



Andrea Maria Silva Lubrano Barbosa Vicente

Licenciatura em Biotecnologia

**Estudo do efeito biocida de suportes de celulose
impregnados com nanopartículas
de óxido de zinco e de prata**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientador: Rita Maria Mourão Salazar Branquinho, Doutora,
FCT-UNL

Co-orientador: Engenheiro Paulo Nico Casimiro, Mestre,
SMAS Almada

Júri:

Presidente: Prof. Doutor(a) Pedro António de Brito Tavares

Arguente(s): Prof. Doutor(a) Maria Paula Amaro de Castilho Duarte

Vogal(ais): Prof. Doutor(a) Rita Maria Mourão Salazar Branquinho



Abril de 2016

Andrea Maria Silva Lubrano Barbosa Vicente

Licenciada em Biotecnologia

**Estudo do efeito biocida de suportes de celulose
impregnados de nanopartículas de óxido de
zinco e prata**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientador: Rita Maria Mourão Salazar Branquinho, Doutora,
FCT-UNL

Co-orientador: Engenheiro Paulo Nico Casimiro, Mestre,
SMAS Almada

Júri:

Presidente: Prof. Doutor(a) : Prof. Doutor(a) Pedro António de Brito Tavares

Arguente(s): Prof. Doutor(a) Maria Paula Amaro de Castilho Duarte

Vogal(ais): Prof. Doutor(a) Rita Maria Mourão Salazar Branquinho

Abril de 2016

Estudo do efeito biocida de suportes de celulose impregnados de nanopartículas de óxido de zinco e prata

© Andrea Maria Silva Lubrano Barbosa Vicente

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Aos orientadores, Prof. Dra. Rita Branquinho e Eng. Paulo Nico Casimiro, pelas instruções, tentando sempre estimular o meu espírito científico e crítico, e pelo acompanhamento do trabalho que realizei durante o meu último ano de percurso académico.

À Professora Ana Luísa Fernando, pelos ensinamentos, disponibilidade e apoio prestado.

À Silvana e Cecília, dos Serviços Municipalizados de Água e Saneamento de Almada, pelo acolhimento, acompanhamento e conhecimentos que partilharam comigo.

À Raquel Água, pela simpatia, disponibilidade e recomendações.

Aos meus colegas e aos investigadores do Centro de Investigação de Materiais, pela simpatia e pelos bons momentos (de trabalho) partilhados.

Por último, mas nunca menos importante, à minha família pelo apoio incondicional com que sempre pude contar. As palavras serão sempre insuficientes...

Resumo

O acesso a água potável está longe de poder ser considerado universal. O consumo de água contaminada provoca a morte de milhões de pessoas ao nível global. Anualmente, 1,87 milhões de crianças morrem por doenças diarreicas provocadas pelo consumo de água contaminada. Um dos principais agentes etiológicos é a bactéria coliforme *Escherichia coli*, atualmente usada como indicador de contaminação fecal. A dificuldade de acesso a água potável é, por tais motivos, uma questão de saúde pública.

A nanotecnologia tem despertado o interesse da comunidade científica, pelas várias aplicações dos materiais à nanoescala. Uma delas é a utilização de nanopartículas como agentes antimicrobianos. As nanopartículas de prata e de óxido de zinco têm sido alvo de vários estudos, pelas suas propriedades antimicrobianas. Tendo em conta a problemática do acesso a água potável, procurou-se aliar as propriedades das nanopartículas à necessidade de criar uma alternativa a baixo custo para o tratamento de água contaminada com *E.coli*. O papel surge como o substrato ideal para o efeito. Trata-se de um material poroso, de baixo custo, atóxico, biocompatível e biodegradável. O papel utilizado foi o filtro de café Home7 nº4, no qual foram incorporadas nanopartículas de óxido de zinco e de prata. Foram preparados quatro tipos de filtros: impregnados com nanopartículas de óxido de zinco, com nanopartículas de prata, e duas duplas impregnações, alterando a ordem de incorporação das partículas. Os filtros foram caracterizados morfológica, estrutural e quimicamente e foram feitos os ensaios de filtração e testes microbiológicos. Foi feita a quantificação dos íons zinco e prata nos filtros e respetivas soluções de síntese e águas de lavagem, a partir da qual se obteve informação sobre a eficiência do procedimento de impregnação e as perdas de nanopartículas devido à dupla impregnação. Nos dois últimos foram utilizadas estruturas de filtros empilhados, em que se alternaram filtros virgens e impregnados. Foram testados dois tipos de pilhas: com três e com cinco filtros, verificando-se a diminuição da velocidade no segundo tipo de pilha. No que concerne à atividade antimicrobiana, só foi observada nos filtros impregnados com nanopartículas de prata, sem que se tenha conseguido perceber se o efeito foi bactericida ou bacteriostático. Verificou-se uma grande discrepância nos resultados obtidos, indicando que o procedimento deverá ser otimizado, com vista a obter resultados mais consistentes e reproduzíveis.

Palavras-chave: água potável, filtros de celulose, nanopartículas de prata, nanopartículas de óxido de zinco, efeito biocida, *E.coli*.

Abstract

Access to safe drinking water is far from being universal. Consumption of contaminated water causes the death of millions of people globally. Each year, 1.87 million and more people die from diarrheal diseases caused by contaminated water consumption. One of the main causes is the coliform bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) currently used as fecal contamination indicator. The lack of access to safe drinking water is, for those reasons, an issue of public health.

Nanotechnology has attracted the interest of the scientific community for the various applications of materials at the nanoscale. One is the use of nanoparticles as antimicrobial agents. Nanoparticles of silver and zinc oxide have been the subject of many studies for their antimicrobial properties. Taking into consideration the problem of access to safe drinking water, one sought to match the properties of nanoparticles to the need for creating a low cost alternative for contaminated water treatment with *E. coli*. Paper is an ideal substrate for the purpose as it is a porous, low cost, non-toxic, biocompatible and biodegradable material. No.4 Home7 coffee filter paper was used as substrate in which zinc oxide and silver nanoparticles were incorporated. Four types of filters were produced: one impregnated with zinc oxide nanoparticles, one with silver nanoparticles, and two double impregnations, changing the order of particles' incorporation. The filters were characterized morphologically, structurally, and chemically and filtration tests and microbiological tests were also performed. Quantification of zinc and silver ions was performed in the impregnated filters, synthesis solutions and rinsing water, from which information was acquired on the efficiency of the impregnation process and losses due to nanoparticles double impregnation. In the last two, stacked filter structures were used, alternating pristine and impregnated filters. Two types of stacks were tested: with three and with five filters, verifying speed decreasing in the second stack type. Antimicrobial activity was observed only in impregnated filters with silver nanoparticles, without distinguishing whether the effect that had been achieved was bactericidal or bacteriostatic. There was a large discrepancy in the results obtained, suggesting that the procedure should be optimized in order to reach more consistent and reproducible results.

Keywords: safe drinking water, cellulose filters, silver nanoparticles, zinc oxide nanoparticles, biocidal effect, *E. coli*.

Índice

Conteúdo

Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Índice	xiii
Índice de Figuras	xv
Índice de Tabelas	xvii
Abreviaturas	xix
Símbolos	xx
1 Fundamentação Teórica	1
1.1 A problemática do acesso a água potável	1
1.2 Nanotecnologia.....	2
1.2.1 Nanopartículas de óxido de zinco	4
1.2.2 Nanopartículas de prata	5
1.2.3 Atividade antimicrobiana	6
1.3 <i>Escherichia coli</i>	8
1.4 O papel	10
1.5 Limitações do uso de nanopartículas no tratamento da água	11
2 Descrição experimental	13
2.1 Substrato de celulose	14
2.2 Síntese <i>in situ</i> de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO NPs) e de prata (Ag NPs).....	14
2.2.1 Síntese <i>in situ</i> de nanopartículas de óxido de zinco	14
2.2.2 Síntese <i>in situ</i> de nanopartículas de prata.....	15
2.2.3 Dupla impregnação, com nanopartículas de óxido de zinco e de prata.....	15
2.3 Espectroscopia de absorção atômica de chama.....	15
2.4 Filtrações e Testes microbiológicos.....	16
3 Técnicas de caracterização	19
3.1 Microscopia eletrônica de varrimento	19
3.2 Espectroscopia dispersiva de raios X	20
3.3 Difração de raios X.....	21
3.4 Espectroscopia de absorção atômica de chama	22
4 Apresentação e Discussão de Resultados	25
4.1 Filtros de celulose impregnados com nanopartículas de óxido de zinco	25
4.1.1 Microscopia eletrônica de varrimento	26
4.1.2 Espectroscopia dispersiva de raios-X.....	27
4.1.3 Difração de raios X	28

4.2	Filtros de celulose impregnados com nanopartículas de prata.....	30
4.2.1	Microscopia eletrônica de varrimento	30
4.2.1	Espetroscopia dispersiva de raios X	31
4.2.2	Difração de raios X	32
4.3	Filtros de celulose impregnados com nanopartículas de prata e de óxido de zinco (Ag+ZnO).....	33
4.3.1	Microscopia eletrônica de varrimento	33
4.3.2	Espetroscopia dispersiva de raios-X.....	34
4.3.3	Difração de raios-X	35
4.4	Filtros de celulose impregnados com nanopartículas de óxido de zinco e de prata (ZnO+Ag).....	36
	Microscopia eletrônica de varrimento.....	36
4.4.1	36
4.4.2	Espetroscopia dispersiva de raios-X.....	37
4.4.3	Difração de raios-X.....	38
4.5	Espetroscopia de absorção atômica de chama	39
4.5.1	Quantificação de Zn ²⁺ e de Ag ⁺ nos filtros impregnados com nanopartículas de óxido de zinco e de prata	39
4.5.2	Quantificação de Zn ²⁺ nas soluções de síntese e águas de lavagem	41
4.5.3	Quantificação de Ag ⁺ nas soluções de síntese e águas de lavagem.....	44
4.6	Ensaio de filtração e testes microbiológicos	46
4.6.1	Ensaio de filtração	46
4.6.2	Testes microbiológicos.....	47
5	Conclusões e Perspectivas Futuras	50
	Referências Bibliográficas	53
	ANEXOS.....	59
	ANEXO I Concentração de Zn ²⁺ nos filtros impregnados com nanopartículas de óxido de zinco e de prata	59
	ANEXO II Concentração de Ag ⁺ nos filtros impregnados com nanopartículas de óxido de zinco e de prata	60
	ANEXO III Quantificação de Zn ²⁺ nas soluções de síntese e águas de lavagem dos filtros impregnados ZnO NPs e Ag NPs.....	61
	ANEXO IV Quantificação de Ag ⁺ nas soluções de síntese e águas de lavagem dos filtros impregnados ZnO NPs e Ag NPs.....	62
	ANEXO V Contagens do crescimento de <i>E.coli</i> em meio Lauryl após incubação a 37°C durante 24h, nas amostras em triplicado	63

