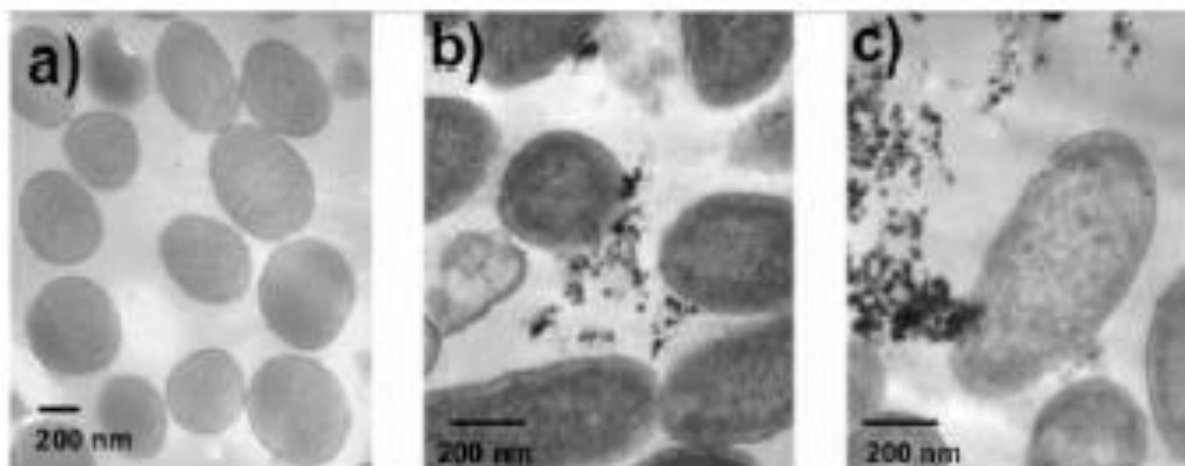
Os compostos de prata são conhecidos desde a antiguidade por sua eficácia antimicrobiana, e já eram utilizados desde o início do século XVIII para controlar infecções e prevenir que certos alimentos se deteriorassem. Atualmente, geladeiras, telefones celulares, escovas de dente e cosméticos contêm prata como agente antibacteriano (COSTA, 2011; CHERNOUSOVA; EPPLE, 2013).

Além de sua boa estabilidade química, condutividade, e atividade catalítica, uma das maiores vantagens das AgNPs, quando comparadas com outros agentes antimicrobianos, é que a prata é um dos mais eficazes contra uma ampla gama de micro-organismos, como vírus, fungos e bactérias, tanto Gram-negativas (*E. coli*) como Gram-positivas (*S. aureus*), apresentando toxicidade humana extremamente baixa (DALLAS; SHARMA; ZBORIL, 2011; NEVES, 2013).

Apesar de ser possível obter AgNPs por diferentes rotas de síntese, a redução química é uma das mais amplamente utilizadas: parte de sais precursores de prata, como nitrato de prata (AgNO_3) ou iodeto de prata (AgI), e necessita do uso de agentes redutores e estabilizantes, como o boroidreto de sódio e o citrato de sódio, respectivamente. Seu mecanismo de ação para inativar micro-organismos ainda não é totalmente compreendido; no entanto, a interrupção da replicação do DNA, devido à interação com os tiois presentes na estrutura de enzimas que são essenciais para o funcionamento das células, é um dos principais mecanismos sugeridos (RAI; YADAV; GADE, 2008; DALLAS; SHARMA; ZBORIL, 2011).

Na Figura 8, onde são apresentadas imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET), observa-se a diferença das bactérias, antes e depois de serem tratadas com AgNPs. É possível verificar as nanopartículas no interior da bactéria, e danos perceptíveis na membrana celular, que inibem a replicação do DNA, se comparado às bactérias que não entraram em contato com as AgNPs.

Figura 8 – Ação das AgNPs frente a bactérias de *Pseudomonas aeruginosa*:
(a) antes do tratamento com AgNPs; (b) e (c) tratadas com AgNPs

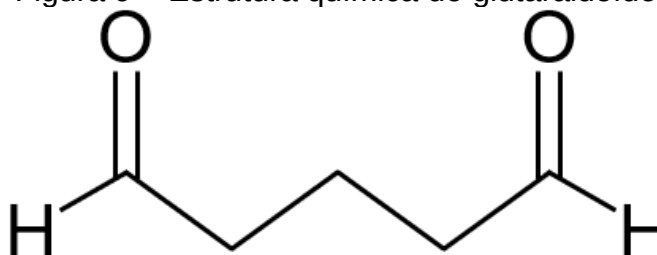


Fonte: Morones et al. (2005).

2.6 AGENTE RETICULANTE: GLUTARALDEÍDO

O glutaraldeído ($C_5H_8O_2$) é um dialdeído alifático de estrutura química relativamente simples, como mostra a Figura 9. É solúvel em água e solventes orgânicos, e interage fortemente com compostos que possuem grupos amino na sua estrutura (MIGNEAULT, 2004).

Figura 9 – Estrutura química do glutaraldeído

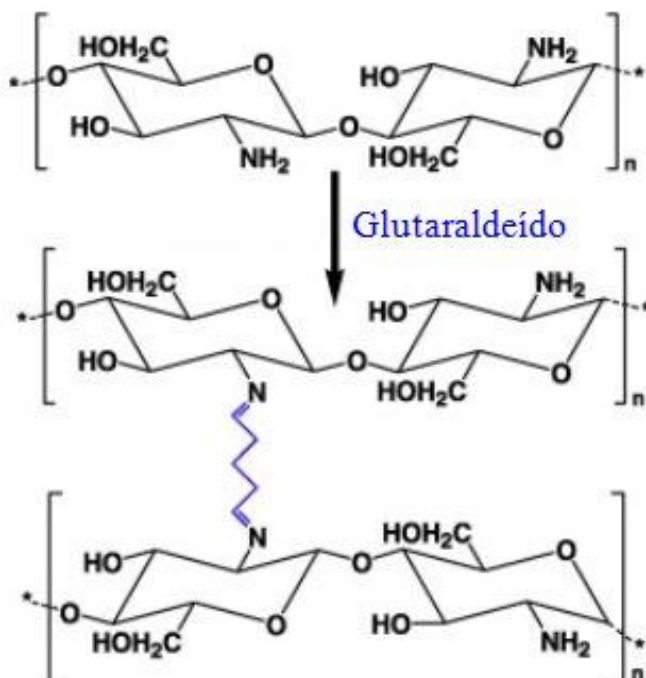


Fonte: Adaptado de Migneault (2004).

Foi descoberto no início da década de 1970, e desde lá tem sido utilizado para a desinfecção e esterilização, principalmente em ambientes hospitalares, em instrumentos cirúrgicos e de diálise, broncoscópios e endoscópios, devido ao seu alto potencial antibacteriano. É também utilizado como agente de reticulação de polipeptídios e proteínas, e também de alguns polissacarídeos, como o ácido hialurônico e a quitosana, e confere a eles uma maior estabilidade química e física (MIGNEAULT, 2004; ELTZ, 2017).

Os polissacarídeos, em especial, podem ser reticulados através de uma reação entre os grupos OH ou NH_2 . Ao utilizar o glutaraldeído como agente reticulante da quitosana, por exemplo, a reação ocorre entre os grupos carbonila ($\text{C}=\text{O}$) do glutaraldeído e os grupos amino (NH_2) da quitosana, formando uma rede tridimensional, conforme ilustra a Figura 10. A reticulação, ao introduzir ligações cruzadas entre as macromoléculas da quitosana, reduz a mobilidade das cadeias poliméricas, aumentando a estabilidade química, a resistência mecânica e a vida útil do material.

Figura 10 – Reação de reticulação entre a quitosana e o glutaraldeído



Fonte: Adaptado de Crini (2005).

2.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Ao observar um sistema ou processo, é possível, em partes, compreender como eles funcionam. No entanto, nas vezes em que há necessidade de entender o que acontece com um processo quando variáveis são alteradas, é necessário que se faça uma série de experimentos, onde mudanças intencionais são feitas nas variáveis de entrada para de fato compreender as suas relações de causa e efeito com os resultados de saída. Podemos utilizar essas respostas às variáveis de entrada, por exemplo, para melhorias no processo (MONTGOMERY; CUSTER; MCCARVILLE, 2013).

Como geralmente os fatores de entrada não são independentes entre si, o método fator-por-fator não é uma ferramenta adequada, pois vai requerer uma alta quantidade de experimentos, e consequentemente dispende de mais tempo e recursos. Devido a isso, o planejamento de experimentos (DOE) é uma abordagem mais eficaz, pois seu objetivo é determinar o número ideal de experimentos necessários para que se obtenha o ponto ótimo de operação com um certo grau de confiabilidade, levando em consideração as interações entre as variáveis (MONTGOMERY; CUSTER; MCCARVILLE, 2013).

Uma das estratégias de experimentação mais utilizada é a chamada OFAT (do inglês, *one-factor-at-a-time*), que consiste em variar apenas um fator, enquanto os outros são mantidos constantes. A principal desvantagem dessa técnica é que ela não considera qualquer interação possível entre os fatores, enquanto um deles é alterado. Essas interações são muito comuns, e se ocorrerem, a estratégia pode apresentar resultados bastante ruins; por isso, os experimentos fatoriais sempre são mais adequados. Nos experimentos fatoriais, os fatores são variados conjuntamente, ao invés de um de cada vez, e dessa forma são capazes de verificar a existência de interações entre duas ou mais variáveis do processo (MONTGOMERY; CUSTER; MCCARVILLE, 2013).

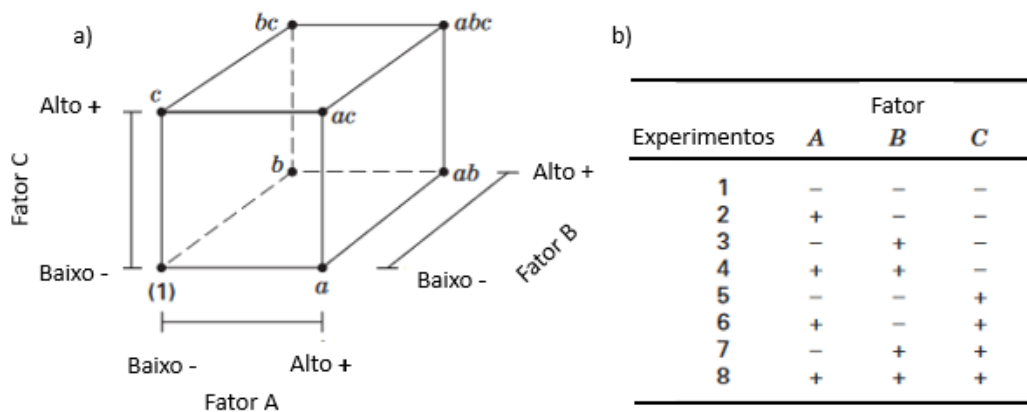
2.7.1 Planejamento fatorial 2^k

Existem vários casos de planejamento para a análise fatorial. Os mais utilizados são os modelos do tipo 2^k , onde k representa o número de fatores independentes no experimento, e cada fator é testado em dois níveis, um baixo (-1) e um alto (+1), ao

mesmo tempo. Os planejamentos 2^k presumem modelos lineares, e são muito úteis em estágios iniciais de uma pesquisa ou trabalho, quando existem ainda muitos fatores a serem investigados (MONTGOMERY; CUSTER; MCCARVILLE, 2013).

Quando o interesse for variar três fatores, cada um em dois níveis, utiliza-se o planejamento fatorial 2^3 , onde existem 8 combinações de experimento, que podem ser exibidas geometricamente como um cubo, conforme ilustra a Figura 11a. Utilizando os níveis baixo (-1) e alto (+1), é possível listar as 8 execuções no projeto 2^3 , como mostra a Figura 11b (MONTGOMERY; CUSTER; MCCARVILLE, 2013).

Figura 11 – Representação do planejamento fatorial 2^3 : **(a)** visão geométrica; **(b)** lista de experimentos



Fonte: Montgomery, Custer e Mccarville (2013).

2.7.2 Análise estatística

Através de softwares adequados é possível adquirir diversos parâmetros com os resultados obtidos na realização dos experimentos. A significância estatística dos fatores independentes, ou da interação entre eles, é um dos mais importantes para se verificar a influência dos mesmos sobre a variável resposta (MONTGOMERY; CUSTER; MCCARVILLE, 2013).

De modo a obter esse parâmetro, um nível de significância (α) é definido, valor que representa o intervalo de confiança escolhido para o planejamento experimental. Para que um fator seja estatisticamente significativo sobre a variável resposta, deve apresentar um p -valor que não ultrapasse o nível de significância de cada variável independente ou interação entre elas. Além do p -valor, que representa a significância de cada fator no modelo, também é possível calcular um F -valor para se ter ideia

também da significância do modelo como um todo. O valor de F encontrado deve ser maior do que o valor de F tabelado para os parâmetros utilizados no DOE para que o modelo seja estatisticamente significativo (SPIEGEL, 2004; MONTGOMERY; CUSTER; MCCARVILLE 2013). Os parâmetros necessários para encontrar o valor de F estão dispostos na Tabela 1 e geralmente são fornecidos pelo software utilizado para o planejamento de experimentos.

Tabela 1 – Análise de variância (ANOVA)

	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	F
Regressão	SQR	GLR	$MQR = \frac{SQR}{GLR}$	$F = \frac{MQR}{MQE}$
Resíduos (Erro)	SQE	GLE	$MQE = \frac{SQE}{GLE}$	-
Total	SQT	GLT	-	-

SQR: soma dos quadrados do modelo, SQE: soma dos quadrados do resíduo, SQT: soma dos quadrados total, GLR: grau de liberdade do modelo, GLE: grau de liberdade do resíduo, GLT: grau de liberdade total, MQR: média dos quadrados do modelo, MQE: média dos quadrados do resíduo.

Fonte: Adaptado de Silva (2008).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Os reagentes químicos utilizados neste trabalho foram: ácido acético glacial 100% ($C_2H_4O_2$, Merck), hidróxido de sódio (NaOH, Merck), glutaraldeído 50% (m/v) ($C_5H_8O_2$, Sigma-Aldrich), nitrato de prata ($AgNO_3$, Merck), boroidreto de sódio ($NaBH_4$, Merck) e citrato de sódio tribásico dihidratado ($Na_3C_6H_5O_7$, Sigma-Aldrich). A quitosana de alta massa molar foi adquirida da Sigma-Aldrich. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água deionizada ultrapura (resistividade de 18,2 $M\Omega\ cm$), obtida a partir de um equipamento Millipore Direct-Q 3 UV.

3.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

3.2.1 Síntese das AgNPs

As AgNPs foram obtidas pela redução química do $AgNO_3$ por $NaBH_4$ na presença de $Na_3C_6H_5O_7$, utilizado como estabilizante, com base no método proposto por Eltz (2017). Para tanto, 250 mL de uma solução de $Na_3C_6H_5O_7$ na concentração de 0,25 mmol L^{-1} foram adicionados a 250 mL de uma solução de $AgNO_3$ de mesma concentração, e manteve-se essa mistura sob agitação magnética durante 30 s. Em seguida, 10 mL de uma solução de $NaBH_4$ 1,00 mmol L^{-1} (recém-preparada) foi adicionada lentamente à mistura, a qual manteve-se sob agitação por mais 60 s. A solução foi utilizada logo após o seu preparo.

3.2.2 Caracterização das AgNPs

As AgNPs foram caracterizadas por meio da técnica de espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-Vis). Os espectros foram registrados em um espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution 60, no Laboratório de Ciência dos Materiais da Universidade de Caxias do Sul (LCMAT/UCS), na faixa de comprimento de onda situada entre 300 e 500 nm.

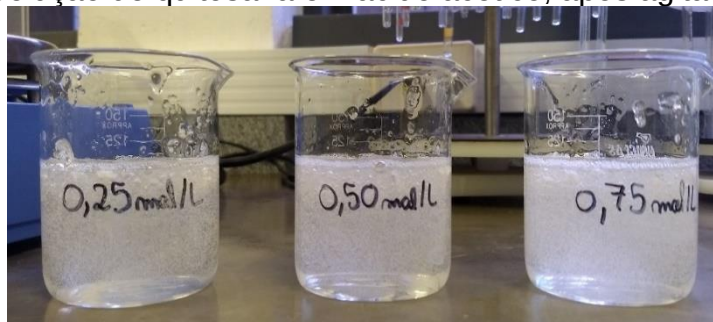
3.3 PREPARAÇÃO DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA E PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O método utilizado na preparação das microesferas de quitosana teve por base o procedimento descrito por Barreiro-Iglesias, Concheiro e Alvarez-Lorenzo (2005). No entanto, as condições que influenciam diretamente nas propriedades bactericidas desses materiais foram previamente avaliadas por meio de um planejamento experimental do tipo 2³.

3.3.1 Preparação das microesferas e incorporação das AgNPs

As microesferas de quitosana contendo AgNPs foram preparadas a partir da dissolução de 1,5 g de quitosana em 100 mL de ácido acético (de concentração 0,25, 0,50 ou 0,75 mol L⁻¹), sob agitação magnética durante 15 min (Figura 12).

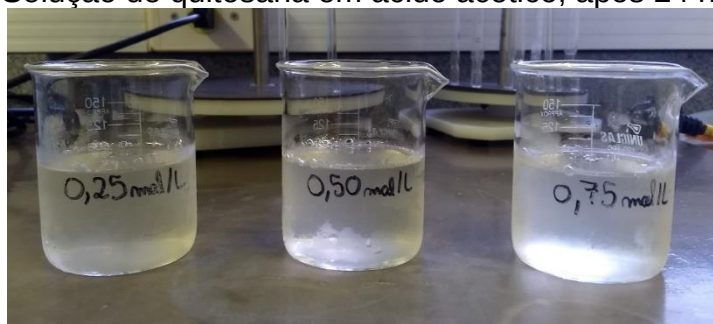
Figura 12 – Solução de quitosana em ácido acético, após agitação magnética



Fonte: O autor (2019).

Essa solução foi mantida em repouso por 24 h com o objetivo de solubilizar completamente o biopolímero e eliminar as bolhas formadas durante o processo de dissolução (Figura 13).

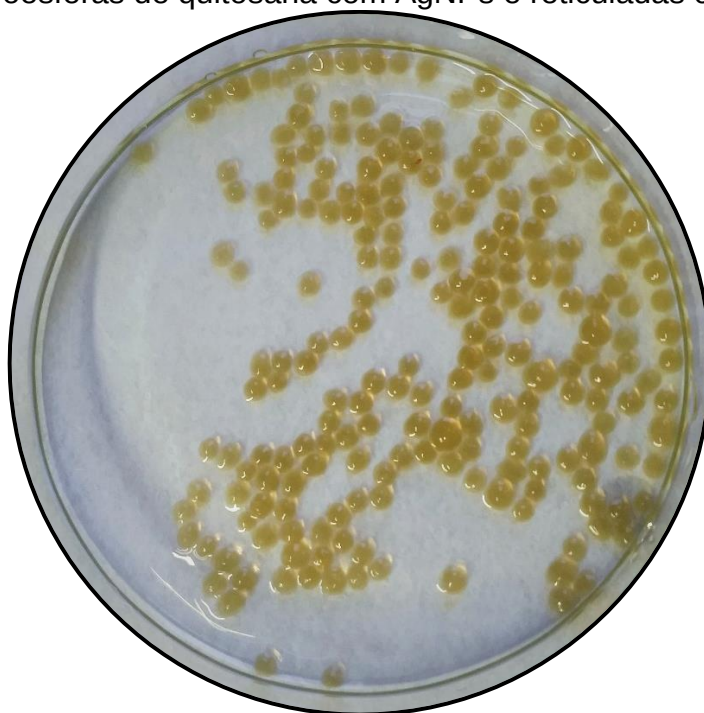
Figura 13 – Solução de quitosana em ácido acético, após 24 h sob repouso



Fonte: O autor (2019).

Ao término dessa etapa, um certo volume de AgNPs (1,0, 2,0 ou 3,0 mL) foi adicionado a uma determinada massa da solução de quitosana (7,0 8,0 ou 9,0 g), de modo a preparar soluções de 10,0 g, com diferentes percentuais de AgNPs na amostra. Por fim, um certo volume de glutaraldeído foi adicionado à solução (30,0, 45,0 ou 60,0 μL), e a mesma foi gotejada, com o auxílio de uma seringa de 10 mL, em uma solução de NaOH 1,5 mol L⁻¹. A formação das microesferas (Figura 14) se deve ao fato de que a quitosana é solúvel em meios ácidos, porém é insolúvel em meios alcalinos (GONSALVES, 2011). Elas foram deixadas em repouso nessa solução durante 1 h, e logo após lavadas e armazenadas em água para posterior utilização.

Figura 14 – Microesferas de quitosana com AgNPs e reticuladas com glutaraldeído



Fonte: O autor (2019).

3.3.2 Planejamento experimental

Com o objetivo de definir as condições experimentais que resultassem em um material com a maior atividade bactericida possível, foi utilizado um planejamento experimental do tipo 2³. Para tal, foram variados, durante a preparação das microesferas, a concentração molar de ácido acético, o volume de agente reticulante (glutaraldeído), e o percentual de AgNPs adicionado à solução. A variável resposta foi a medida das zonas de inibição, obtidas para cada microesfera, em ensaios com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

O modelo experimental proposto, para três variáveis, resultou em um total de 9 experimentos únicos, com triplicata do ponto central, resultando em 11 ensaios. A análise dos experimentos foi efetuada com o auxílio do Software Statistica 10, onde a significância estatística dos fatores foi avaliada por meio da técnica de Análise de Variância (ANOVA). Na Tabela 2 pode ser visualizada a matriz experimental gerada no software, onde A, B e C são as variáveis concentração molar de ácido acético (mol L^{-1}), volume de glutaraldeído (μL) e o percentual de AgNPs no material (%), respectivamente. Os intervalos dos valores utilizados foram definidos com base em testes preliminares, e os experimentos foram realizados em ordem aleatória.

Tabela 2 – Matriz do planejamento experimental

Experimentos	Valores codificados			Valores reais		
	A	B	C	A	B	C
7	-1	1	1	0,25	60,0	30,0
2	1	-1	-1	0,75	30,0	10,0
9 (C)	0	0	0	0,50	45,0	20,0
3	-1	1	-1	0,25	60,0	10,0
1	-1	-1	-1	0,25	30,0	10,0
11 (C)	0	0	0	0,50	45,0	20,0
8	1	1	1	0,75	60,0	30,0
10 (C)	0	0	0	0,50	45,0	20,0
6	1	-1	1	0,75	30,0	30,0
4	1	1	-1	0,75	60,0	10,0
5	-1	-1	1	0,25	30,0	30,0

A: concentração de ácido acético (mol L^{-1}), B: volume de glutaraldeído (μL), C: percentual de solução de AgNPs no material.

Fonte: O autor (2019).

3.3.3 Avaliação da atividade bactericida

Para avaliar a atividade bactericida das microesferas de quitosana contendo as AgNPs, e obter a variável resposta do planejamento experimental, as mesmas foram submetidas ao teste de difusão em ágar utilizando duas bactérias: *E. coli* (Gram-negativa) e *S. aureus* (Gram-positiva). Suspensões das duas bactérias foram preparadas e espalhadas de forma homogênea sobre o ágar nutriente, contido em diferentes placas de Petri, onde as microesferas obtidas em cada experimento do planejamento experimental foram depositadas (uma placa de Petri para cada micro-organismo). As placas de Petri foram incubadas em uma estufa bacteriológica a uma

temperatura de 37 °C por 24 h, e ao término desse período, as zonas de inibição foram medidas com o auxílio de uma régua.

3.4 DESINFECÇÃO DO EFLUENTE INDUSTRIAL

Através do resultado obtido no planejamento experimental, as microesferas de quitosana contendo AgNPs de condição experimental correspondente à maior zona de inibição, ou seja, maior atividade bactericida, foram aplicadas na desinfecção de uma amostra de efluente industrial.

O ensaio consistiu em agitar, em uma incubadora do tipo shaker, seis recipientes contendo 150 mL do efluente e 50 microesferas (Figura 15), por períodos de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min, de modo a analisar o percentual de remoção de coliformes totais em função do tempo de contato. Além das seis amostras do ensaio, o efluente bruto também foi analisado para que fosse possível calcular o percentual de remoção, a partir dos valores da amostra sem tratamento.