Índice de Figuras

Figura 1 Estrutura cristalina do óxido de zinco – <i>wurtzite</i> . [19]	4
Figura 2 Mecanismo da atividade antimicrobiana dos iões prata e zinco.[36].....	7
Figura 3 Mecanismo, patogenicidade e prevenção de contaminação por <i>E.coli</i> O157:H7.[45].....	9
Figura 4 Imagem ilustrativa das pilhas de três e cinco filtros utilizadas nos ensaios. A cor atribuída aos filtros impregnados com nanopartículas é meramente ilustrativa.	17
Figura 5 Colónias de <i>E.coli</i> crescidas nas membranas de filtração, em meio Lauryl, após o período de incubação de 24h, a 37°C.	17
Figura 6 Equipamento utilizado em microscopia eletrónica de varrimento (<i>Carl Zeiss AURIGA Crossbeam SEM-FIB</i>).	20
Figura 7 Equipamento utilizado na difração de raios X (<i>PANalytical X'pert Pro</i>).	22
Figura 8 Equipamento utilizado na espectroscopia de absorção atómica de chama de acetileno/ar (<i>Analytik Jena - Zeenit 700</i>).	23
Figura 9 Filtro de celulose impregnado com nanopartículas de óxido de zinco (ZnO NPs).	25
Figura 10 Filtro impregnado com nanopartículas de óxido de zinco, analisado por microscopia eletrónica de varrimento.	26
Figura 11 Análise por espectroscopia dispersiva de raios X do filtro de café impregnado com nanoprtículas de óxido de zinco.	27
Figura 12 Difrátograma de raios X do filtro impregando com nanopartículas de óxido de zinco. As linhas verticais correspondem à estrutura <i>wurtzite</i> de ZnO de acordo com a ficha ICDD 00-036-1451.	28
Figura 13 Filtro de celulose impregnado com nanopartículas de prata (Ag NPs).	30
Figura 14 Imagens SEM dos filtros de celulose impregnados com nanopartículas de prata. À esquerda, as nanopartículas; à direita, aglomerados das nanopartículas de prata.	30
Figura 15 Análise por espectroscopia dispersiva de raios X do filtro de café impregnado com Ag NPs. ...	31
Figura 16 Difrátograma do filtro impregando com Ag NPs. As linhas verticais correspondem à estrutura cúbica da prata de acordo com a ficha ICDD 00-004-0783.	32
Figura 17 Filtro de celulose impregnado com nanopartículas de prata e de óxido de zinco (Ag+ZnO).	33
Figura 18 Imagens SEM dos filtros de celulose impregnados com nanopartículas de prata e de óxido de zinco – dupla impregnação designada por Ag+ZnO.....	33
Figura 19 Análise por espectroscopia dispersiva de raios X do filtro de café impregnado nanopartículas de prata e de óxido de zinco (Ag+ZnO).	34
Figura 20 Difrátograma de raios X do filtro impregando com Ag NPs e ZnO NPs. As linhas verticais a preto correspondem à estrutura <i>wurtzite</i> do óxido de zinco de acordo com a ficha ICDD 00-036-1451 e as linhas a vermelho, à estrutura cúbica da prata, segundo a ficha ICDD 00-004-0783.....	35
Figura 21 Filtro de celulose impregnado com nanopartículas de óxido de zinco e de prata (ZnO+Ag).	36
Figura 22 Imagens SEM dos filtros de celulose impregnados com ZnONPs e AgNPs – dupla impregnação designada por ZnO+Ag.	36
Figura 23 Análise por espectroscopia dispersiva de raios X do filtro de café impregnado com nanopartículas de óxido de zinco e de prata (ZnO+Ag). As linhas verticais a preto correspondem à estrutura wurtzite do óxido de	

zinco de acordo com a ficha ICDD 00-036-1451 e as linhas a vermelho, à estrutura cúbica da prata de acordo com a ficha ICDD 00-004-0783..... 37

Figura 24 Difratoograma do filtro impregnado com nanopartículas de óxido de zinco seguidas de nanopartículas de prata (ZnO+Ag). As linhas verticais a preto correspondem à estrutura wurtzite do óxido de zinco de acordo com a ficha ICDD 00-036-1451 e as linhas a vermelho, à estrutura cúbica da prata de acordo com a ficha ICDD 00-004-0783..... 38

Índice de Tabelas

Tabela 1 Concentração de Zn^{2+} e de Ag^+ nos filtros impregnados com nanopartículas de óxido de zinco e de prata: ZnO, Ag, Ag+ZnO e ZnO+Ag.	39
Tabela 2 Concentração de Zn^{2+} nas soluções de síntese das nanopartículas e águas de lavagem dos filtros impregnados e erro padrão associado às medições. Nos casos de dupla impregnação, a designação foi atribuída da seguinte forma: antes dos parênteses, a síntese cujo teor de metais foi quantificado e, entre parênteses, o filtro fabricado.	41
Tabela 3 Concentração de Ag^+ nas soluções de síntese das nanopartículas e águas de lavagem dos filtros impregnados, e respetivo erro padrão. Nas duplas impregnações, antes dos parênteses está designada a síntese cujo teor de metais foi quantificado e, entre parênteses, o filtro fabricado.	44
Tabela 4 Velocidade de filtração média e erro padrão das filtrações pelos três tipos de filtro testados, em pilhas de três e de cinco filtros.	46
Tabela 5 Contagens do crescimento de colónias de <i>E.coli</i> em meio Lauryl, nos filtros impregnados com ZnO NPs, Ag NPs e Ag+ZnO NPs, nas estruturas montadas (pilhas) de três e cinco filtros e no controlo.	47

Abreviaturas

NPs – nanopartículas

Ag NPs – nanopartículas de prata

ZnO NPs – nanopartículas de óxido de zinco

Ag+ZnO – dupla impregnação, de nanopartículas de prata seguida de óxido de zinco

ZnO+Ag – dupla impregnação, de óxido de zinco seguida de nanopartículas de prata

SEM – *Scanning Electron Microscopy*

EDS – *Electron Dispersive Spectroscopy*

XRD – *X-ray Diffraction*

E.coli – *Escherichia coli*

UFC – unidades formadoras de colónias

FAAS – *Flame Atomic Absorption Spectroscopy*

OMS – Organização Mundial da Saúde

UNICEF – *United Nations Children's Fund*

ROS – *Reactive Oxygen Species*

ADN – ácido desoxirribonucleico

WWAP – *World Water Assessment Programme*

Símbolos

λ – comprimento de onda dos raios X incidentes

θ – ângulo de difração

h, k, l – coordenadas dos planos de difração

d_{hkl} – espaçamento interplanar

K – constante geométrica de Scherrer

β – largura a meia altura da reflexão, em radianos

Capítulo 1

1 Fundamentação Teórica

O acesso a água potável e os serviços de saneamento constituem um direito humano essencial, reconhecido pela Organização das Nações Unidas (ONU). No entanto, vários bilhões de pessoas em todo o mundo não têm acesso a este bem preciso, nem ao saneamento básico. O consumo de água contaminada está na origem de diversas patologias, algumas delas fatais. Sabe-se que um dos agentes etiológicos mais comuns é a *Escherichia coli*, uma bactéria coliforme frequentemente encontrada nas fezes. Devido à incidência das doenças provocadas pela contaminação da água, particularmente em países sub-desenvolvidos, torna-se essencial o desenvolvimento de alternativas de baixo custo para a purificação da água.

O presente trabalho incidiu no estudo do efeito biocida de filtros de celulose impregnados com nanopartículas de óxido de zinco e de prata, tendo-se utilizado como substrato papel de filtro de café. A escolha do substrato deveu-se às características do papel, nomeadamente o baixo preço, a flexibilidade e a biodegradabilidade e o fato de não apresentar toxicidade.

O trabalho experimental baseou-se

- na impregnação dos filtros de café com nanopartículas de óxido de zinco e de prata
- na caracterização dos filtros de café por microscopia eletrônica de varrimento, espectroscopia dispersiva e difração de raios X
- na quantificação dos metais nos filtros impregnados, bem como das respetivas soluções de síntese e águas de lavagem
- nos testes de filtração e ensaios microbiológicos, avaliando o efeito antibacteriano em *E.coli*.

1.1 A problemática do acesso a água potável

A água ocupa três quartos da superfície terrestre, sendo 97,5% de água salgada e apenas 2,5% de água doce. Estes 2,5% estão distribuídos por glaciares, calotas polares, águas subterrâneas, humidade do solo, humidade atmosférica, lagos e rios.[1]

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, OMS, mais de 20% da população mundial vive em regiões onde há escassez de água e quase 25% não possui condições económicas e infraestruturas que permitam a obtenção de água a partir das fontes. O aumento da população e as alterações climáticas e, conseqüentemente, a seca e a desertificação, poderão futuramente estar na origem da

escassez de água mesmo nos países onde, até ao momento, não se verifica o problema. Portanto, é de extrema importância a gestão e o desenvolvimento de sistemas de abastecimento de água eficientes, assegurando a qualidade, e a um preço razoável. [1]

Segundo a *World Water Assessment Programme* (WWAP), em 2030 quase metade da população viverá em áreas de difícil acesso a água potável (dados de 2012).[2] Apesar dos esforços envidados para que haja um acesso universal equitativo, no que diz respeito ao acesso a água potável e ao saneamento básico, a magnitude e extensão dos problemas diferem entre as várias regiões do planeta, pelo que também diferem as formas de atuação, com vista à sua resolução. Estas diferenças não são apenas observáveis entre países, mas também em regiões diferentes de um mesmo país, pois o desenvolvimento económico e social, até mesmo os padrões climáticos, podem ser heterogêneos. Em algumas partes do mundo, observa-se uma grande evolução neste sentido, noutras, a estagnação.[3]

Nos países em desenvolvimento, os episódios de diarreia infecciosa repetem-se anualmente, afetando adultos e crianças. Na origem do problema, estão o consumo de água contaminada, a falta de higiene e de condições de saneamento adequadas. As doenças diarreicas são, portanto, um problema de saúde pública ao nível global, sendo 15 a 20% dos casos consequência do consumo de água contaminada. O número de mortes em idade infantil devido a doenças diarreicas é alarmante, tendo atingido 1,87 milhões de casos em crianças com idade inferior a cinco anos, sendo a *E.coli* um dos principais agentes etiológicos.[4] Assim sendo, o controlo da qualidade da água e a possibilidade de contaminação por bactérias, é essencial na medida em que fornece informação sobre a segurança do consumo da água de determinadas fontes. Os indicadores mais utilizados são as bactérias fecais, através das quais é possível identificar a presença de contaminação fecal e de microrganismos potencialmente patogénicos. A *E.coli* é, neste caso, recomendada como indicador bacteriano padrão.[4][5]

Tendo em conta as dificuldades ao nível económico da falta de infraestruturas que permitam o tratamento e, conseqüentemente, o acesso generalizado das populações à água potável, é necessário criar alternativas viáveis para o efeito. O desenvolvimento de tecnologias e produtos de uso doméstico para a purificação da água de consumo, beneficiará grandemente as populações em risco. [5] Os nanomateriais funcionais podem ser utilizados para o efeito, criando-se sistemas baratos, portáteis, de fácil utilização e distribuição e que requeiram baixa energia para o funcionamento.[6]

1.2 Nanotecnologia

A nanotecnologia pode ser definida como o planeamento, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas pelo controlo da dimensão e da forma à nanoescala (dimensões de 1 a 100 nm), escala à qual os materiais apresentam propriedades distintas.[7][8][9][10]

O conceito do nanómetro foi proposto por Richard Zsigmondy, que recebeu o prémio Nobel da Química em 1925. Zsigmondy atribuiu o termo especificamente o tamanho das partículas e foi o

primeiro a medir partículas coloidais de ouro utilizando um microscópio.[11] O conceito de “nanotecnologia” foi desenvolvido pelo físico Richard P. Feynman, na obra intitulada *There's plenty room at the bottom*. [12]

A nanotecnologia é, cada vez mais, uma área de grande interesse para as ciências e tecnologia, dadas as suas aplicações no fabrico de novos materiais à escala nanométrica. O crescente interesse no estudo das nanopartículas advém do fato de possuírem propriedades químicas, óticas e mecânicas definidas. As nanopartículas metálicas vêm despertando particular interesse por apresentarem propriedades antibacterianas devido ao seu elevado rácio de área superficial pelo volume.