Figura 15 – Amostras dispostas na incubadora do tipo shaker antes do ensaio de desinfecção do efluente industrial



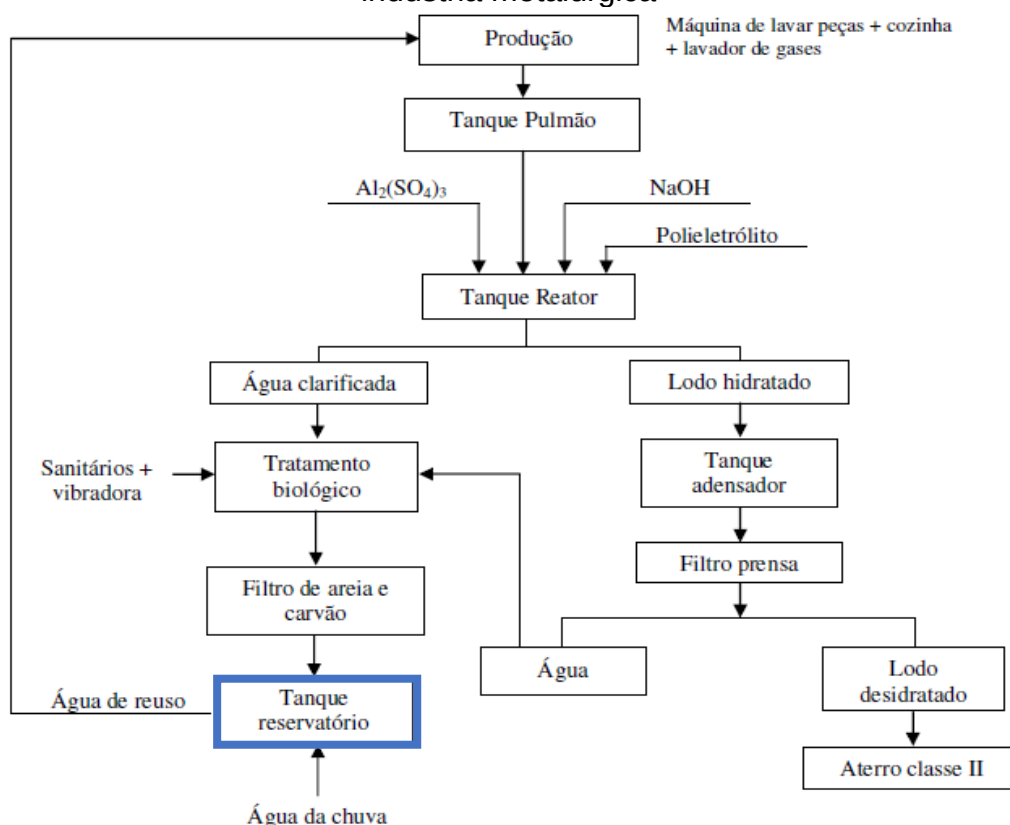
Fonte: o autor (2019).

A determinação da quantidade de coliformes totais e bactérias *E. coli* no efluente antes e depois do ensaio de desinfecção foi realizada por meio da técnica de contagem em profundidade, utilizando placas Petrifilm. O ensaio consistiu em depositar 1,0 mL do efluente no centro da placa Petrifilm e agitá-la para que o líquido se espalhasse. As placas foram incubadas por 24 h a 35 °C, e as colônias azuis com bolhas de gás foram então contadas.

3.4.1 Amostra de efluente industrial

O efluente industrial utilizado nesse trabalho foi proveniente de uma fábrica de artigos de cutelaria em aço inoxidável, localizada na região da Serra Gaúcha, que gera em seu processo produtivo efluentes que possuem elevado pH, metais e materiais insolúveis. No tratamento realizado pela empresa, esse efluente passa, primeiramente, por um tratamento físico-químico utilizando a coagulação, a floculação e a sedimentação, visando à remoção de poluentes inorgânicos, materiais insolúveis, metais e sólidos em suspensão e, em seguida, por um tanque biológico para remover a matéria orgânica dissolvida ou em suspensão. A Figura 16 mostra um fluxograma simplificado do atual sistema de tratamento de efluentes da empresa. A água resultante do tratamento é levada a um reservatório, onde é misturada com água da chuva, a fim de ser reutilizada no processo produtivo. Atualmente, cloro é adicionado à água do reservatório para eliminar os micro-organismos presentes. O efluente utilizado no presente trabalho foi retirado do sistema de tratamento antes de chegar a esse reservatório onde o cloro é adicionado.

Figura 16 – Fluxograma simplificado do sistema de tratamento de efluentes de uma indústria metalúrgica



Fonte: Adaptado de Lovatel (2014).

3.5 QUANTIFICAÇÃO DA PRATA LIXIVIADA PARA O EFLUENTE APÓS O ENSAIO DE DESINFECÇÃO

A prata lixiviada para o efluente durante os ensaios de desinfecção foi quantificada, para todas as amostras, por meio da técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), com limite de detecção de 0,0093 mg L⁻¹. O método utilizado foi o 3120B do *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater 23rd edition*.

3.6 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA COM AgNPs

3.6.1 Difração de raios X (DRX)

A difração de raios X é uma técnica espectroscópica muito utilizada para a avaliação das propriedades estruturais de compósitos à base de quitosana. Inicialmente, avaliou-se a quitosana comercial e posteriormente as microesferas de quitosana reticuladas com o objetivo de verificar uma possível diminuição da cristalinidade no material, após a reticulação e adição das AgNPs ao biopolímero.

Todas essas análises serão realizadas em um difratômetro de raios X SHIMADZU XRD-6000, localizado no Laboratório Central de Microscopia (LCMIC) da UCS, à temperatura de 25 °C e no modo reflexão (CuK α , $\lambda = 1,5405 \text{ \AA}$), em uma faixa de varredura de $1^\circ \leq 2\theta \leq 45^\circ$, com passo angular de $0,05^\circ$.

3.6.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier é considerada uma das técnicas espectroscópicas mais importantes para a caracterização de polímeros, pois permite a identificação de características estruturais do material, como grupos funcionais e ligações presentes na amostra.

A análise foi realizada em um espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum 400, no Laboratório de Polímeros (LPOL) da UCS, com um acessório de refletância total atenuada (ATR) horizontal, empregando um cristal de diamante. Os espectros foram registrados na faixa de 4000 a 400 cm⁻¹, com uma resolução nominal de 2 cm⁻¹ e 32 varreduras.

3.6.3 Termogravimetria (TGA)

A análise termogravimétrica é uma técnica utilizada para determinar a variação da massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo, e para isso utiliza-se uma programação controlada de temperatura a que a amostra é submetida. É possível, através dessa técnica, avaliar alterações que ocorrem no material, bem como determinar a faixa de temperatura em que o mesmo adquire composição química definida e constante. Além disso, pode-se acompanhar a desidratação e a decomposição do material, bem como outras reações.

As curvas termogravimétricas (TGA) foram registradas em um analisador Shimadzu TGA-50 no Laboratório de Polímeros (LPOL) da UCS. As análises foram realizadas sob atmosfera inerte de N_2 , com fluxo de 50 mL min^{-1} . Utilizou-se um porta-amostra de platina aquecido de 30 a $700 \text{ }^\circ\text{C}$, com uma taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.

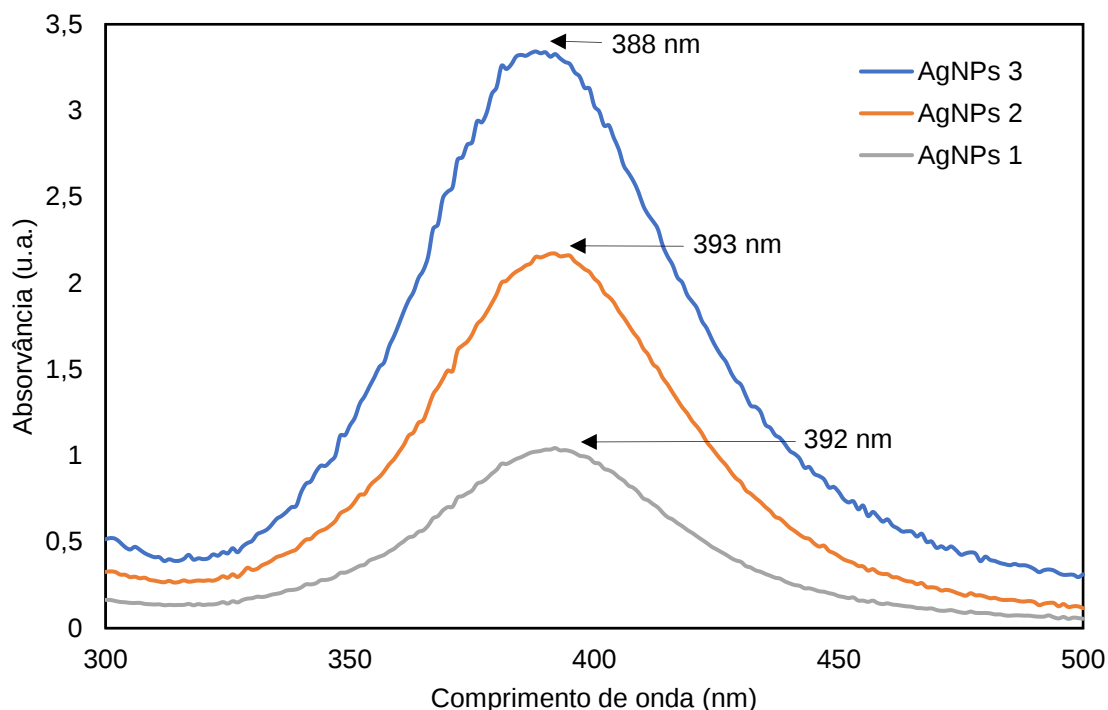
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS AGNPS

A realização de ensaios preliminares evidenciou a necessidade de se sintetizar AgNPs, a partir de soluções mais concentradas de AgNO_3 , visando à obtenção de microesferas de quitosana mais eficientes em relação ao efeito bactericida. Para tanto, optou-se por duplicar e quadruplicar a concentração do sal precursor de prata utilizada no método descrito por Eltz (2017), e avaliar o resultado obtido ao término das sínteses por meio da técnica de espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-Vis).

Na Figura 17 é possível observar as bandas características das AgNPs sintetizadas, utilizando-se concentrações iniciais de 0,25 (AgNPs 1), 0,5 (AgNPs 2) e 1,0 $\text{mmol Ag}^+ \text{L}^{-1}$ (AgNPs 3).

Figura 17 – Espectros de absorção na região do UV-Vis das soluções contendo AgNPs



AgNPs 1: 0,25 $\text{mmol Ag}^+ \text{L}^{-1}$, AgNPs 2: 0,50 $\text{mmol Ag}^+ \text{L}^{-1}$, AgNPs 3: 1,0 $\text{mmol Ag}^+ \text{L}^{-1}$.

Fonte: o autor (2019).

Os comprimentos de onda de máxima absorção (λ_{max}) para as AgNPs 1, 2 e 3 encontram-se, respectivamente, em 392, 393 e 388 nm. De acordo com Yin et al.

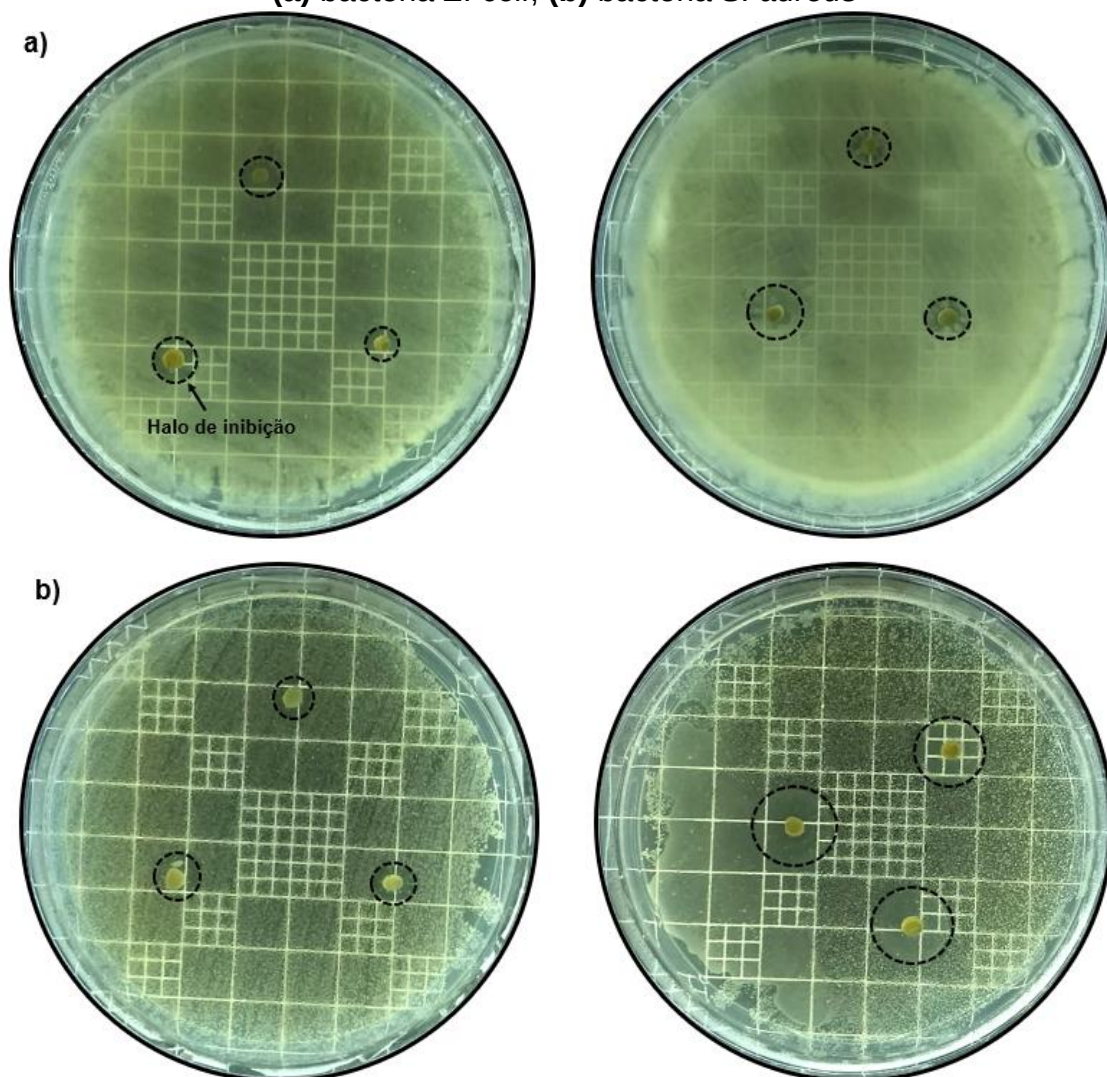
(2013), bandas por volta de 400 nm caracterizam a formação de AgNPs esféricas. O deslocamento do comprimento de onda da solução preparada com a maior concentração do sal precursor de prata, por sua vez, indica que as AgNPs esféricas possuem um diâmetro menor em relação as outras duas soluções preparadas (KUMAR et al, 2017). Além disso, uma banda única de absorção sugere uma alta simetria das partículas esféricas. Em relação à absorbância, as diferenças observadas têm uma correlação direta com as concentrações de AgNO_3 utilizadas na síntese das AgNPs, podendo ser evidenciada uma relação proporcional entre a concentração do sal precursor de prata utilizada e a intensidade do λ_{max} (SCHNEID, 2014).

Ao constatar a formação das AgNPs nas três soluções, àquela com o maior teor de sal de prata (AgNPs 3) foi selecionada para ser utilizada na preparação das microesferas durante o planejamento experimental, devido a ensaios preliminares que comprovaram uma maior atividade bactericida para maiores concentrações de prata na solução.

4.2 ATIVIDADE BACTERICIDA DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA E PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Onze amostras diferentes foram obtidas ao realizar o planejamento experimental, as quais foram analisadas através do teste de difusão em ágar com bactérias *E. coli* (Gram-negativa) e *S. aureus* (Gram-positiva). Os resultados foram positivos para todas as amostras, apesar da medida do halo de inibição variar de uma amostra para outra, comprovando o efeito bactericida das microesferas de quitosana. Na Figura 18 é possível observar o halo de inibição formado por algumas das amostras testadas, tanto para bactérias *E. coli* (Figura 18a) quanto para bactérias *S. aureus* (Figura 18b).

Figura 18 – Teste de difusão em ágar evidenciando os halos de inibição:
(a) bactéria *E. coli*; **(b)** bactéria *S. aureus*



Fonte: o autor (2019).

Para que o software *Statistica* forneça os resultados do planejamento experimental, é necessário informar, além das três variáveis utilizadas, uma variável resposta. Para tal, efetuou-se o cálculo da média de três halos de inibição obtido para cada bactéria, e depois a média entre o resultado obtido para as duas bactérias. A Tabela 3 apresenta o resultado do planejamento fatorial 2^3 , em termos da medida do halo de inibição encontrado para cada microesfera, além do desvio padrão para cada resultado. A microesfera de quitosana contendo AgNPs que apresentaram o melhor resultado no teste de difusão em ágar foram aquelas preparadas com ácido acético $0,75 \text{ mol L}^{-1}$, $60 \text{ }\mu\text{L}$ de glutaraldeído 25% (m/v) e 30% de solução de AgNPs no material (amostra 8).

Tabela 3 – Matriz resultante do planejamento fatorial 2³

Experimento	Concentração molar de ácido acético (mol/L)	Volume de glutaraldeído (μL)	Percentual de AgNPs no material (%)	Halo de inibição (mm)	Desvio padrão (mm)
1	0,25	30,0	10,0	9,48	1,53
2	0,75	30,0	10,0	10,52	0,61
3	0,25	60,0	10,0	6,88	0,88
4	0,75	60,0	10,0	10,95	1,83
5	0,25	30,0	30,0	7,48	0,95
6	0,75	30,0	30,0	8,38	0,58
7	0,25	60,0	30,0	7,97	0,94
8	0,75	60,0	30,0	12,59	2,31
9	0,50	45,0	20,0	10,17	1,69
10	0,50	45,0	20,0	9,09	0,07
11	0,50	45,0	20,0	10,74	2,21

Fonte: O autor (2019).

Para que um fator seja estatisticamente significativo sobre uma variável resposta, o seu valor de p deve ser inferior àquele determinado como intervalo de confiança. Nesse caso, o intervalo de confiança utilizado foi de 90%, o que corresponde a um p de 0,10. Na Tabela 4 estão destacados, em vermelho, os fatores com maior significância estatística no planejamento fatorial 2³ realizado, onde é possível visualizar que o fator com maior influência sobre a variável resposta foi a concentração molar de ácido acético, que apresentou um p igual a 0,026401.

Tabela 4 – Efeitos estimados do planejamento fatorial 2³

R²=0,91383; R²_{ajustado}=0,71276				
Parâmetro	Efeito	Erro	t(3)	P
Intercepto	9,477273	0,276982	34,21619	0,000055
Concentração molar ácido acético (mol/L) (1)*	2,657500	0,649581	4,09110	0,026401
Volume de glutaraldeído (μL) (2)	0,632500	0,649581	0,97371	0,402019
% AgNPs (3)	-0,352500	0,649581	-0,54266	0,625085
1 e 2*	1,687500	0,649581	2,59783	0,080527
1 e 3	0,102500	0,649581	0,15779	0,884642
2 e 3*	1,717500	0,649581	2,64401	0,077389
1, 2 e 3	0,172500	0,649581	0,26556	0,807784

*Fatores com maior significância estatística no planejamento fatorial 2³ realizado.

Fonte: o autor (2019).

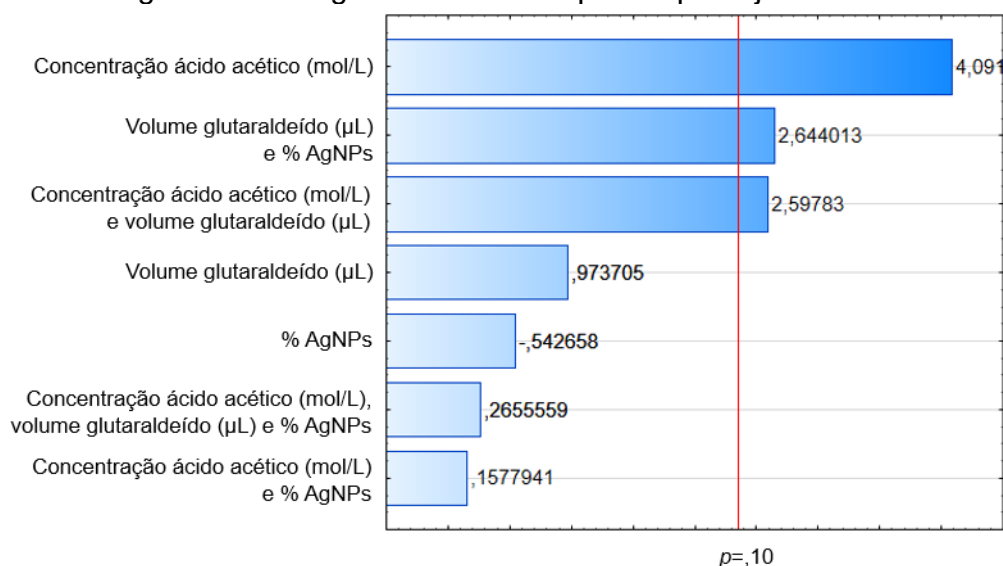
Pôde-se observar uma relação proporcional entre a concentração molar de ácido acético e o resultado obtido em termos da medida do halo de inibição nos testes

de difusão em ágar com as microesferas, ou seja, quanto maior a concentração do ácido, maior a atividade bactericida das microesferas. Por fim, a interação entre a concentração molar de ácido acético e o volume de glutaraldeído, e entre o volume de glutaraldeído e o percentual de solução de AgNPs utilizado na preparação das microesferas, também se mostraram estatisticamente significativas.

Através do coeficiente de determinação (R^2) é possível fazer uma avaliação da existência de uma relação entre a variável resposta e pelo menos uma das variáveis de um modelo de regressão linear. Quando R^2 é igual a 1, diz-se que existe uma correlação linear perfeita, e quando R^2 é igual a 0 ele é considerado completamente inexplicado (SPIEGEL, 2004). No presente planejamento de experimentos obteve-se um R^2 de 0,91383, o que permite inferir que 91,38% das variações que ocorreram na variável resposta podem ser explicadas pelos fatores analisados.

Além disso, há também o valor de R^2_{ajustado} que leva em consideração o número de variáveis medidas, e como elas interferem no sistema. Esse valor só aumenta quando essas variáveis melhoram a performance do modelo significativamente. O valor do R^2_{ajustado} (0,71276) ficou relativamente distante do de R^2 , o que significa que algumas variáveis analisadas não explicam satisfatoriamente o modelo.

A Figura 19 mostra o diagrama de Pareto, onde é possível analisar visualmente a influência dos fatores estudados na medida do halo de inibição encontrado. O mesmo é expresso em função dos valores de $t(3)$ também apresentados na Tabela 4, que correspondem ao teste t de Student, onde o software calcula a razão entre o efeito e o erro de cada fator, e o compara com o dos outros fatores. A linha transversal do gráfico, em vermelho, é o limite que divide as variáveis que são significativas ou não para um $p = 0,10$, correspondente a um intervalo de 90% de confiança. Os fatores estatisticamente significativos são aqueles que ultrapassam a linha vermelha, e estão dispostos na ordem crescente de significância estatística.

Figura 19 – Diagrama de Pareto para o planejamento fatorial 2^3 

Fonte: o autor (2019).

O resultado da análise de variância (ANOVA) encontra-se sumarizado na Tabela 5, onde a razão entre a média dos quadrados do modelo (regressão) e dos resíduos resulta no valor de F , que mostra se o modelo é ou não significativo como um todo. Para isso, o valor encontrado de F deve possuir magnitude maior que o valor tabelado para o planejamento experimental em questão. Uma vez que o valor de F encontrado foi de 12,52, e que o tabelado é $F_{6,4,0.10} = 4,01$ (Anexo A), pode-se concluir que o modelo tem significância estatística.

Tabela 5 – ANOVA para o planejamento fatorial 2^3

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F
Regressão	27,8953	6	4,6492	12,52
Resíduos	1,4851	4	0,371275	-
Total	29,3804	10	-	-

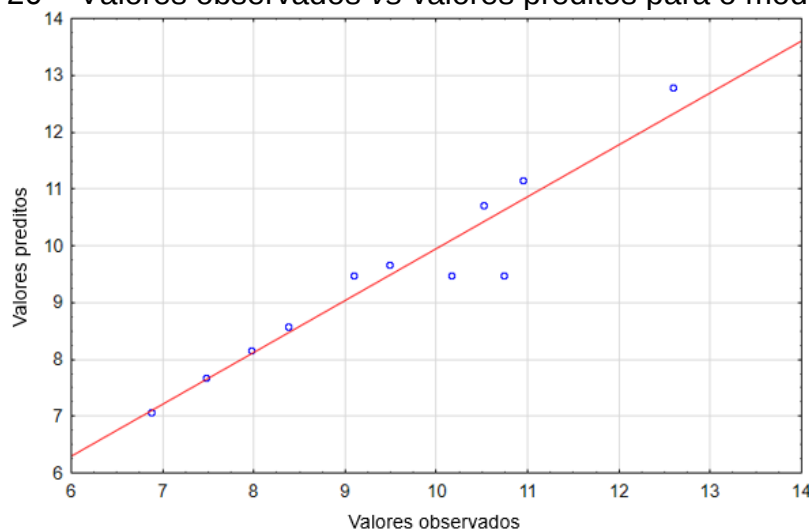
Fonte: o autor (2019).