A bionanotecnologia emergiu como uma espécie de elo de ligação entre a biotecnologia e a nanotecnologia, almejando o desenvolvimento de tecnologias biossintéticas e amigas do ambiente, à nanoescala. [13]

A nanotecnologia é aplicada em diversas áreas, nomeadamente, nas engenharias biomédica, alimentar, cosmética, farmacêutica e de tecidos. [11][7] Na indústria alimentar e cosmética, o uso de nanomateriais vem aumentando drasticamente para melhorias de produção, acondicionamento, tempo de vida de prateleira e biodisponibilidade. [7] A nanomedicina, que inclui subsectores como a engenharia de tecidos, biomateriais, biossensores e bioimagem, por sua vez, foi desenvolvida para avaliar os benefícios e riscos dos dispositivos e nanomateriais usados em medicina. [7][14] Vários têm sido os nanomateriais estudados, tais como cobre, ouro, prata, titânio e óxido de zinco, mas os melhores resultados têm sido obtidos com as nanopartículas de prata. Estas demonstraram-se eficientes enquanto agentes antimicrobianos. [13] As nanopartículas de óxido de zinco também demonstraram atividade antimicrobiana e são usadas, por exemplo, como sensores de qualidade e segurança alimentar. [7][15]

Outra importante aplicação dos nanomateriais enquanto agentes antimicrobianos é a sua utilização no tratamento da água com recurso a dispositivos portáteis. Os custos associados às redes de distribuição de água, o desperdício e a perda de qualidade da água devido à idade das redes bem como a necessidade de fontes alternativas de água e da sua reutilização em regiões que sofrem com a escassez ou falta de qualidade, levaram a um crescente interesse no desenvolvimento de tecnologias alternativas, e seguras, para o tratamento da água. Nestes casos, os nanomateriais que possuam propriedades antimicrobianas poderão ser utilizados para o desenvolvimento de tecnologias à pequena escala e que demonstrem ser eficientes, nomeadamente os dispositivos portáteis, para sistemas que não estejam diretamente conectados à rede central, para aumentar a robustez das redes de fornecimento de água ou ainda para respostas de emergência em situações de catástrofes. [3][16]

1.2.1 Nanopartículas de óxido de zinco

O óxido de zinco, ZnO, apresenta-se sob a forma de pó branco insolúvel em água, e é frequentemente usado como aditivo em diversos materiais e produtos, nomeadamente, plástico, cerâmica, vidro, tintas, bem como em pomadas, creme e protectores solares. A sua elevada eficiência na absorção de luz ultravioleta e transparência à luz visível são duas das características que o tornam particularmente interessante nessas aplicações.[17][3] O óxido de zinco é, geralmente, sintético, mas ocorre na natureza sob a forma do mineral zincite.[17] São vários os possíveis processos de crescimento das nanopartículas de óxido de zinco, resultando em estruturas com morfologias e aplicabilidades diferenciadas. Alguns exemplos são os *nanocombs*, *nanorings*, *nanohelices/nanosprings*, *nanobelts*, *nanowires* e *nanocages*. [18]

Trata-se de material cristalino, que se apresenta essencialmente sob a forma de wurtzite (Figura 1).

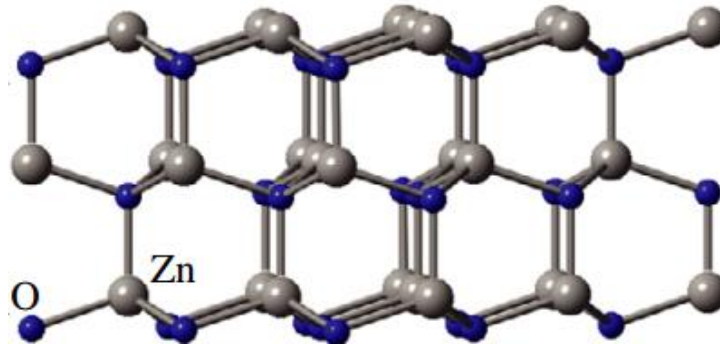


Figura 1 Estrutura cristalina do óxido de zinco – wurtzite. [19]

O óxido de zinco é um dos materiais usados enquanto antimicrobianos. O seu baixo custo, bem como o rácio superfície-volume obtido quando é usado como partículas à nanoescala, fazem com que seja uma alternativa viável e de baixo custo.[20]

Os mecanismos antibacterianos das nanopartículas de metais ou de óxidos de metais estão associados à alteração das propriedades da membrana celular e da respetiva permeabilidade, levando à penetração de partículas na célula bacteriana com libertação de iões metálicos, danificando o ADN. Por outro lado, no caso das nanopartículas de óxidos de metais, como o óxido de zinco, a produção de espécies reativas de oxigénio por fotocatalise poderá estar na origem da atividade antimicrobiana.[21][22]

Vários estudos referem o seu poder biocida e/ou de inibição de crescimento em espécies bacterianas, nomeadamente em *Bacillus subtilis* e em *Escherichia coli*, indicando diferentes níveis de toxicidade em função da espécie alvo. Nas espécies previamente citadas, os estudos sugerem níveis de inibição de 90% e 38%, respetivamente. Por outro lado, existem estudos na área da pedologia que

demonstram o efeito das nanopartículas de ZnO na redução de biomassa bacteriana e na alteração da diversidade e composição das comunidades bacterianas do solo.[23]

Tendo em conta que as nanopartículas de óxido de zinco podem ser impregnadas numa matriz sólida, torna-se possível o desenvolvimento de uma sistema estável, mantendo as propriedades físicas associadas à pequena dimensão e à atividade química devida à sua disponibilidade na membrana.[23]

No que concerne a uma possível relação entre a dimensão das nanopartículas e a sua atividade antibacteriana, não existe consenso. Se, por um lado, existem estudos que afirmam que a toxicidade é tanto maior quanto menores forem as nanopartículas de ZnO, por outro, autores afirmam não ter observado qualquer relação entre a dimensão e o efeito das mesmas.[3][24]

1.2.2 Nanopartículas de prata

As melhorias conseguidas nos métodos de produção fizeram com que se expandisse a utilização de nanomateriais em vários produtos comercializados. De entre esses nanomateriais, as nanopartículas de prata ganharam especial destaque enquanto agentes antimicrobianos. São vários os exemplos de produtos nos quais podem ser encontradas, nomeadamente em vestuário, recipientes para armazenamento de alimentos, cosméticos, dispositivos eletrónicos e medicamentos. [25][26][27][28] Na área da medicina, materiais impregnados com nanopartículas de prata podem ser utilizados para a redução de infeções, nomeadamente na prevenção do crescimento de colónias bacterianas em próteses, catéteres, material dentário e até mesmo na pele humana. A sua aplicação em têxteis bem como no tratatamento da água têm sido alvo de investigação.[9] Ao nível ambiental, são consideradas como uma boa alternativa ao uso de desinfetantes químicos, por não serem oxidantes fortes e não tenderem a produzir subprodutos de desinfeção.[29]

As nanopartículas de prata são altamente eficientes enquanto agentes antimicrobianos devido à sua elevada área superficial, que permite maior contato com os microrganismos.[30][9] Portanto, nanopartículas de menores dimensões são mais desejáveis, por possuírem maior área superficial, isto é, maior área disponível para interação. Estudos demonstraram que partículas com dimensões iguais ou inferiores a 10 nm são mais tóxicas para bactérias como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Por este motivo, a agregação deve ser prevenida. Por outro lado, a sua distribuição no substrato deve ser homogénea, favorecendo o contato e a reação com os microrganismos. As propriedades antimicrobianas das Ag NPs dependem também da sua concentração e da taxa de libertação dos iões.[26][31]

Apesar dos mecanismos específicos das nanopartículas de prata, como a associação destas à membrana e subsequente alteração da mesma resultando na produção de espécies reativas de oxigénio, a toxicidade das Ag NPs está essencialmente relacionada com a libertação dos iões de prata produzidos pela oxidação e dissolução das mesmas. Estes atacam, preferencialmente, a cadeia respiratória, os mecanismos de divisão e, finalmente, levam à morte celular.[25][30]

Se, por um lado, a sua eficiência enquanto agentes antibacterianos está comprovada, por outro, os efeitos ambientais da sua utilização precisam de ser estudados. Sabe-se que estas nanopartículas facilmente se soltam do substrato, o que pode suceder pela lavagem do mesmo. As forças de ligação entre as Ag NPs e o substrato devem ser elevadas, prevenindo a exposição.[32][26] No que diz respeito à saúde humana, a elevada exposição aos iões de prata pode resultar em ligações fortes do metal a grupos amina, carboxilato e fosfato, ou a complexos proteicos no organismo. A longo prazo, a acumulação de prata poderá provocar o desenvolvimento de argíria, patologia caracterizada pela descoloração da pele, tornando-se cinza-azulada. De acordo com a Agência de Proteção Ambiental norte-americana, o teor de prata na água de consumo não deverá ultrapassar 100 ppb. [33]

1.2.3 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana relaciona-se com os compostos que possuem efeito antimicrobiano, sem que sejam tóxicos para os tecidos adjacentes. Frequentemente, os agentes antimicrobianos resultam da modificação química de compostos naturais. São exemplos os β-lactanos, cefalosporinas ou carbapenemos.[34] Também existem produtos naturais, tais como aminoglicosídeos, e antibióticos sintéticos, como sulfonamidas. Tais agentes podem ser classificados como bactericidas ou bacteriostáticos, matando ou tornando mais lento o seu crescimento, respetivamente. Um dos problemas que advêm do uso excessivo dos referidos agentes é o desenvolvimento de uma resistência por parte das bactérias, perdendo a sua eficácia. Através dos processos de transferência de genes por conjugação, transdução ou transformação, a resistência pode ser geneticamente herdada. Este fenómeno poderá resultar, inclusive, na emergência de patologias que já terão sido anteriormente controladas.[34]

Os mecanismos de ação das nanopartículas ainda não foram completamente compreendidos. Estes dependem de vários fatores, tais como a composição, a modificação superficial, propriedades intrínsecas e a espécie bacteriana em causa.[35][24]

As nanopartículas podem interagir eletrostaticamente com a membrana bacteriana, causando a sua destruição. O stress oxidativo provocado pela formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) e a internalização das nanopartículas causam alterações ao nível celular, nomeadamente ao nível do transporte de eletrões, das proteínas e do ADN, levando à morte celular (Figura 2).[31][32]