A partir da definição dos fatores estatisticamente significativos, uma regressão considerando apenas esses parâmetros e o coeficiente linear da curva foi realizada, a fim de se obter o modelo representado pela Equação 3, baseando-se em valores não codificados dos fatores independentes, variando entre o ponto alto, central e baixo. As variáveis C , V e P representam, na equação, a concentração de ácido acético (mol L^{-1}), o volume de glutaraldeído (μL) e o percentual de solução de AgNPs no material, respectivamente.

$$\text{Halo (mm)} = 16,24 - 4,81 C - 0,2059 V - 0,2752 P + 0,2250 C V + 0,00572 V P \quad (3)$$

É possível fazer uma avaliação desse modelo através da Figura 20, onde estão dispostos os valores preditos e aqueles observados como variável resposta do planejamento de experimentos. Se esses dois valores fossem equivalentes, todos os pontos azuis estariam localizados sobre a reta vermelha. Apesar disso, é possível inferir que os resultados observados se aproximam dos valores preditos.

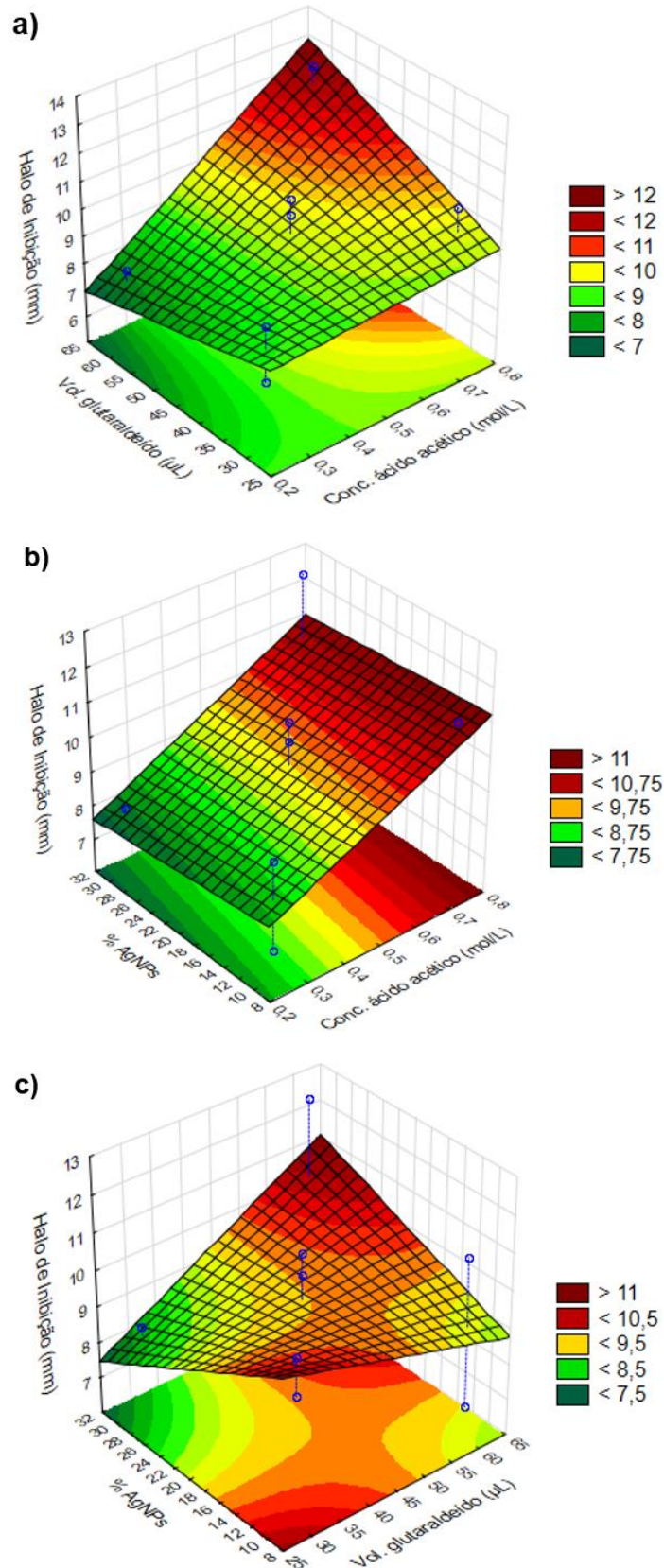
Figura 20 – Valores observados vs valores preditos para o modelo



Fonte: o autor (2019).

Os perfis de superfície de resposta para o DOE estão apresentados na Figura 21, onde é possível observar, em cada um deles, o comportamento de duas variáveis em relação à variável resposta. Nota-se tanto em **(a)** como em **(b)**, o que foi obtido como resultado para o planejamento de experimentos: que a concentração do ácido acético é o fator com maior significância estatística dentre os fatores analisados, implicando em maiores halos de inibição para maiores concentrações. Além disso, é possível também verificar que maiores volumes de glutaraldeído propiciam maiores halos de inibição, o que se deve à reticulação que confere uma maior porosidade e área superficial ao material, aumentando a adsorção das AgNPs e consequentemente a atividade bactericida (BEPPU; ARRUDA; SANTANA, 1999; VIEIRA, 2004). Em **(c)**, por sua vez, observa-se que o volume de glutaraldeído e o percentual de solução de AgNPs no material comportam-se de maneira proporcional, ou seja, os melhores resultados em termos do halo de inibição ocorrem ou quando utilizado o nível baixo, ou quando utilizado o nível alto para ambos.

Figura 21 – Perfil de superfície de resposta para o planejamento fatorial 2^3 para:
(a) concentração ácido acético (mol L^{-1}) vs volume glutaraldeído (μL);
(b) concentração ácido acético (mol L^{-1}) vs percentual de AgNPs na amostra (%); e
(c) volume glutaraldeído (μL) vs percentual de AgNPs na amostra (%)



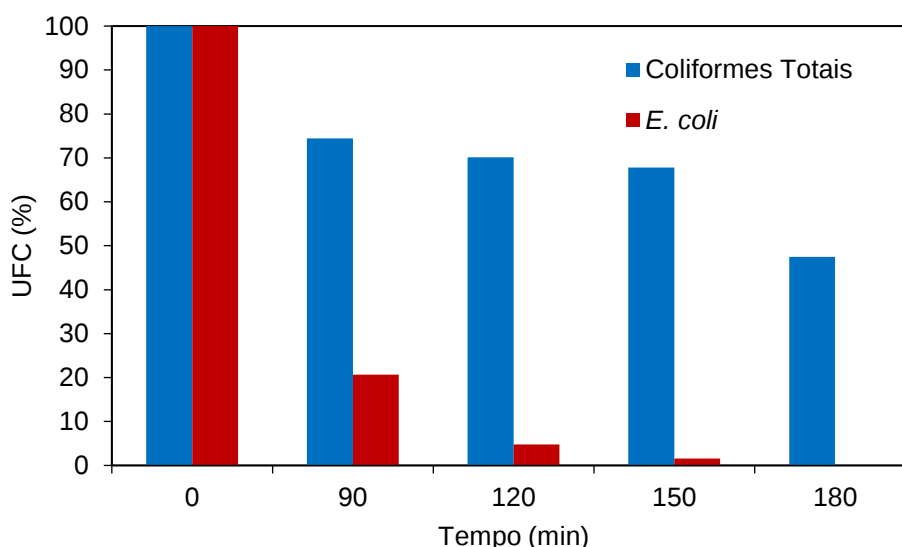
Fonte: o autor (2019).

4.3 DESINFECÇÃO DO EFLUENTE INDUSTRIAL

O efluente bruto (antes do tratamento com as microesferas de quitosana contendo AgNPs) apresentou uma contaminação por *E. coli* e coliformes totais de cerca de 63 e 556 UFC min⁻¹, respectivamente. O ensaio foi realizado com as microesferas que apresentaram maior atividade bactericida no planejamento experimental, ou seja, aquelas preparadas com ácido acético 0,75 mol L⁻¹, 60,0 µL de glutaraldeído e 30% de solução de AgNPs no material.

Ensaio preliminares comprovaram a inexistência de alterações significativas no número de bactérias até 60 min de ensaio, e por esse motivo um novo experimento foi realizado com o objetivo de analisar o comportamento do material em um tempo de contato maior, de até 180 min, o que pode ser verificado na Figura 22.

Figura 22 – Remoção de bactérias *E. coli* e coliformes totais em função do tempo de tratamento do efluente industrial



Fonte: o autor (2019).

A partir dos 90 min de tratamento, é possível observar que o número de unidades formadoras de colônia por mililitro começou a reduzir, e que em 180 min o tratamento inativou completamente as bactérias *E. coli* do efluente, comprovando a atividade bactericida das microesferas. Em termos de coliformes totais, ao término do ensaio, o efluente apresentou uma contaminação de 264 UFC min⁻¹, sendo a sua remoção de aproximadamente 47%. Esse resultado pode ter sido observado porque a concentração inicial de bactérias *E. coli* no efluente é mais baixa do que a

concentração inicial de coliformes totais, ou então pelo fato de que provavelmente outras bactérias apresentem maior resistência às AgNPs do que as bactérias *E. coli*, já que bactérias diferentes requerem inativações diferentes.

Ao sintetizar *pellets* de quitosana contendo AgNPs, e submetê-los a um ensaio de desinfecção semelhante ao deste trabalho, Raota (2018) também evidenciou um resultado positivo, no qual foram removidas cerca de 50% das bactérias *E. coli* presentes no efluente em 120 min de tratamento. Sanpui et al (2008), por sua vez, inativou bactérias *E. coli* presentes em um outro efluente em cerca de 4 h, utilizando também um material composto de quitosana e AgNPs.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DA PRATA LIXIVIADA PARA O EFLUENTE APÓS O ENSAIO DE DESINFECÇÃO

As análises de quantificação de prata lixiviada para o efluente, durante os ensaios de desinfecção em função do tempo, resultaram em uma quantidade menor do que a do limite de detecção do método. Isso significa que a prata lixiviada para o meio foi menor que $0,0093 \text{ mg L}^{-1}$ para todas as amostras.

A quantidade de prata encontrada ao final dos ensaios, portanto, é inferior à quantidade máxima permitida pelo Conselho Estadual do Meio Ambiente na Resolução CONSEMA nº 128 (BRASIL, 2006), a nível estadual, e também pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente na Resolução nº 430 (BRASIL, 2011), a nível nacional, que é de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de prata para efluentes líquidos de fontes poluidoras.

Esse resultado indica que as microesferas de quitosana contendo AgNPs não oferecem riscos à saúde humana e impactos ambientais referentes à lixiviação da prata para o efluente após o ensaio de desinfecção.

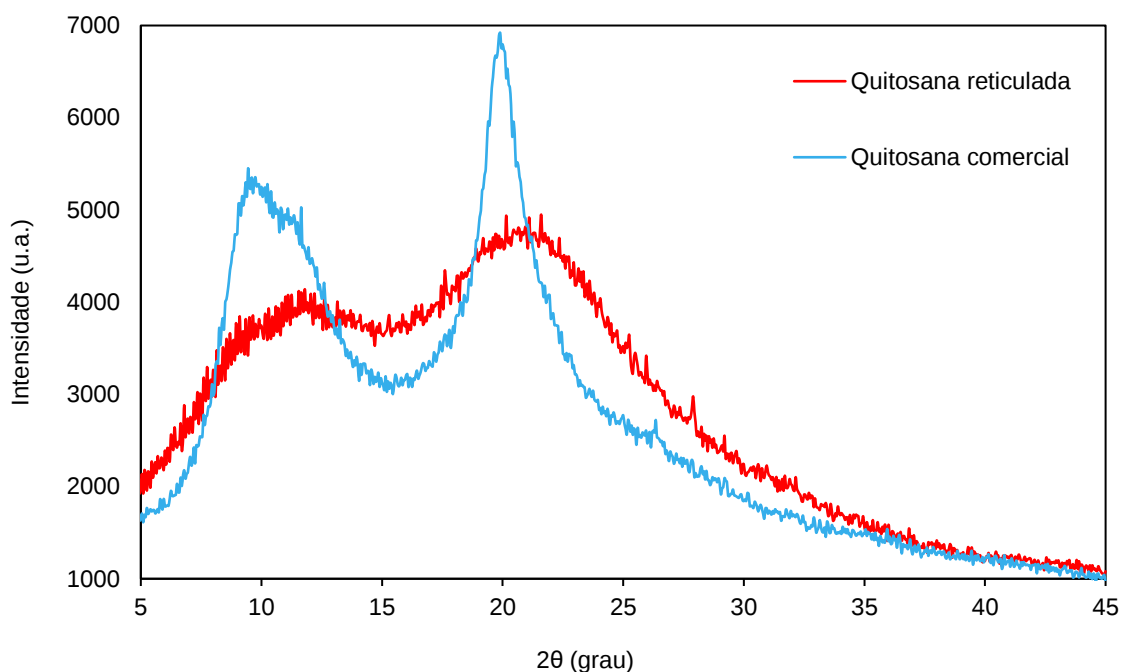
4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA COM AGNPS

As análises químicas foram realizadas para as microesferas de quitosana contendo AgNPs que apresentaram maior atividade bactericida no planejamento experimental, ou seja, as mesmas utilizadas no ensaio de desinfecção do efluente industrial, preparadas com ácido acético $0,75 \text{ mol L}^{-1}$, $60,0 \text{ }\mu\text{L}$ de glutaraldeído e 30% de solução de AgNPs no material.

4.5.1 Difração de raios X (DRX)

A técnica de difração de raios X foi utilizada com o objetivo de avaliar a influência do glutaraldeído na reação de reticulação com a quitosana. Os difratogramas obtidos para a quitosana comercial e reticulada podem ser observados na Figura 23.

Figura 23 – Difratogramas de raios X para a quitosana comercial e reticulada



Fonte: o autor (2019).

De acordo com Ding et al (2015) e Silva et al (2015) a estrutura da quitosana comercial é semicristalina, com picos acentuados em $2\theta \approx 10^\circ$ e 20° .

A reação de reticulação promove a formação de uma rede tridimensional na estrutura da quitosana e quanto maior for a extensão dessa reação, mais amorfo será o material final (CRINI, 2005). No difratograma da quitosana reticulada é possível notar um pequeno deslocamento dos picos, em relação ao da comercial, além de uma diminuição significativa na intensidade dos mesmos, resultado de uma diminuição da cristalinidade do material. Isso ocorre porque a reação de reticulação quebra as interações de hidrogênio intra e intermoleculares formadas entre os grupamentos amino, hidroxila, amida e outros grupos funcionais presentes na estrutura da quitosana (CHO et al, 2012; SILVA et al, 2015).

Os picos de difração característicos da prata em $2\theta \approx 38,1^\circ$ e $44,2^\circ$, por sua vez, não foram observados no difratograma de raios X das microesferas reticuladas contendo AgNPs, o que se deve provavelmente à baixa concentração de prata no material (ZHAO et al, 2014).

4.5.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

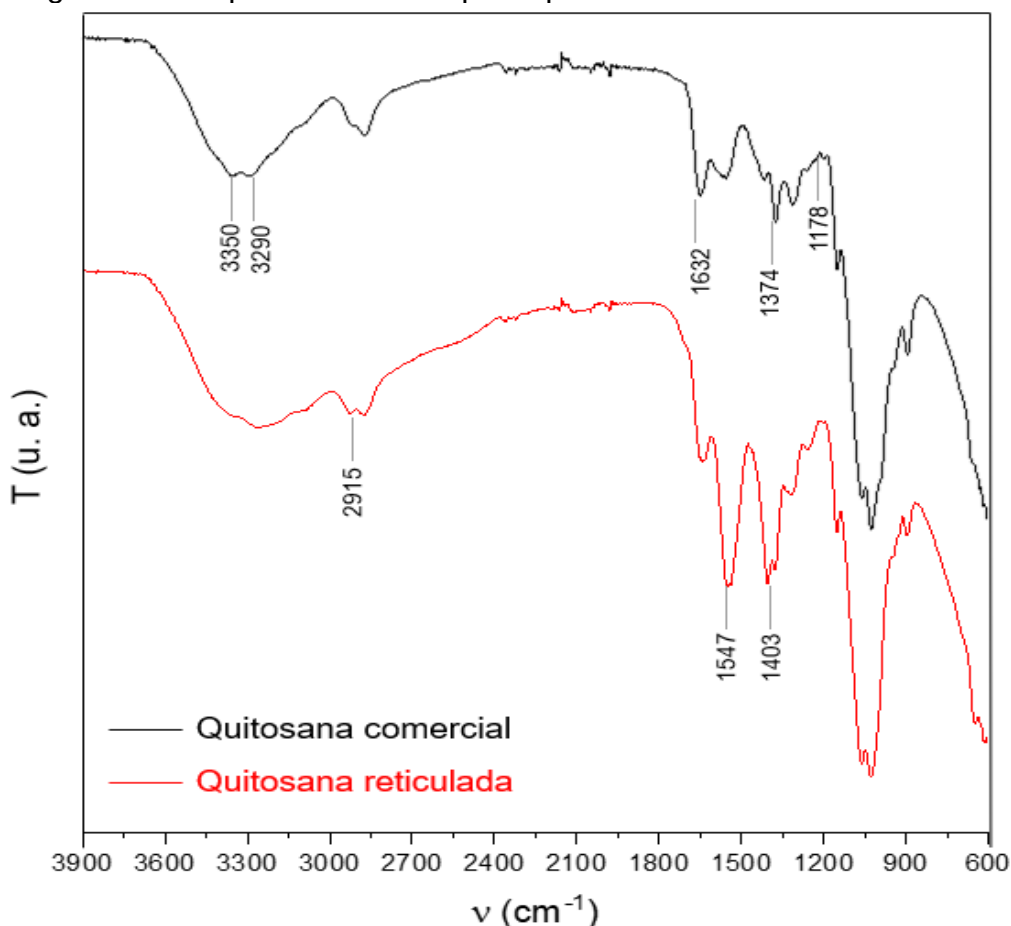
O espectro de absorção na região do infravermelho de uma substância fornece informações sobre os grupos funcionais presentes em sua estrutura, e pode ser utilizado para investigar um composto ou sua composição química. A região do infravermelho de maior interesse para esta técnica está situada no intervalo de número de onda de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$.

No espectro da quitosana comercial, grupos característicos podem ser visualizados através das absorções mais significativas (Figura 24). As bandas de absorção entre 3350 e 3290 cm^{-1} , por exemplo, referem-se ao estiramento NH de grupos $-\text{NH}_2$ e de grupos $-\text{OH}$, enquanto em 2915 cm^{-1} verifica-se o estiramento CH do grupo $-\text{CH}_2$. Já as bandas situadas em 1652 e 1557 cm^{-1} referem-se ao estiramento C=O de amida secundária e à deformação angular simétrica NH do grupo NH_2 , respectivamente, enquanto a banda em 1374 cm^{-1} é atribuída à vibração C-H do grupo CH_3 , e aquela em 1027 cm^{-1} indica o estiramento C-O de álcool primário (TOALDO, 2015; SILVA, 2017).

Algumas evidências das mudanças ocorridas na quitosana reticulada podem ser observadas no espectro também apresentado na Figura 24. A diminuição da intensidade das bandas de absorção entre 3350 e 3290 cm^{-1} , por exemplo, indica que o processo de reticulação ocorreu por meio dos grupos $-\text{NH}_2$ e $-\text{OH}$. Além disso, entre $1200\text{-}1150 \text{ cm}^{-1}$ há a diminuição ou desaparecimento de uma banda, característica de grupos amino, em resposta ao bloqueio por glutaraldeído, que acaba formando ligações $\text{N}=\text{C}$, comprovando a reticulação. Também pode-se observar uma pequena diminuição da intensidade da banda em 1632 cm^{-1} , referente à deformação C=O de amidas secundárias, um grande aumento na banda em 1547 cm^{-1} , referente à deformação angular simétrica NH do grupo NH_2 , e o aparecimento de uma nova banda em torno de 1403 cm^{-1} atribuída a deformação de N-H de amina primária (TOALDO, 2015; FARIA, 2017). No entanto, não há evidências da banda característica à

reticulação relacionada ao grupo aldeídico livre próximo a 1720 cm^{-1} , o que é corroborado pelos resultados obtidos por Oyrton et al (1999) e Oliveira (2005).

Figura 24 – Espectro de FT-IR para quitosana comercial e reticulada



Fonte: o autor (2019).

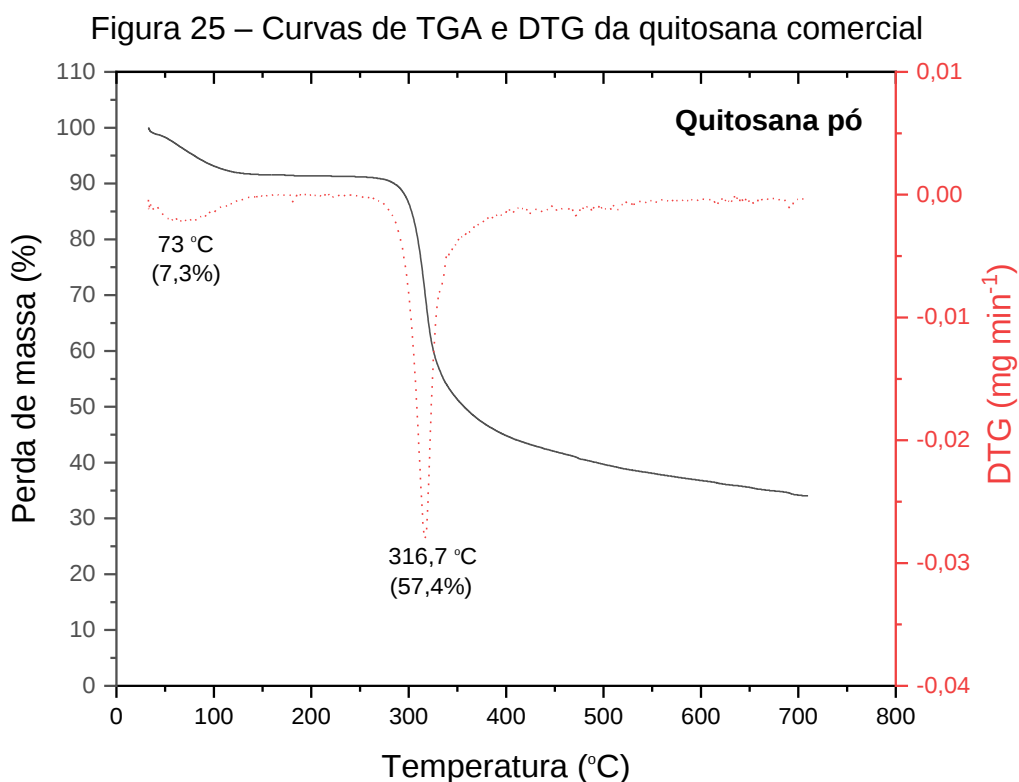
4.5.3 Termogravimetria (TGA)

A estabilidade térmica da quitosana comercial e reticulada foi avaliada por meio da análise termogravimétrica (TGA), sendo que as derivadas das curvas termogravimétricas (DTG) foram igualmente apresentadas para melhor interpretação dos resultados.

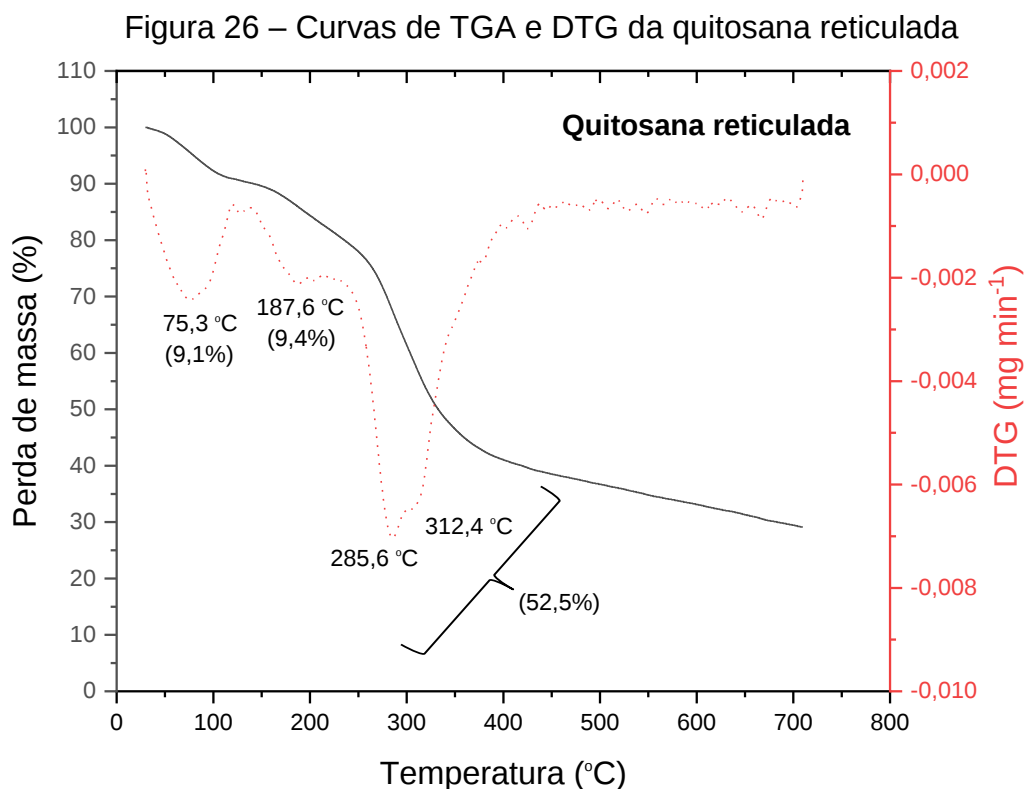
Analizando os termogramas da quitosana comercial (Figura 25) e da quitosana reticulada (Figura 26), observa-se que o primeiro evento que ocorre em ambos materiais se deve à perda de água adsorvida. A quitosana apresenta, ao longo de sua cadeia macromolecular, grupos amino e hidroxila que permitem interações com a água por meio de ligações de hidrogênio, o que torna o material fortemente hidrofílico

(DANTAS et al, 2016). A quitosana comercial apresentou uma perda de massa de 7,3% em 73 °C, enquanto a quitosana reticulada teve uma redução de 18,50% da sua massa entre 75,3 °C e 187,6 °C.