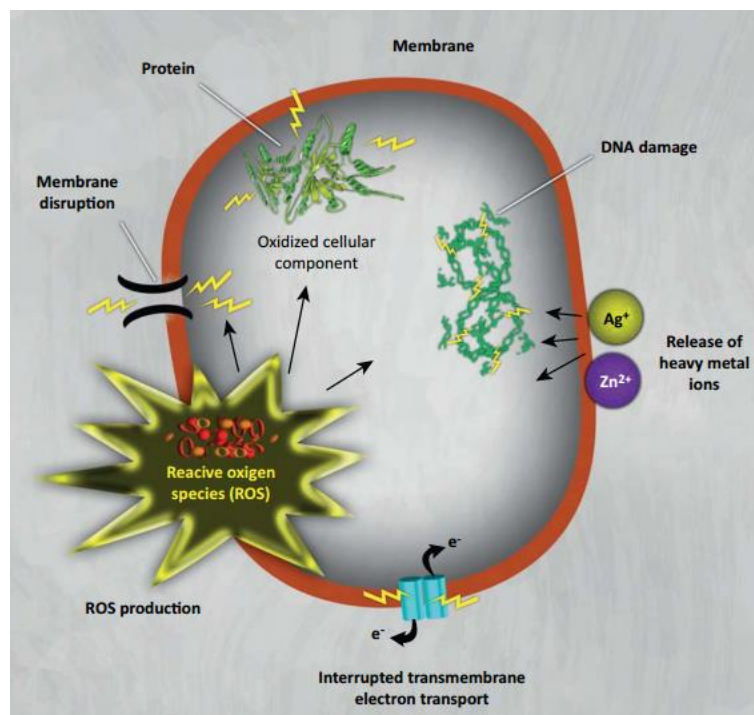


Figura 2 Mecanismo da atividade antimicrobiana dos íões prata e zinco.[36]

A avaliação do potencial antimicrobiano dos nanomateriais enquanto possível alternativa a outros desinfetantes no tratamento da água é feita em comparação com os desinfetantes convencionais. Estudos demonstraram que os íões prata possuem atividade antimicrobiana igual e, em certos casos, superior à de determinados desinfetantes convencionais.[3] Portanto, podem ser utilizados como alternativa ou em conjunto com as tecnologias já existentes para aumentar a eficiência do procedimento. Outra possibilidade apontada nesse estudo relaciona-se com a utilização das nanopartículas em membranas de filtração, noutras superfícies, ou ainda em reatores utilizados no tratamento e/ou distribuição da água.[3] Apesar da tecnologia de membrana em larga escala já ser utilizada no tratamento de água, ela vem demonstrando algumas fraquezas, nomeadamente, a falta de robustez resultante da fragilidade das membranas e os custos relativamente elevados, pelo que a sua aplicação em sistemas de tratamento de água à pequena escala, que seriam sustentáveis no meio rural, não é viável. Portanto, a tecnologia deve ser otimizada de modo a aumentar a robustez, não requerer bombas nem eletricidade para o seu funcionamento, ser de fácil utilização e manutenção e produzir água adequada para o consumo.[29]

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana estão divididos em grupos, de acordo com o princípio aplicado no sistema: testes de difusão (Kirby-Bauer e Stokes), de diluição (concentração mínima inibitória) e de difusão e diluição (método de E-Teste).[9]

1.3 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli*, ou *E.coli*, é uma bactéria gram-negativa, pertencente à família das Enterobacteriaceae, também conhecidas como bactérias coliformes. Trata-se de um bacilo que pode ser imóvel ou movimentar-se por meio de flagelos. Esta bactéria é frequentemente encontrada nas fezes e pode viver no ambiente, sobrevivendo tanto na presença como na ausência de oxigênio. O intervalo de temperaturas em que ela consegue crescer situa-se entre 8°C e 44-45°C, e a temperatura ótima de crescimento é de 37°C. No entanto, pequenas flutuações no intervalo de temperaturas de crescimento são observadas, em função da estirpe.[37][38]

A *E.coli* foi isolada de fezes de crianças pelo pediatra alemão Theodor Escherich em 1885. Em inícios do século XX já era utilizada como indicador de contaminação fecal em água e alimentos. Em 1940, foi reconhecida como responsável por patologias de natureza entérica, nomeadamente, gastroenterites e associada a vários casos de diarreia. Por essa altura, estabeleceu-se um conjunto de medidas que visavam o seu controlo nos países desenvolvidos.[39]

A *E.coli* coloniza o trato gastrointestinal dos recém-nascidos poucas horas após o nascimento, o que geralmente resulta numa co-existência pacífica, da bactéria e do hospedeiro. Sabe-se que nestes casos a presença da bactéria é benéfica, pois impede a prevalência de outras bactérias, potencialmente patogénicas, no trato gastrointestinal dos humanos. No entanto, o risco é elevado quando o hospedeiro é imunocomprometido ou possui algum tipo de alteração no trato gastrointestinal, como acontece em casos de peritonite.[38][40][41] As estirpes desta bactéria são, na sua maioria, inofensivas. A *E. coli* O157:H7 é um exemplo das estirpes patogénicas, encontrada em água ou alimentos contaminados por contato direto com a bactéria ou indiretamente, por contato com animais infetados (Figura 3). Trata-se de uma variedade rara da *E.coli*, que produz grandes quantidades de toxinas, que causam sérios danos ao trato gastrointestinal e, conseqüentemente, situações patológicas graves, nomeadamente, colite hemorrágica.[42][43][44] Esta estirpe foi identificada em 1975, mas só em 1982 foi identificada como causadora de doenças entéricas, devido à sua ligação a vários casos de diarreia hemorrágica. A partir de então, passou a ser designada como *E.coli* enterohemorrágica. Dez partículas infecciosas são suficientes para desencadear sintomas de doença, que podem surgir em períodos iguais ou superiores a 24h.[45]

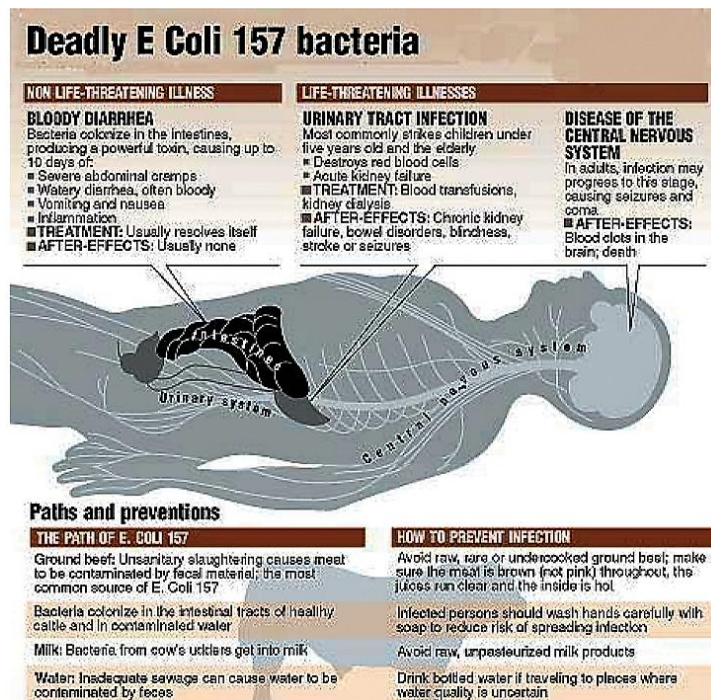


Figura 3 Mecanismo, patogenicidade e prevenção de contaminação por *E.coli* O157:H7.[45]

Contudo, existem várias estirpes de *E.coli*, com elevado grau de adaptação, que adquiriram atributos virulentos, conferindo-lhes uma ainda maior capacidade de adaptação e patogenicidade. Os atributos virulentos são de natureza genética e podem ser transmitidos a outras estirpes, originando novas combinações de fatores de virulência. De um modo geral, são três os síndromes clínicas que resultam de infecção: doenças diarreicas/entéricas, infecções do trato urinário e septicemia/meningite. Ao nível celular, as atividades afetadas são várias: transcrição, apoptose, transdução de sinal, síntese proteica, função mitocondrial, função citoesquelética, divisão celular e secreção de iões.[40][46]

Até ao momento, existem seis categorias de *E.coli* bem caracterizadas, de acordo com o mecanismo e o tipo de patologia causada. São elas: *E.coli* enteropatogénica (EPEC), *E.coli* enterohemorrágica (EHEC), *E.coli* enterotoxigénica (ETEC), *E.coli* enteroagregativa (EAEC), *E.coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E.coli* difusamente aderente (DAEC).[40]

Em caso de risco de contaminação por *E.coli* em depósitos de água, recomendam-se três medidas essenciais: ferver a água de consumo, desinfetar o depósito de água e monitorizar a qualidade da água, assegurando a eliminação completa e definitiva da bactéria. Relativamente ao consumo da carne, é recomendável que seja sempre bem cozida; o leite e derivados, por sua vez, devem ser tratados (pasteurizados).[45]

1.4 O papel

O papel, usado no presente trabalho como substrato para a impregnação de nanopartículas de prata e de óxido de zinco, apresenta uma grande heterogeneidade, envolvendo várias escalas de periodicidade física e química. Na sua composição, estão fibras linhinocelulósicas, curtas e descontínuas com aditivos funcionais. Os aditivos comumente utilizados são corantes, agentes de colagem e de enchimento inorgânico, auxiliares de retenção, polímeros neutros, revestimento, entre outros.[15][47][48] A qualidade do papel depende do conteúdo em celulose e lenhina da matéria vegetal do qual é extraído. Ao nível mecânico e de tração, existe uma proporcionalidade direta em relação ao conteúdo em celulose. A lenhina, por sua vez, é um polímero indesejável na produção do papel e a sua remoção requer tratamento químico e energético de grande porte.[49][50]

A dimensão dos poros do papel é muito variável: o espaço entre as fibras é de aproximadamente 100 μm , poros da parede celular da fibra variam de 1 a 10 μm e a espessura das fibrilhas encontra-se na ordem dos nanômetros. Além destes, existem vários canais nos poros, aos quais as nanopartículas podem ficar agarradas.[15]

As vantagens da utilização do papel como substrato são claras:

- material abundante,
- baixo custo de aquisição,
- propriedades de barreira,
- estrutura porosa e superfície hidrofílica que permitem a adsorção de suspensões de nanopartículas por forças capilares,
- forte,
- atóxico,
- requer pequenos volumes de nanopartículas para que se possa observar resultados satisfatórios,
- biodegradável,
- biocompatível,
- não poluente,
- reciclável.[15][25][51][52]

As propriedades da celulose e a crescente preocupação com a proteção ambiental têm feito com que a investigação se volte, cada vez mais, para a possibilidade da sua utilização em substituição dos materiais derivados do petróleo para aplicações industriais. A morfologia e estrutura específicas dos materiais porosos é aplicada em vários processos industriais, motivo pelo qual os mecanismos de formação deste tipo de materiais vêm atraindo a atenção de vários investigadores. As estruturas

porosas podem ser reforçadas por vários processos, mas a utilização dos mesmos na produção ou otimização do papel ainda carece de estudos.[53]

O papel vem sendo utilizado enquanto substrato para funcionalização com nanopartículas, pelas características anteriormente referidas. Tratando-se de um compósito heterogêneo e poroso, torna-se difícil controlar a disposição das nanopartículas que ficam, frequentemente, distribuídas de forma heterogênea. Poucos estudos caracterizaram a distribuição das nanopartículas pela superfície do papel, sem que até agora se tenha feito um trabalho de otimização do papel para essa finalidade.[15][54]