O segundo evento térmico observado para a quitosana comercial ocorreu em 316,7 °C, com uma perda de massa de 57,4%. Já para a quitosana reticulada, esse evento ocorreu em duas etapas, nas temperaturas de 285,6 °C e 312,4 °C, com uma perda de massa total de 52,5%. Essa perda está relacionada à degradação do material, onde ocorre a quebra aleatória da cadeia polimérica, resultando em desidratação dos anéis sacarídeos e desaminação (DANTAS et al, 2016).



Fonte: o autor (2019).



Fonte: o autor (2019).

Teoricamente, a quitosana reticulada deveria apresentar uma maior resistência térmica do que a comercial. No entanto, segundo Silva (2017), que também observou uma temperatura de degradação inferior no material reticulado do que na quitosana pura, a diminuição da estabilidade térmica da quitosana reticulada pode ser atribuída aos novos grupos funcionais introduzidos à estrutura, indicando uma possível interação entre as fases que desestabiliza a quitosana. Ainda nesse âmbito, Torres (2006) aponta que ao reter menos água, e com isso volatilizar mais facilmente na primeira etapa, o material reticulado apresenta um comportamento que sugere que os grupos amino estão ligados aos grupos aldeídicos, resultando em uma queda na resistência térmica. Essa hipótese vai ao encontro do que foi observado no espectro de FT-IR da quitosana reticulada, onde a banda característica em 1720 cm^{-1} não é formada, confirmando que não há grupos aldeídicos livres na estrutura.

5 CONCLUSÃO

No presente trabalho foram produzidas microesferas de quitosana contendo AgNPs, reticuladas com glutaraldeído. Tais materiais foram utilizados no tratamento terciário de um efluente industrial.

A escolha das AgNPs para a preparação das microesferas de quitosana, em função da variação da concentração de sal precursor de prata, foi realizada com base em testes preliminares de difusão em ágar nutritivo que comprovaram uma maior atividade bactericida para as AgNPs de maior concentração, apesar de todas terem apresentado a banda de absorção característica por volta de 400 nm, indicando a formação de AgNPs.

Através de um planejamento experimental do tipo 2³ constatou-se que a concentração de ácido acético utilizado na preparação das microesferas, a interação entre a concentração de ácido acético e o volume de glutaraldeído, e entre o volume de glutaraldeído e o percentual de solução de AgNPs utilizado na preparação das microesferas se mostraram estatisticamente significativos sobre a medida do halo de inibição, sendo a primeira delas a de maior relevância. Todas as microesferas obtidas com o planejamento experimental apresentaram atividade bactericida quando submetidas ao teste de difusão em ágar nutritivo, entretanto as microesferas que apresentaram os melhores resultados em termos do halo de inibição, dentre as testadas, foram aquelas preparadas com ácido acético 0,75 mol L⁻¹, 60 µL de glutaraldeído 25% (m/v) e 30% de solução de AgNPs no material.

Os ensaios de desinfecção evidenciaram que a partir de 90 min os micro-organismos presentes no efluente começaram a ser eliminados, e que em 180 min de tratamento houve uma redução de aproximadamente 47% em relação a coliformes totais e 100% de remoção de bactérias *E. coli*.

As análises de ICP-OES indicaram que a quantidade de prata lixiviada em todos os ensaios com o efluente foi menor que 0,0093 mg L⁻¹, ou seja, abaixo de 0,1 mg L⁻¹, limite máximo de prata permitido pelas legislações estaduais e nacionais para o lançamento de efluentes.

As análises de difração de raios X, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e termogravimetria, evidenciaram que a reticulação de fato ocorreu, e que o material apresenta menor cristalinidade e menor resistência térmica após a reação.

Por fim, pode-se concluir que as microesferas de quitosana com AgNPs possuem atividade bactericida, e, portanto, são eficientes no tratamento terciário de efluentes industriais, além de não apresentarem riscos ambientais e à saúde humana devido à baixa contaminação do meio após o tratamento.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Utilizar a técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET) para visualizar o formato e tamanho das AgNPs obtidas.

Verificar a influência de outros fatores sobre o mesmo sistema, tais como tempo de contato das microesferas com a solução de NaOH e a quantidade de quitosana na solução, com o objetivo de entender melhor os fatores que influenciam diretamente na atividade bactericida do material, além dos que foram observados no presente trabalho.

Testar intervalos de tempo maiores nos ensaios de desinfecção do efluente, a fim de obter melhores resultados em termos de remoção de coliformes totais.

Submeter as microesferas que foram utilizadas no tratamento do efluente em um segundo ciclo, buscando analisar a possível reutilização desse material após um primeiro ciclo de desinfecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. **Panorama das águas**: água no mundo. Disponível em: <<http://www3.ana.gov.br/portal/ANA/panorama-das-aguas/agua-no-mundo>>. Acesso em: 24/08/2018.

AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 2, n. 33, p. 27-34, dez. 2007.

BARREIRO-IGLESIAS, R.; CORONILLA, R.; ALVAREZ-LORENZO, C. Preparation of chitosan beads by simultaneous cross-linking/insolubilisation in basic pH Rheological optimisation and drug loading/release behaviour. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, p. 77-84, 2005.

BEPPU, Marisa M.; ARRUDA, Eduardo; SANTANA, Cesar C. Síntese e Caracterização de Estruturas Densas e Porosas de Quitosana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p. 163-169, 1999.

BIAO, Linhai. Synthesis, characterization and antibacterial study on the chitosan-functionalized Ag nanoparticles. **Materials Science & Engineering C**, v. 76, p. 73-80, 2017.

BORJES, Isabel Cristina Porto; GOMES, Taís Ferraz; ENGELMANN, Wilson. **Responsabilidade civil e nanotecnologias**. 1 ed. São Paulo: Atlas, 2014. 157 p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente - Conselho Nacional do Meio Ambiente, **Resolução nº 128, de 2006**. Dispõe sobre a fixação de Padrões de Emissão de Efluentes Líquidos para fontes de emissão que lancem seus efluentes em águas superficiais no Estado do Rio Grande do Sul. Diário Oficial da União, 2006.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente - Conselho Nacional do Meio Ambiente, **Resolução nº 430, de 2011**. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Diário Oficial da União, 16 maio 2011.

BROOKS, Geo. F. et al. **Microbiologia Média de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 26 ed. Porto Alegre: AMGH, 2014. 822 p.

CHERNOUSOVA, Svitlana; EPPLÉ, Matthias. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. **Angewandte Reviews**, v. 52, p. 1636-1653, 2013.

CHO, Dong-Wan et al. A novel chitosan/clay/magnetite composite for adsorption of Cu(II) and As(V). **Chemical Engineering Journal**, v. 200-202, p. 654-662, 2012.

COSTA; Rodrigo Guerreiro Fontoura. **Preparação e caracterização de nanocompósitos à base de poli (álcool vinílico) carregados com nanopartículas de propriedades bactericidas via eletrofiação**. 2011. 117 f. Tese (Doutorado) –

Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, 2011.

CRAVEIRO, Afrânio Aragão; CRAVEIRO, Alexandre Cabral; QUEIROZ, Danilo Caldas de. **Quitosana: a fibra do futuro**. 1 ed. Fortaleza: PADETEC, 1999. 124 p.

CRINI, Grégorio. Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. **Progress in Polymer Science**, Besançon, v. 30, p. 38-70, 2005.

CRINI, Grégorio; BADOT, Pierre-Marie. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. **Progress in Polymer Science**, Besançon, v. 33, p. 399-447, nov. 2007.

DALLAS, Panagiotis; SHARMA, Virender K.; ZBORIL, Radek. Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: classification synthetic paths, applications, and perspectives. **Advances in Colloid and Interface Science**, v 166, p. 119-135, 2011.

DANIEL, L. A. et al. **Processos de desinfecção e desinfetantes alternativos na produção de água potável**. 1 ed. São Carlos: RiMa, 2001. 153 p.

DANTAS, M. J. L. et al. Obtenção e caracterização de esferas de quitosana/hidroxiapatita gerada *in situ*. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 11, p. 18-24, 2016.

DEZOTTI, Márcia. **Processos e técnicas para o controle ambiental de efluentes líquidos**. 1. ed. Rio de Janeiro: E-papers, 2008. 360p.

DI BERNARDO, Luiz; DANTAS, Angela Di Bernardo. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. 2. ed. São Carlos, SP: RiMa, 2005. 2 v.

DING, Y et al. Design and construction of polymerized-chitosan coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles and its application for hydrophobic drug delivery. **Materials Science and Engineering C**, v. 48, p. 487-498, 2015.

EL-LIETHY, Mohamed Azab; ELWAKEEL, Khalid Z.; AHMED, Mohammed S. Comparison study of Ag(I) and Au(III) loaded on magnetic thiourea-formaldehyde as disinfectants for pathogenic microorganism's deactivation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, p. 4380-4390, 2018.

ELTZ, Fabiana Zarpelon. **Filmes de PAH/PAA com Nanopartículas Metálicas para a Desinfecção de Efluentes Industriais**. 2017. 101 f. Tese (Doutorado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, 2017.

FARIA, Carol Christina de. **Estudo comparativo de adsorção de íons metálicos em meio aquoso por membranas de quitosana reticuladas**. 2017. 148 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Ciência e Tecnologia, 2017.

FIESP. **Manual de conservação e reuso de água para a indústria**. FIESP; v. 1, 2005.

FIRJAN. **Manual de conservação e reuso de água na indústria**. FIRJAN; v. 1, 2005.

FILHO, Adão Silva. **Tratamento terciário de efluente de uma indústria de refrigerantes visando ao reuso – um estudo de caso**. 2009. 100 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2009.

GONÇALVES, Ricardo Franci. **Desinfecção de Efluentes Sanitários**. 1 ed. Rio de Janeiro: ABES, RiMa, 2003. 438 p.

GONSALVES, Arlan de Assis et al. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, p. 1215-1223, 2011.

GONZÁLEZ-CAMPOS, J. Betzabe et al. Compuestos de quitosano/nanopartículas de Ag: conductividad y mecanismos de relajación y su relación con sus propiedades macroscópicas. **Superficies y Vacío**, v. 25, p. 43-48, 2012.

IBRAHIN, Francini Imene Dias; IBRAHIN, Fábio José; CANTUÁRIA, Eliane Ramos. **Análise ambiental: gerenciamento de resíduos e tratamento de efluentes**. 1. ed. São Paulo: Érica, 2015.

JOSÉ, Nadia Mamede; PRADO, Luís Antônio Sanchez de Almeida. Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: preparação e algumas aplicações. **Quim. Nova**, v. 28, p. 281-288, 2005.

KACZMAREK, Halina; ZAWADZKI, Jerzy. Chitosan pyrolysis and adsorption properties of chitosan and its carbonizate. **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 941-947, 2010.

KUMAR, Vijay et al. Photoinduced green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Physalis angulata* and its antibacterial and antioxidante activity. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, p. 744-756, 2017.

LAPOLLI, Flávio Rubens et al. Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização. In: GONÇALVES, Ricardo Franci. **Desinfecção de efluentes sanitários**. São Carlos: RiMa, 2003. Cap nº 4, p.169-208.

LAPOLLI, Flávio Rubens et al. Desinfecção de efluentes sanitários através de dióxido de cloro. **Eng. sanit. ambient.**, v. 10, p. 200-208, 2005.

LOVATEL, Rosa Helena. **Preparação, caracterização e aplicação de híbridos de montomorilonita-alginato-nanopratas na desinfecção de efluentes industriais para águas de reuso**. 2014. 61 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, 2014.

MANCUSO, Pedro Caetano Sanches; SANTOS, Hilton Felício. **Reuso de água**. 1. ed. Barueri, SP: Manole, 2003. 579 p. (Coleção ambiental).

MATSUMURA, E. M.; MIERZWA, J. C. Water conservation and reuse in poultry processing plant - A case study. **Resources, Conservation and Recycling**, São Paulo, v. 52, p. 835-842, mar. 2008.

METCALF; EDDY. **Tratamento de efluentes e recuperação de recursos**. 5 ed. Porto Alegre: AMGH, 2016. 1980 p.

MEYER, Sheila T. O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. **Cad. Saúde Públ.**, v.10, p. 99-110, 1994.