1.5 Limitações do uso de nanopartículas no tratamento da água

A eficácia da utilização de nanopartículas enquanto agentes antimicrobianos é comprovada. No entanto, a sua utilização no tratamento da água apresenta alguns desafios no que diz respeito à retenção dos nanomateriais e da sustentabilidade da atividade antimicrobiana.[3][36]

O aumento da utilização de produtos que contêm nanopartículas faz aumentar o risco de contaminação das fontes de água potável. Apesar do tratamento da água, prevê-se que uma concentração significativa de nanopartículas não seja removida. Os riscos ambientais são consideráveis, pois é possível que as nanopartículas sejam consumidas pelos organismos aquáticos, também devido à sua dissolução ou pela agregação, formando aglomerados.[33] As nanopartículas apresentam uma área superficial específica que está na origem da sua reatividade mas, com a agregação, esta condição é contrariada. A formação de aglomerados é favorecida pela presença de sais, sendo menos frequente em água pura. O nível de agregação, a dimensão final das nanopartículas e a interação com a matéria orgânica são alguns fatores que afetam a eficiência da sua remoção da água de consumo.[3]

A importância da retenção dos nanomateriais, especificamente falando das nanopartículas, advém de duas questões: o custo associado à perda de nanomateriais e, acima de tudo, os possíveis problemas ambientais e de saúde pública. Vários estudos de nanotoxicidade vêm sendo levados a cabo com o objetivo de perceber melhor o impacto da sua utilização nos dois aspetos acima referidos. No que diz respeito às nanopartículas de óxido de zinco e de prata abordados no presente trabalho, os estudos apresentam resultados divergentes.[27]

De acordo com Li *et al.*, as nanopartículas de óxido de zinco, a concentrações iguais ou superiores a 5 mM podem causar a diminuição da viabilidade das células T humanas. As nanopartículas de prata, por sua vez, não apresentam evidências de risco de toxicidade em humanos.[3]

Segundo Giovanni *et al.*, a citotoxicidade é observada a partir de 100 mg/L, sendo as ZnO NPs potencialmente mais tóxicas do que as Ag NPs. A uma concentração de 10 mg/L, as ZnO NPs, apesar de não apresentarem citotoxicidade, podem elevar o stress oxidativo intracelular. Os autores afirmam que as concentrações máximas para as nanopartículas, sem que se observe o efeito citotóxico, são muito superiores às permitidas para os respetivos metais ou óxidos de metais. Com base nestes

resultados, concluem que o teor de nanopartículas estimado em águas de consumo não acarreta riscos para a saúde humana.[27][6]

Chalew *et al.* por sua vez, afirmam que a ingestão de nanopartículas através da água de consumo poderá constituir um risco para a saúde humana de forma direta ou indireta. A exposição direta às nanopartículas ou indireta, pela libertação de iões, pode ter consequências graves para a saúde, como danos ao nível renal, hipertensão arterial, inflamação gastrointestinal, danos neurológicos e cancro. Em testes *in vivo* realizados em ratos, a ingestão de água contendo nanopartículas, observou-se o aumento da concentração de nanopartículas no fígado, rins, cérebro e no sangue, quando comparados com os controlos. Alguns destes efeitos foram observados em testes de exposição da ratos e murganhos a nanopartículas de óxido de zinco e de prata.[14]

Capítulo 2

2 Descrição experimental

Neste capítulo pretende-se descrever o procedimento seguido com o objetivo de testar o efeito biocida dos quatro tipos de filtros de celulose impregnados com nanopartículas: de óxido de zinco, de prata, de óxido de zinco e prata, e de prata e óxido de zinco, pela ordem descrita. Os filtros foram preparados e caracterizados, procedeu-se à quantificação dos iões de zinco e de prata nos próprios e nas respetivas soluções de síntese e águas de lavagem, e aos ensaios de filtração de pilhas de três e de cinco filtros, seguidos dos testes microbiológicos.

O presente trabalho foi desenvolvido:

- no **Centro de Investigação de Materiais (CENIMAT)** da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa
 - Impregnação dos filtros de celulose com nanopartículas de prata e de óxido de zinco
 - Caracterização do material por microscopia eletrónica de varrimento (SEM), espectroscopia dispersiva de raios X (EDS) e difração de raios X (DRX)
- nos **Serviços Municipalizados de Água e Saneamento de Almada (SMAS Almada)**
 - Ensaio de filtração
 - Pesquisa e quantificação de *E.coli*
- no **Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa** da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa
 - Caracterização dos filtros preparados e das respetivas soluções de síntese e águas de lavagem, por espectroscopia de absorção atómica de chama (FAAS).

2.1 Substrato de celulose

O substrato utilizado foi o filtro de café HOME 7 nº4, comercializado pela cadeia de supermercados Pingo Doce. Para a obtenção de filtros com a dimensão adequada à realização do presente trabalho, procedeu-se ao corte dos mesmos com recurso a um laser de CO₂ de corte, em círculos com 4,5 cm de diâmetro.

Os filtros cortados serviram de substrato para a síntese *in situ* de nanopartículas de prata e de óxido de zinco, foram posteriormente caracterizados química, morfológica e estruturalmente, e utilizados nos testes de filtração e microbiologia, de acordo com objetivo do estudo.

2.2 Síntese *in situ* de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO NPs) e de prata (Ag NPs)

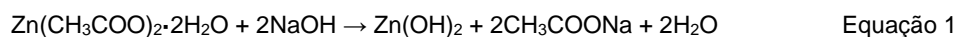
As sínteses a seguir descritas foram realizadas com o objetivo de incorporar nanopartículas de óxido de zinco e de prata nos filtros de café. Foram preparados quatro tipos de filtros: com ZnO NPs, com Ag NPs, duplamente impregnados com Ag NPs e posteriormente com ZnO NPs e duplamente impregnados com ZnO NPs e de seguida com Ag NPs.

2.2.1 Síntese *in situ* de nanopartículas de óxido de zinco

O protocolo para a síntese *in situ* para a impregnação de nanopartículas de óxido de zinco em substrato de celulose foi adaptado de Jaber B., Laânab, L.[55]

O filtro de café foi mergulhado em 100 mL da solução de acetato de zinco di-hidratado, (CH₃(COO)₂ZnO·2H₂O – *Sigma Aldrich* 98%) 0,08 mM, sob a agitação de 280 rpm, tendo-se adicionado 20 mL de hidróxido de sódio (NaOH – *Sigma Aldrich* 98%) 1 M, pipetando 1 mL a cada 30 segundos. Manteve-se a solução em agitação por uma hora, tempo após o qual o filtro foi retirado para lavagem com 60 mL de água destilada e secagem ao ar.

A síntese das nanopartículas de óxido de zinco dá-se pelo conjunto das três reações representadas pelas equações que se seguem:



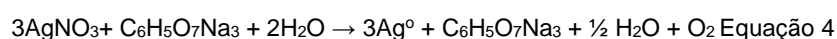
Numa primeira fase, a adição do hidróxido de sódio (NaOH) à solução do sal de zinco, gera um intermediário, o hidróxido de zinco, Zn(OH)₂. A conversão deste último em óxido de zinco (ZnO) é promovida pelo excesso de hidróxido de sódio na presença do solvente (água).[56]

2.2.2 Síntese *in situ* de nanopartículas de prata

O protocolo para a síntese *in situ* para a impregnação de nanopartículas de prata em substrato de celulose foi baseado em Simões, F.[57]

Preparou-se uma solução de 50 mL de citrato de sódio di-hidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ – Roth 99%) 300 mM. Num balão introduziu-se a solução previamente preparada e o filtro de café, num banho de óleo à temperatura de 100 °C, com agitação constante de 1100 rpm, num sistema de refluxo. Tendo atingido a temperatura de ebulição, adicionou-se o volume de 5 mL da solução de nitrato de prata 10 mM ($AgNO_3$ – Sigma Aldrich 99%), com auxílio de um conta-gotas. Verificando-se a mudança de cor, retirou-se o aquecimento, mantendo a agitação. Após aproximadamente 10 minutos, retirou-se o filtro, tendo-se procedido à sua lavagem com 60 mL de água destilada e secagem ao ar.

A equação representa a reação de redução que ocorre para a formação das nanopartículas de prata:



2.2.3 Dupla impregnação, com nanopartículas de óxido de zinco e de prata

As duplas impregnações basearam-se na síntese de ambos os tipos de nanopartículas, ZnO NPs e Ag NPs, num mesmo filtro. Foram preparados filtros de café impregnados com ZnO NPs seguidas de Ag NPs e de Ag NPs seguidas de ZnO NPs. Em ambos os casos, utilizaram-se filtros previamente impregnados com o primeiro tipo de nanopartículas, após secagem completa ao ar, para a segunda impregnação. No caso de dupla impregnação com nanopartículas de prata seguidas de óxido de zinco (Ag+ZnO), aumentou-se a agitação para 450 rpm, para facilitar a homogeneização da solução de síntese das ZnO NPs. Esta apresentou uma coloração acastanhada, devida às Ag NPs previamente impregnadas que se soltaram do filtro, passando para a solução de síntese de ZnO NPs. Na dupla impregnação pela ordem inversa, não foi necessária qualquer alteração dos procedimentos descritos em 2.2.1 e 2.2.2.

2.3 Espectroscopia de absorção atômica de chama

O procedimento foi baseado em Bagdatlioglu, N., Nergiz, C., Ergonul, P. G.[58] e levado a cabo no laboratório 145 do Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa da FCT/UNL.

A espectroscopia de absorção atômica foi utilizada para quantificar metais (iões zinco e prata) presentes nos filtros de papel impregnados com nanopartículas, bem como nas respectivas soluções de síntese e águas de lavagem.

Os filtros foram pesados e introduzidos em tubos de digestão, tendo-se adicionado 10 mL de ácido nítrico concentrado (HNO_3 , Panreac – 65%), e aquecidos à temperatura de 130 °C durante 3 h. Depois de arrefecidas, as soluções resultantes da digestão foram filtradas e transferidas para balões

de 50 mL, perfazendo-se o volume com água desionizada (Milli-Q). O mesmo procedimento foi feito para os brancos, em que se utilizou o volume de 10 mL de HNO₃ concentrado.

As soluções de síntese e águas de lavagem foram filtradas para balões de 50 mL, perfazendo-se o volume com água desionizada (Milli-Q).

Todas as amostras foram acidificadas, pela adição de 2 mL de HNO₃ concentrado (*Panreac* – 65%) a 10 mL das mesmas, prevenindo a precipitação dos metais em solução, e reservadas em frascos de plástico devidamente identificados.

As leituras do zinco e da prata das soluções em bruto ou diluídas, foram feitas no espectrofotômetro de absorção atômica de chama de acetileno/ar (*Analytik Jena - ZEEnit 700*).

2.4 Filtrações e Testes microbiológicos

Os testes ao poder biocida dos filtros de celulose impregnados com nanopartículas de Ag, ZnO e com a mistura Ag+ZnO, foram levados a cabo nos laboratórios Serviços Municipalizados de Água e Saneamento em Miratejo.

O material utilizado (copos para contacto, frascos para amostra e copos de filtração e rampa) foram previamente esterilizados, evitando contaminações cruzadas. O procedimento baseou-se, primeiramente, na preparação da solução de peptona salina. Para este efeito, ressuspendeu-se cinco lentículas de *E.coli* (*Escherichia coli* NCTC 9001) em 400 mL de peptona salina, com agitação vigorosa, até se observar o desaparecimento das lentículas na mesma. Do volume preparado, 300 mL destinaram-se às filtrações, feitas em triplicado, tendo-se utilizado 100 mL para cada filtro. Os restantes 100 mL destinaram-se ao controlo positivo.

Para aumentar o tempo de contato, foram utilizadas estruturas com filtros empilhados, alternando filtros virgens e filtros impregnados com nanopartículas. Dois tipos de estruturas foram testados: uma estrutura com um filtro impregnado entre dois virgens e uma estrutura de cinco filtros, com três filtros virgens e dois impregandos, ocupando os virgens as posições mais externas e a central (Figura 4). Estas pilhas foram passadas a ferro, ficando mais lisas e compactas, de modo a prevenir a formação de bolhas de ar entre os filtros e a facilitar a filtração.

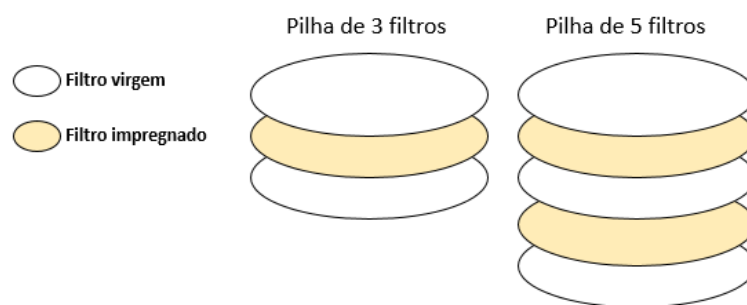


Figura 4 Imagem ilustrativa das pilhas de três e cinco filtros utilizadas nos ensaios. A cor atribuída aos filtros impregnados com nanopartículas é meramente ilustrativa.

Os filtros foram colocados nos dispositivos de filtração e 100 mL de peptona salina contaminada com *E.coli* foram filtrados e cronometrou-se o processo. Após a filtração, procedeu-se à filtração na rampa de 100 mL de peptona salina (sem contaminação) para o ensaio em branco, 100 mL de amostra contaminada para o ensaio positivo de referência (controlo positivo) e 100 mL de amostra filtrada, esta última feita em triplicado. Posteriormente, os filtros foram colocados em meio Lauryl, seletivo para coliformes, e incubadas em estufa a 37°C, durante 24 horas, após as quais se fez a contagem de colónias (Figura 5). As contagens foram registadas e comparadas com os valores obtidos nos controlos.



Figura 5 Colónias de *E.coli* crescidas nas membranas de filtração, em meio Lauryl, após o período de incubação de 24h, a 37°C. As amostras foram feitas em triplicado e genericamente designadas por A, B e C.

Capítulo 3

3 Técnicas de caracterização

A caracterização dos filtros impregnados com nanopartículas de óxido de zinco, de prata e os dois tipos de dupla impregnação foi feita por quatro técnicas: microscopia eletrônica de varrimento (SEM), espectroscopia dispersiva de raios X (EDS), difração de raios X (DRX) e espectroscopia de absorção atômica de chama (FAAS). Estas técnicas forneceram informação, qualitativa e quantitativa, essencial para o desenvolvimento e para a interpretação dos resultados do presente trabalho.

3.1 Microscopia eletrônica de varrimento

A microscopia eletrônica de varrimento (*Scanning Electron Microscopy*) é um dos instrumentos mais usados na análise de microestruturas, pela sua versatilidade e por fornecer, não apenas imagens topográficas, como informação quantitativa ao nível estrutural, químico, e das propriedades eletrônicas do material de interesse.[59][60]

Desde a descoberta da deflexão dos elétrons por ação do campo magnético, a microscopia eletrônica de varrimento foi sendo desenvolvida, pela substituição da fonte de luz (microscopia ótica) por feixes de elétrons de alta energia. Os elétrons são produzidos no topo da coluna e aceleradas, passando de seguida por uma combinação de lentes e aberturas para produzir o feixe de elétrons que irá interagir com a amostra. O sistema opera em vácuo. O direcionamento do feixe na amostra é controlado por bobinas que permitem o varrimento da superfície da amostra.[61] Quando o feixe de elétrons contata com a superfície da amostra, este penetra numa profundidade de alguns microns, dependendo da voltagem de aceleração e da densidade da amostra. Da interação do feixe com a amostra resultam elétrons secundários, raios X característicos e elétrons retrodifundidos.[62]

Os elétrons secundários, com energias abaixo dos 50 eV, fornecem informação topográfica, sendo essenciais para a formação da imagem.[61] Por sua vez, os elétrons retrodifundidos são dispersados em ângulos superiores a 90°, possuem maior energia e fornecem informação sobre a composição da amostra: elementos de maior massa atômica apresentam maior contraste.[63] Estes sinais são recolhidos por um ou mais detectores, resultando na formação da imagem. A resolução de uma imagem SEM depende de vários fatores, nomeadamente do tamanho do *spot* eletrónico e do volume de interação do feixe com a amostra.[64]

Embora não seja possível fornecer imagens à resolução atômica, alguns dispositivos conseguem alcançar resoluções de 1 nm ou menos. Tipicamente, os dispositivos mais modernos alcançam resoluções de 1 a 20 nm.[65]

No presente trabalho, a microscopia eletrônica de varrimento foi utilizada com o objetivo de visualizar as nanopartículas impregnadas nos filtros de café, tendo-se obtido informação sobre a qualidade de impregnação (da cobertura das fibras do papel), a distribuição e o formato das nanopartículas e foi possível, nalguns casos, determinar a dimensão das mesmas.

Utilizou-se um pequeno pedaço de cada um dos filtros de café impregnados com as diferentes nanopartículas (óxido de zinco, prata e duplas impregnações: óxido de zinco seguida de prata e prata seguida de óxido de zinco) em estudo, que foram colocados nos *stubs* sobre uma película de carbono. O microscópio utilizado (*Carl Zeiss AURIGA Crossbeam SEM-FIB*), é apresentado na Figura 6. Para a obtenção das imagens utilizou-se a tensão de aceleração de 2 kV, a abertura de diafragma de 30 μm e 5,7 mm de distância entre a amostra e a coluna.



Figura 6 Equipamento utilizado em microscopia eletrônica de varrimento (*Carl Zeiss AURIGA Crossbeam SEM-FIB*).

3.2 Espectroscopia dispersiva de raios X

A espectroscopia dispersiva de raios X (*Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*) é uma técnica analítica que pode estar acoplada a técnicas de microscopia, como a eletrônica de varrimento (SEM) e a eletrônica de transmissão (TEM), permitindo a análise elementar à escala nanométrica. Tal deve-se à interação do feixe de elétrons com a amostra, produzindo raios X característicos dos elementos constituintes da mesma.[66]

A análise por EDS permite determinar a constituição elementar de pontos individuais da amostra e fazer o mapeamento da distribuição dos elementos. Fornece informação quantitativa em amostras que sejam planas, polidas ou homogêneas.[67]

No presente trabalho, a EDS acoplada ao SEM foi utilizada com o objectivo de confirmar e quantificar a presença dos elementos constituintes das nanopartículas sintetizadas: zinco e oxigénio, das nanopartículas de óxido de zinco, e prata. Para os casos de dupla impregnação, a informação quantitativa sobre o teor dos referidos elementos, permitiu também inferir sobre possíveis perdas de um dos tipos de nanopartículas com o segundo processo de síntese.[68] No presente trabalho, a análise por EDS foi realizada com recurso ao *software* AztecEnergy.

3.3 Difração de raios X

A difração de raios X (*X-ray Diffraction*) é uma técnica poderosa para a caracterização de material cristalino. Trata-se de uma técnica não destrutiva, que fornece informação sobre a estrutura, as fases, a orientação dos cristais, isto é, a sua textura, bem como sobre a qualidade dos cristais.[69][70]

O efeito dominante que ocorre quando um raio incidente de raios X monocromáticos interagem com o material alvo é a dispersão dos mesmos pelos átomos constituintes do material, sofrendo interferência construtiva ou destrutiva. A difração de raios X é explicada pela lei de Bragg, descrita por William Lawrence Bragg em inícios do séculos XX, e demonstra que um conjunto de planos paralelos, com coordenadas hkl e um espaçamento interplanar d_{hkl} produz um feixe difratado quando raios X de comprimento de onda λ colidem com os planos num ângulo θ e são refletidos nesse mesmo ângulo, se e só se θ assumir um valor tal que:

$$2d_{hkl} \sin \theta = n\lambda \text{ Equação 5}$$

O tamanho e a forma da célula unitária do material determina as direções das possíveis difrações e a intensidade das ondas difratadas, por sua vez, depende do tipo e do arranjo dos átomos do cristal. Os materiais não cristalinos frequentemente possuem pequenas cristalites na sua composição, com várias orientações possíveis, e por isso são denominadas agregados policristalinos ou pós. Quando este tipo de material é exposto a um feixe de raios X, este cerá todos os planos interatômicos possíveis. Os picos de difração podem detetados pela mudança sistemática do ângulo utilizado para a incidência.[70][71][72][73] O padrão de difração é, portanto, o *fingerpint* dos arranjos atômicos periódicos no material em estudo.[69]

O tamanho da cristalite pode ser calculado pela equação de Scherrer, dada por:

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta} \text{ Equação 6}$$

em que K é a constante geométrica de Scherrer, λ é o comprimento de onda da radiação, θ é o ângulo de difração, β é a largura a meia altura da reflexão, em radianos.[53][74][73]

A simplicidade, rapidez e a fiabilidade dos resultados são algumas das vantagens desta técnica. Ela permite caracterizar materiais compostos por misturas de fase e quantificar as fases.[73]

A análise das amostras por difração de raios X não exigiu preparação prévia das amostras e, não sendo destrutiva, estas foram conservadas, podendo ser reutilizadas. O equipamento utilizado é mostrado pela Figura 7 (*PANalytical X'pert Pro*) e obtiveram-se difratogramas nas seguintes condições: intensidade da radiação à linha $K\alpha$ do cobre de $1,5406\text{\AA}$, 2θ no intervalo de 10 a 80° e as intensidades registadas em intervalos de $0,03^\circ$.



Figura 7 Equipamento utilizado na difração de raios X (*PANalytical X'pert Pro*).

3.4 Espectroscopia de absorção atômica de chama

A espectroscopia de absorção atômica, AAS (*Atomic Absorption Spectroscopy*) é uma técnica que permite quantificar elementos químicos presentes em amostras, de acordo com a radiação absorvida pelos elementos de interesse.[75]

A AAS requer uma fonte de luz, uma fonte de átomos, um monocromador, um detetor e dispositivos eletrônicos capazes de processar os dados e de apresentar os resultados. Esta técnica mede a quantidade de luz, sob a forma de fótons, que é absorvida pela amostra e que faz com que passem para o estado excitado. A relação entre a quantidade de luz absorvida e a concentração de

analitos em padrões conhecidos pode ser usada para determinar concentrações desconhecidas em amostras, pela quantificação da luz absorvida.[76][77][78]

Na espectroscopia de absorção atômica de chama FAAS (*Flame Atomic Absorption Spectroscopy*), a fonte de luz para a produção de átomos livres é o calor, geralmente proveniente de chama de ar/acetileno ou óxido nítrico/acetileno. O sistema de introdução da amostra consiste numa câmara de *spray* e num nebulizador, sendo esta introduzida sob a forma de aerossol.[79][76]

O detetor mede os comprimentos de onda de luz transmitidos pela amostra, comparando-os com os que originalmente passaram pela amostra. O processador de sinal integra as mudanças nos comprimentos de onda absorvidos, observáveis nos picos de absorção de energia em comprimentos de onda discretos.[78]

No presente trabalho, a FAAS foi utilizada com o objetivo de quantificar a prata e o zinco (proveniente do óxido de zinco), inferindo sobre a quantidade de nanopartículas que se formaram no processo de síntese de nanopartículas, tanto os iões que efetivamente foram impregnados nos filtros de celulose como os que foram *desperdiçados*, permanecendo nas soluções de síntese, e os que se soltaram com a lavagem dos mesmos, de acordo com o procedimento anteriormente exposto. O equipamento utilizado é apresentado na Figura 8.