MIGNEAULT, Isabelle et al. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v. 37, p. 790-802, 2004.

MONTGOMERY, Douglas C.; CUSTER, Lisa; MCCARVILLE, Daniel R. **Design and analysis of experiments**. 8.ed. Hoboken: Wiley, 2013. 260 p.

MORONES, Jose Ruben et al. The bactericidal effect of silves nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, p. 2346-2353, 2005.

NAVARRO-ORTEGA, A. et al. Managing the effects of multiple stressors on aquatic ecosystems under Water scarcity: The GLOBAQUA project. **Science of the Total Environment**, v. 503, p. 3-9, 2015.

NEVES, Mariana Silva Lopes. **Potencial antibacteriano de nanopartículas de prata associadas ou não a quitosana e às drogas antimicrobianas**. 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2013.

NETO, Elias Antonio Berni. **Desenvolvimento de nanobiocompósitos contendo nanopartículas de prata para aplicações bactericidas**. 2010. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Pós-Graduação em Física, 2010.

OLIC, N. B. Recursos hídricos das regiões brasileiras: aspectos, usos e conflito. **Revista Pangea: quinzenário de política, economia e cultura**, 2003. Disponível em:<http://www.clubemundo.com.br/pages/revistapangea/show_news.asp?n=188&ed=4> Acesso em: 25/08/2018.

OLIVEIRA, Bergson Fogaça de. **Preparação de microesferas de quitosana por spray drying com diferentes tipos de reticulação para uso na vacinação gênica**. 2005. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, 2005.

OYRTON, A. C. et al. Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, p. 119-128, 1999.

PEREIRA, Anna Karla dos Santos. **Síntese de nanopartículas de prata suportadas em microesferas e filmes de quitosana: estudo da atividade antibacteriana e aplicação na liberação controlada de ibuprofeno**. 2017. 76 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2017.

RAI, Mahendra; YADAV, Alka; GADE, Aniket. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 76-83, 2008.

RAOTA, Camila Suliani. **Síntese verde de nanopartículas de prata a partir do extrato do bagaço de *Vitis labrusca* (CULTIVAR Ives), caracterização e aplicação na desinfecção de efluentes industriais**. 2018. 108 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Materiais, 2018.

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

SALAZAR, Max Jorge Carlos. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana-gelatina e quitosana-colágeno visando a liberação de fármacos**. 2015. 114 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, 2015.

SALLES, Carlos Afonso. **Desinfecção eletrolítica de efluente sanitário em fluxo contínuo**. 2008. 130 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais, 2008.

SALVATIERRA, Clabijo Mérida. **Microbiologia** – Aspectos morfológicos, bioquímicos e metodológicos. 1 ed. São Paulo: Érica, 2014. 120 p.

SANPUI, Pallab et al. The antibacterial properties of a novel chitosan–Ag-nanoparticle composite. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 142-146, 2008.

SANTOS, Tássia Rhuna Tonial et al. Estudo da formação de trihalometanos no processo de coagulação/floculação/adsorção em carvão ativado vegetal com o coagulante natural *Moringa oleífera* Lam para o tratamento de água de abastecimento. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, v. 5, p. 64-72, 2013.

SCHNEID, Andressa da Cruz. **Síntese e aplicações de nanopartículas de prata estabilizadas por silsesquioxano iônico contendo o grupo catiônico 1,4-diazoniabicyclo[2,2,2]octano**. 2014. 74 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Química, 2014.

SCHOMAKER, Miriam; KEATING, Michael; CHENJE, Munyaradzi. **Global environmental outlook 4: Environment for development**. United Nations Environment Programme. 2007. 540 p.

SILVA, Andréa Claudia Oliveira. **Estudo de adsorção do corante reativo laranja 16 com quitosana e seus derivados**. 2017. 163 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Alagoas – Doutorado em Química e Biotecnologia, 2017.

SILVA, A. S. **Avaliação da secagem do bagaço de cajá usando planejamento fatorial composto central**. 2008. 83 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologias Regionais) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

SILVA, Livia Cristina da; ORSINE, Joice Vinhal Costa. Reutilização de água como ferramenta de sistemas de gestão ambiental agroindustriais e domésticos. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 7, p. 1280-1293, nov. 2011.

SILVA, M. C. et al. Esferas de quitosana/curcumina pelo método de gelificação ionotrópica: influência da incorporação do fármaco. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 10, p. 21-28, 2015.

SPIEGEL, M. **Probabilidade Estatística**. São Paulo: McGraw-Hill, 2004.

TOALDO, Luciane Torezan. **Microesferas magnéticas de quitosana para remoção do corante violeta de metila 2B em meio aquoso**. 2015. 71 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, 2015.

TORRES, Marco Antonio. **Produção e caracterização de microesferas de quitosana natural e modificada quimicamente e o seu uso na adsorção das proteínas BSA e lisozima**. 2006. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, 2006.

TOSETTO, Mariana de Salles. **Tratamento terciário de esgoto sanitário para fins de reúso urbano**. 2005. 228 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Pós-graduação da Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, 2005.

VAKILI, Mohammadtaghi et al. Application of chitosan and its derivatives as adsorbents for dye removal from water and wastewater: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 115-130, 2014.

VARGAS, Gean Delise Leal Pasquali. **Tratamento terciário de esgoto sanitário através de processos oxidativos avançados para a obtenção de águas de reúso**. 2008. 264 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2008.

VIEIRA, Rodrigo Silveira. **Remoção e recuperação de íons Hg(II) utilizando quitosana natural e reticulada**. 2004. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, 2004.

WEI, D. et al. Effects of cooling treatment and glutaraldehyde on the morphology of Au nanostructures synthesized from chitosan, **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 512-520, 2008.

YIN, Jun et al. Attachment of silver nanoparticles (AgNPs) onto thin-film composite (TFC) membranes through covalent bonding to reduce membrane biofouling.

Journal of Membrane Science, v. 441, p. 73-82, 2013.

ZHANG, Yongqin et al. Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction.

Carbohydrate Research, v. 340, p. 1914-1917, 2005.

ZHAO, Xihui et al. Microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles using sodium alginate and their antibacterial activity.

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 444, p. 180-188, 2014.

ANEXO A

IV Percentage Points of the F Distribution (*Continued*)

$$F_{0.10, \nu_1, \nu_2}$$

$\nu_2 \backslash \nu_1$	Degrees of Freedom for the Numerator (ν_1)																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞
1	39.86	49.50	53.59	55.83	57.24	58.20	58.91	59.44	59.86	60.19	60.71	61.22	61.74	62.00	62.26	62.53	62.79	63.06	63.33
2	8.53	9.00	9.16	9.24	9.29	9.33	9.35	9.37	9.38	9.39	9.41	9.42	9.44	9.45	9.46	9.47	9.47	9.48	9.49
3	5.54	5.46	5.39	5.34	5.31	5.28	5.27	5.25	5.24	5.23	5.22	5.20	5.18	5.18	5.17	5.16	5.15	5.14	5.13
4	4.54	4.32	4.19	4.11	4.05	4.01	3.98	3.95	3.94	3.92	3.90	3.87	3.84	3.83	3.82	3.80	3.79	3.78	3.76
5	4.06	3.78	3.62	3.52	3.45	3.40	3.37	3.34	3.32	3.30	3.27	3.24	3.21	3.19	3.17	3.16	3.14	3.12	3.10
6	3.78	3.46	3.29	3.18	3.11	3.05	3.01	2.98	2.96	2.94	2.90	2.87	2.84	2.82	2.80	2.78	2.76	2.74	2.72
7	3.59	3.26	3.07	2.96	2.88	2.83	2.78	2.75	2.72	2.70	2.67	2.63	2.59	2.58	2.56	2.54	2.51	2.49	2.47
8	3.46	3.11	2.92	2.81	2.73	2.67	2.62	2.59	2.56	2.54	2.50	2.46	2.42	2.40	2.38	2.36	2.34	2.32	2.29
9	3.36	3.01	2.81	2.69	2.61	2.55	2.51	2.47	2.44	2.42	2.38	2.34	2.30	2.28	2.25	2.23	2.21	2.18	2.16
10	3.29	2.92	2.73	2.61	2.52	2.46	2.41	2.38	2.35	2.32	2.28	2.24	2.20	2.18	2.16	2.13	2.11	2.08	2.06
11	3.23	2.86	2.66	2.54	2.45	2.39	2.34	2.30	2.27	2.25	2.21	2.17	2.12	2.10	2.08	2.05	2.03	2.00	1.97
12	3.18	2.81	2.61	2.48	2.39	2.33	2.28	2.24	2.21	2.19	2.15	2.10	2.06	2.04	2.01	1.99	1.96	1.93	1.90
13	3.14	2.76	2.56	2.43	2.35	2.28	2.23	2.20	2.16	2.14	2.10	2.05	2.01	1.98	1.96	1.93	1.90	1.88	1.85
14	3.10	2.73	2.52	2.39	2.31	2.24	2.19	2.15	2.12	2.10	2.05	2.01	1.96	1.94	1.91	1.89	1.86	1.83	1.80
15	3.07	2.70	2.49	2.36	2.27	2.21	2.16	2.12	2.09	2.06	2.02	1.97	1.92	1.90	1.87	1.85	1.82	1.79	1.76
16	3.05	2.67	2.46	2.33	2.24	2.18	2.13	2.09	2.06	2.03	1.99	1.94	1.89	1.87	1.84	1.81	1.78	1.75	1.72
17	3.03	2.64	2.44	2.31	2.22	2.15	2.10	2.06	2.03	2.00	1.96	1.91	1.86	1.84	1.81	1.78	1.75	1.72	1.69
18	3.01	2.62	2.42	2.29	2.20	2.13	2.08	2.04	2.00	1.98	1.93	1.89	1.84	1.81	1.78	1.75	1.72	1.69	1.66
19	2.99	2.61	2.40	2.27	2.18	2.11	2.06	2.02	1.98	1.96	1.91	1.86	1.81	1.79	1.76	1.73	1.70	1.67	1.63
20	2.97	2.59	2.38	2.25	2.16	2.09	2.04	2.00	1.96	1.94	1.89	1.84	1.79	1.77	1.74	1.71	1.68	1.64	1.61
21	2.96	2.57	2.36	2.23	2.14	2.08	2.02	1.98	1.95	1.92	1.87	1.83	1.78	1.75	1.72	1.69	1.66	1.62	1.59
22	2.95	2.56	2.35	2.22	2.13	2.06	2.01	1.97	1.93	1.90	1.86	1.81	1.76	1.73	1.70	1.67	1.64	1.60	1.57
23	2.94	2.55	2.34	2.21	2.11	2.05	1.99	1.96	1.92	1.89	1.84	1.80	1.74	1.72	1.69	1.66	1.62	1.59	1.55
24	2.93	2.54	2.33	2.19	2.10	2.04	1.98	1.94	1.91	1.88	1.83	1.78	1.73	1.70	1.67	1.64	1.61	1.57	1.53
25	2.92	2.53	2.32	2.18	2.09	2.02	1.97	1.93	1.89	1.87	1.82	1.77	1.72	1.69	1.66	1.63	1.59	1.56	1.52
26	2.91	2.52	2.31	2.17	2.08	2.01	1.96	1.92	1.88	1.86	1.81	1.76	1.71	1.68	1.65	1.61	1.58	1.54	1.50
27	2.90	2.51	2.30	2.17	2.07	2.00	1.95	1.91	1.87	1.85	1.80	1.75	1.70	1.67	1.64	1.60	1.57	1.53	1.49
28	2.89	2.50	2.29	2.16	2.06	2.00	1.94	1.90	1.87	1.84	1.79	1.74	1.69	1.66	1.63	1.59	1.56	1.52	1.48
29	2.89	2.50	2.28	2.15	2.06	1.99	1.93	1.89	1.86	1.83	1.78	1.73	1.68	1.65	1.62	1.58	1.55	1.51	1.47
30	2.88	2.49	2.28	2.14	2.03	1.98	1.93	1.88	1.85	1.82	1.77	1.72	1.67	1.64	1.61	1.57	1.54	1.50	1.46
40	2.84	2.44	2.23	2.09	2.00	1.93	1.87	1.83	1.79	1.76	1.71	1.66	1.61	1.57	1.54	1.51	1.47	1.42	1.38
60	2.79	2.39	2.18	2.04	1.95	1.87	1.82	1.77	1.74	1.71	1.66	1.60	1.54	1.51	1.48	1.44	1.40	1.35	1.29
120	2.75	2.35	2.13	1.99	1.90	1.82	1.77	1.72	1.68	1.65	1.60	1.55	1.48	1.45	1.41	1.37	1.32	1.26	1.19
∞	2.71	2.30	2.08	1.94	1.85	1.77	1.72	1.67	1.63	1.60	1.55	1.49	1.42	1.38	1.34	1.30	1.24	1.17	1.00