Figura 8 Equipamento utilizado na espectroscopia de absorção atômica de chama de acetileno/ar (*Analytik Jena - Zeenit 700*).

Capítulo 4

4 Apresentação e Discussão de Resultados

Neste capítulo, são apresentados e discutidos os resultados obtidos no decorrer da atividade experimental.

Feito o procedimento de impregnação de nanopartículas de óxido de zinco e de prata nos filtros de café Home7 n.º4, foi necessário averiguar a eficiência da síntese e a qualidade da incorporação das NPs nas fibras de celulose. Após a confirmação de que os filtros estavam, efetivamente, cobertos com as nanopartículas sintetizadas, foi possível dar continuidade ao trabalho experimental, tendo-se passado à fase dos testes. Estes consistiram na aplicação dos filtros preparados, em estruturas de três e de cinco filtros, compostas pelos referidos filtros intercalados com filtros virgens, isto é, sem qualquer tratamento químico prévio. As estruturas foram cuidadosamente passadas a ferro, de modo a evitar a formação de bolhas de ar no seu interior e de maximizar o contato entre os filtros. A filtração foi cronometrada e calculou-se a velocidade da passagem da solução contaminada por cada tipo de estrutura. Os testes microbiológicos basearam-se na utilização da solução filtrada na técnica de filtração de membrana, com incubação das membranas no período de 24 h, a 37 °C (temperatura ótima de crescimento da *E.coli*) em meio Lauryl. Seguiu-se a contagem das colónias de *E.coli*, que forneceram informação sobre o efeito antibacteriano dos filtros preparados.

4.1 Filtros de celulose impregnados com nanopartículas de óxido de zinco

A Figura 9 representa o resultado da impregnação do filtro de café com nanopartículas de óxido de zinco. Após a impregnação das nanopartículas de óxido de zinco, pela síntese *in situ* descrita em 2.2.1. O papel adquire uma coloração mais esbranquiçada do que a observada nos filtros virgens.

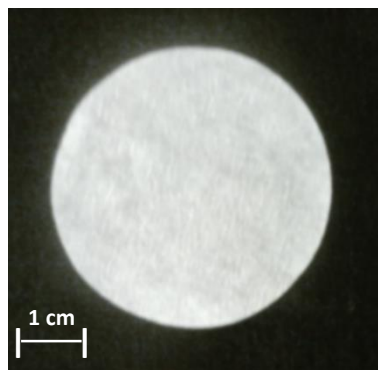


Figura 9 Filtro de celulose impregnado com nanopartículas de óxido de zinco (ZnO NPs).

4.1.1 Microscopia eletrônica de varrimento

A figura 10, obtida por SEM, permite a visualização do resultado da impregnação de nanopartículas de óxido de zinco no filtro de café Home7 nº4. Utilizou-se uma pequena porção do filtro impregnado com nanopartículas de ZnO.

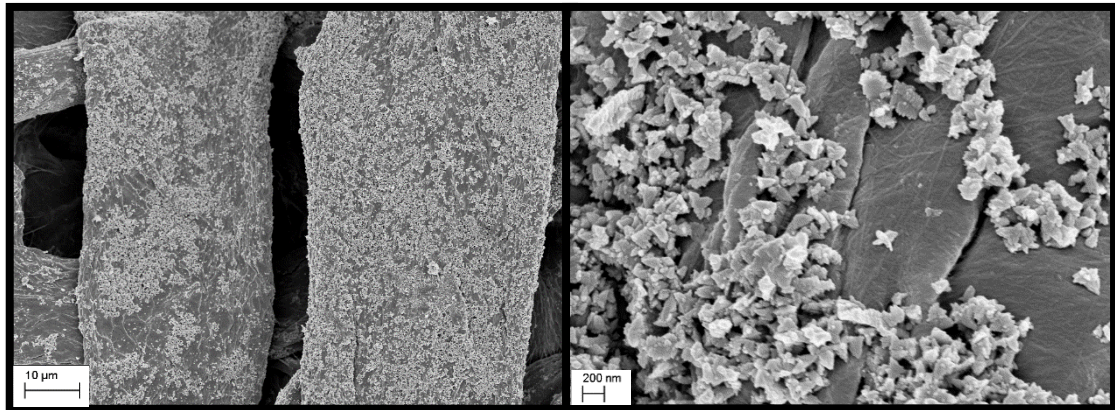


Figura 10 Filtro impregnado com nanopartículas de óxido de zinco, analisado por microscopia eletrônica de varrimento.

As imagens de SEM da amostra de filtro de papel impregnado com nanopartículas de óxido de zinco indicam uma boa cobertura das fibras de celulose com nanopartículas de óxido de zinco, com distribuição homogênea, podendo-se considerar eficiente o processo de impregnação. Observa-se que estas possuem o formato de flor, o que vai de encontro com Jaber-Laânab[55] para a síntese de nanopartículas de óxido de zinco à temperatura de 20 °C. No presente trabalho, as sínteses de nanopartículas de óxido de zinco foram realizadas à temperatura ambiente do laboratório, próximas dos 20 °C, como referido em 2.2.1. A dimensão das nanopartículas de óxido de zinco não pôde ser determinada, devido ao formato irregular das mesmas.

4.1.2 Espectroscopia dispersiva de raios-X

A análise por EDS permitiu identificar e quantificar os elementos presentes na amostra. Estando acoplada ao SEM, os resultados apresentados (Figura 11) correspondem à mesma amostra utilizada em 4.1.1.

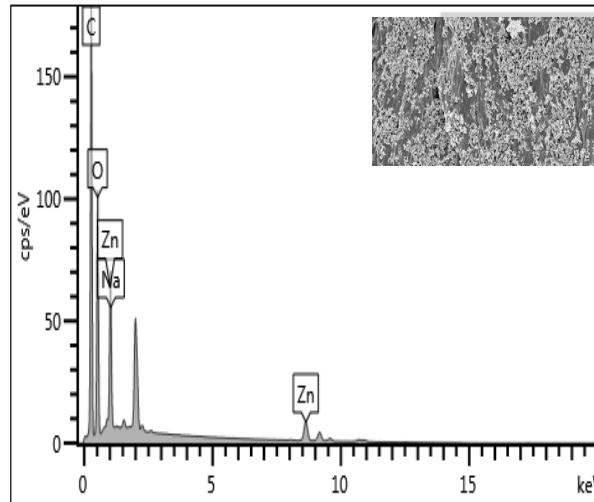


Figura 11 Análise por espectroscopia dispersiva de raios X do filtro de café impregnado com nanopartículas de óxido de zinco.

Por espectroscopia dispersiva de raios-X foi possível determinar a constituição atômica das amostras. Verificou-se a presença de carbono, com um pico correspondente a $E=0,28$ keV, e do oxigênio, aos $E=0,53$ keV, ambos constituintes do substrato de celulose, sendo este último também proveniente do óxido de zinco. Confirmou-se a presença de zinco, tendo-se obtido dois picos, a $E= 1,01$ keV e $E=8,63$ keV. Observou-se também a presença de sódio, cujo pico aparece sobreposto ao pico de zinco, a $E=1,04$ keV. .

O objetivo da utilização da técnica foi identificar os elementos constituintes da amostra, neste caso do filtro de celulose impregnado com nanopartículas de óxido de zinco, tendo-se efetivamente obtido os picos correspondentes aos elementos químicos constituintes da celulose (carbono e oxigênio) e das nanopartículas de óxido de zinco (oxigênio e zinco). Tendo em conta tratar-se de um composto, e a espectroscopia dispersiva de raios X apenas identificar os elementos químicos de forma individual, a confirmação da existência de óxido de zinco foi feita com recurso à difração de raios X. Através desta última, confirmou-se a sua presença, através dos picos característicos observados no difratograma.

4.1.3 Difração de raios X

A difração de raios X foi utilizada no presente trabalho para a caracterização dos filtros impregnados com nanopartículas e foi crucial para a determinação da presença de óxido de zinco. Apesar de se ter confirmado a existência de nanopartículas à superfície dos filtros de café, de zinco e oxigênio na mesma amostra, as técnicas anteriormente referidas não permitiram identificar o óxido de zinco. Pela difração de raios X, a confirmação pôde ser feita, através dos picos característicos do composto, como se pode observar na Figura 12.

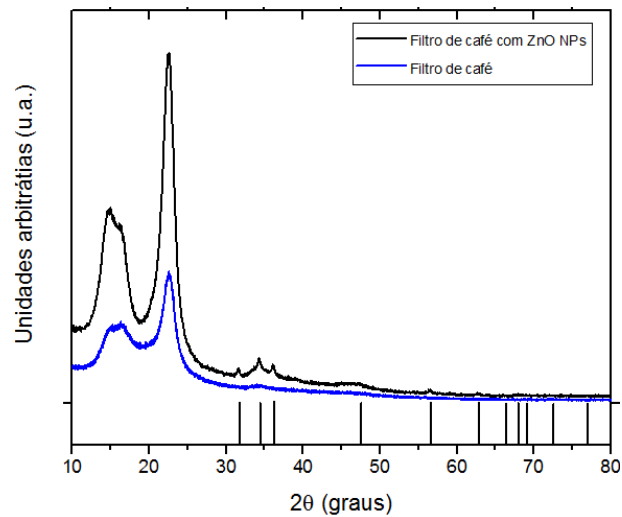


Figura 12 Difratograma de raios X do filtro impregnado com nanopartículas de óxido de zinco. As linhas verticais correspondem à estrutura *wurzite* de ZnO de acordo com a ficha ICDD 00-036-1451.

Pela análise do difratograma, é possível confirmar a presença de óxido de zinco na amostra. Observam-se picos intensos e bem definidos que correspondem à celulose, o substrato da impregnação das nanopartículas. As linhas verticais a preto referem-se aos picos previstos para o óxido de zinco, sendo que na amostra em estudo alguns picos não puderam ser observados, devido a baixa intensidade. É de salientar que a intensidade dos picos é proporcional à concentração dos compostos na amostra. No entanto, é possível observar os picos nos ângulos 2θ de $31,77^\circ$; $34,42^\circ$; $36,25^\circ$; $47,53^\circ$; $56,60^\circ$ e $62,86^\circ$ correspondentes aos planos (100), (002), (101), (102), (110) e (103) respetivamente, de acordo com a ficha de referência da wurtzite hexagonal do óxido de zinco, com o código 00-036-1451. Relativamente aos três primeiros picos, são os mais intensos e bem definidos do conjunto; ainda assim, a otimização do protocolo utilizado para a impregnação das nanopartículas poderá resultar numa maior concentração de nanopartículas de óxido de zinco e, conseqüentemente, em picos mais definidos e de maior intensidade.

Pela equação de Scherrer,

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta}$$

em que $K= 0,9$, $\lambda = 0,15418\text{\AA}$, o ângulo utilizado foi $2\theta = 34,42^\circ$ (correspondente ao pico de maior intensidade), calculou-se o tamanho da cristalite, tendo-se obtido o valor de 15,29 nm, que não é consistente com o valor esperado. Segundo Jaber-Laânab, as nanopartículas sintetizadas a temperaturas próximas dos 20°C apresentam um tamanho médio de cristalite de 28 nm.[55] Vários fatores poderão estar na origem da diferença de valores. Uma delas é o fato de os picos do difratograma serem de baixa intensidade e pouco definidos. Por outro lado, o tamanho da cristalite é uma medida de domínios difratados coerentemente e é igual ao do grão se este for uma cristalite perfeita. A difração de raios X fornece informação do tamanho da cristalite presente no grão, enquanto a microscopia eletrônica de varrimento fornece informação sobre o tamanho da partícula.[80][81] Tendo em consideração o fato de um grão conter várias cristalites, o resultado obtido pela equação de Scherrer não é necessariamente coincidente com a dimensão das nanopartículas.

4.2 Filtros de celulose impregnados com nanopartículas de prata

A Figura 13 representa o resultado da impregnação do filtro de café com nanopartículas de prata. Observa-se a alteração de cor do filtro, passando a uma tonalidade acastanhada.

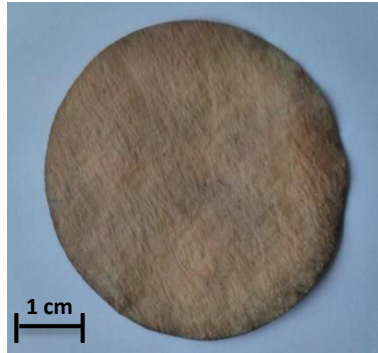


Figura 13 Filtro de celulose impregnado com nanopartículas de prata (Ag NPs).

4.2.1 Microscopia eletrônica de varrimento

A Figura 14 representa os resultados obtidas por microscopia eletrônica de varrimento dos filtros de café impregnados com nanopartículas de prata.

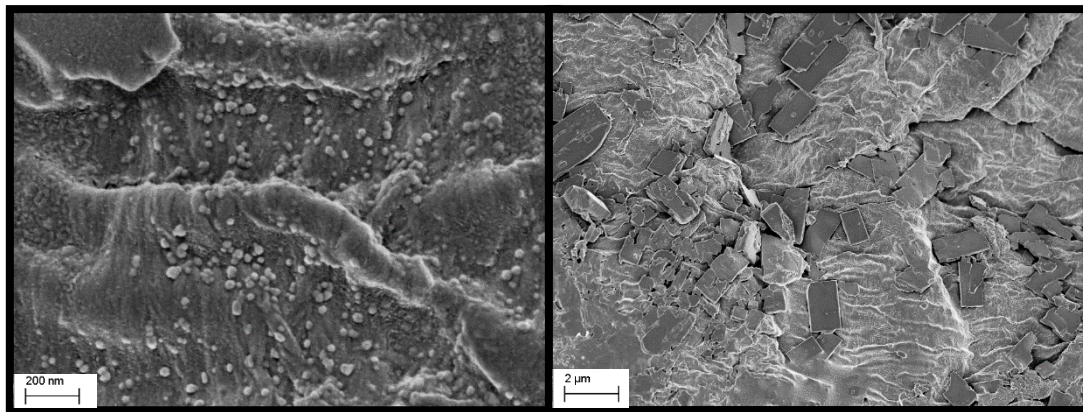


Figura 14 Imagens SEM dos filtros de celulose impregnados com nanopartículas de prata. À esquerda, as nanopartículas; à direita, aglomerados das nanopartículas de prata.

Observa-se a eficiência do procedimento de impregnação de nanopartículas de prata. A distribuição é homogênea. A imagem à esquerda permite visualizar a distribuição das mesmas no filtro e a da direita, o resultado da aglomeração das nanopartículas, formando estruturas que se assemelham a blocos retangulares. Estas nanopartículas apresentam dimensões variáveis, entre os 30 nm e os 60 nm de diâmetro. Os aglomerados, por sua vez, apresentam o formato retangular e as dimensões estão na ordem dos micrômetros, com uma área média de, aproximadamente, $2,3 \mu\text{m}^2$. De acordo com o estudo

realizado por Rai e Gade[30], as partículas com dimensão inferior a 10 nm são mais efetivas enquanto agentes antimicrobianos. No entanto, tal não invalida a possibilidade de se obter resultados favoráveis com a utilização de nanopartículas com dimensões acima dos 10 nm. E, segundo com Li-Lenhardt[25], a agregação deve ser evitada. Segundo estes autores, a nanopartículas dispersas são mais efetivas enquanto antimicrobianos, havendo nestes casos maior libertação de iões e tempo de contato efetivo com os microrganismos. No entanto, a síntese utilizada não permitiu o controlo da dimensão e dispersão das nanopartículas. As condições da síntese favoreceram o aparecimento de partículas de maiores dimensões, pois as temperaturas elevadas promovem a agregação das nanopartículas metálicas.[57]

4.2.1 Espectroscopia dispersiva de raios X

A técnica de espectroscopia dispersiva de raios X permitiu a análise elementar da amostra de filtro de café impregnado com nanopartículas de prata, apresentada na Figura15.

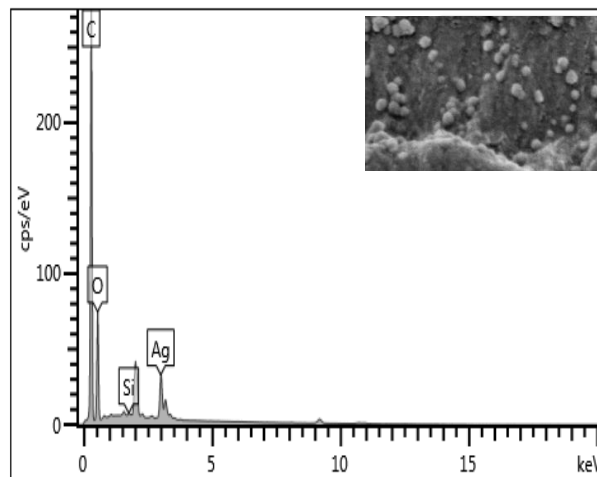


Figura 15 Análise por espectroscopia dispersiva de raios X do filtro de café impregnado com Ag NPs.

Pela análise por espectroscopia dispersiva de raios X, foi possível confirmar a presença de prata (com um pico a $E= 2,98$ keV), proveniente das nanopartículas de prata impregnadas no substrato de celulose. Observam-se os picos de carbono ($E= 0,28$ keV) e de oxigénio ($E= 0,53$ keV), constituintes da celulose.

Tendo em conta que a intensidade dos picos é proporcional à concentração dos elementos na amostra e comparando os resultados obtidos por EDS da prata e os do óxido de zinco, é possível explicar a diferença de intensidade dos picos de oxigénio observados: no caso do óxido de zinco, o oxigénio é proveniente tanto do substrato de celulose como das nanopartículas, neste caso, é proveniente exclusivamente do substrato.

4.2.2 Difração de raios X

Na Figura 16 encontra-se a representação da difração de raios X dos filtros de café impregnados com nanopartículas de prata.

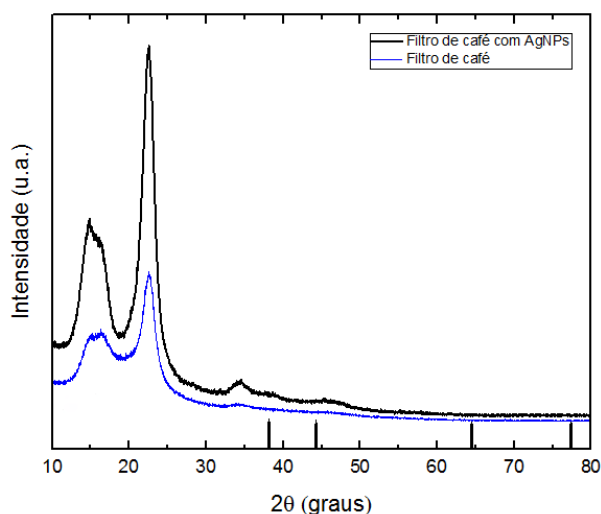


Figura 16 Difratograma do filtro impregnado com Ag NPs. As linhas verticais correspondem à estrutura cúbica da prata de acordo com a ficha ICDD 00-004-0783.

Através da difração de raios-x, é possível observar a presença dos picos característicos do substrato de celulose, intensos e bem definidos, nos ângulos 2θ $15,5^\circ$ e $23,49^\circ$. Relativamente à prata, seria expectável a obtenção de picos nos ângulos 2θ $38,12^\circ$; $44,30^\circ$; $64,45^\circ$ e $77,40^\circ$, assinalados no difratograma com riscas verticais a preto, referentes aos planos (111), (002), (022) e (113) respetivamente, de acordo com a ficha cristalográfica de referência da prata cúbica de código 00-004-0783. No entanto, não se verificam os sinais correspondentes à prata. Tal fato deve-se à resolução insuficiente do equipamento, não sendo possível visualizar os picos da prata. A presença de prata foi, neste caso, confirmada pela análise por EDS.

A cristalinidade das mesmas é, igualmente, uma questão a ter em conta; tratando-se de estruturas policristalinas, a orientação das nanopartículas no plano de difração é muito variável, o que leva a que o sinal apresente uma intensidade inferior à apresentada por partículas monocristalinas.

Na impossibilidade de observação dos picos correspondentes à prata, não é possível determinar a dimensão das nanopartículas pela fórmula de Debye–Scherer.

Reunida a informação obtida pelas três técnicas, confirma-se a presença de nanopartículas (por SEM) de prata (por EDS) e de óxido de zinco (por DRX).

4.3 Filtros de celulose impregnados com nanopartículas de prata e de óxido de zinco (Ag+ZnO)

A Figura 17 representa o resultado da impregnação do filtro de café com nanopartículas de prata e de óxido de zinco. O filtro apresenta uma cor acastanhada, semelhante à observada após a síntese de nanopartículas de prata.

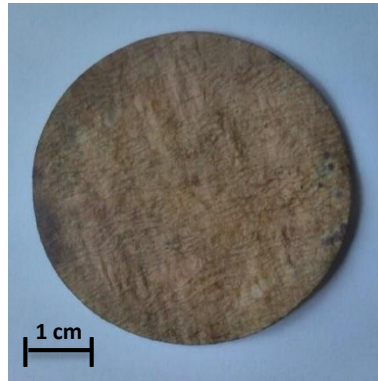


Figura 17 Filtro de celulose impregnado com nanopartículas de prata e de óxido de zinco (Ag+ZnO).

4.3.1 Microscopia eletrônica de varrimento

Os filtros impregnados com nanopartículas de prata e, posteriormente, com nanopartículas de óxido de zinco foram analisados morfologicamente, por microscopia eletrônica de varrimento, cujas imagens são apresentadas na Figura 18.

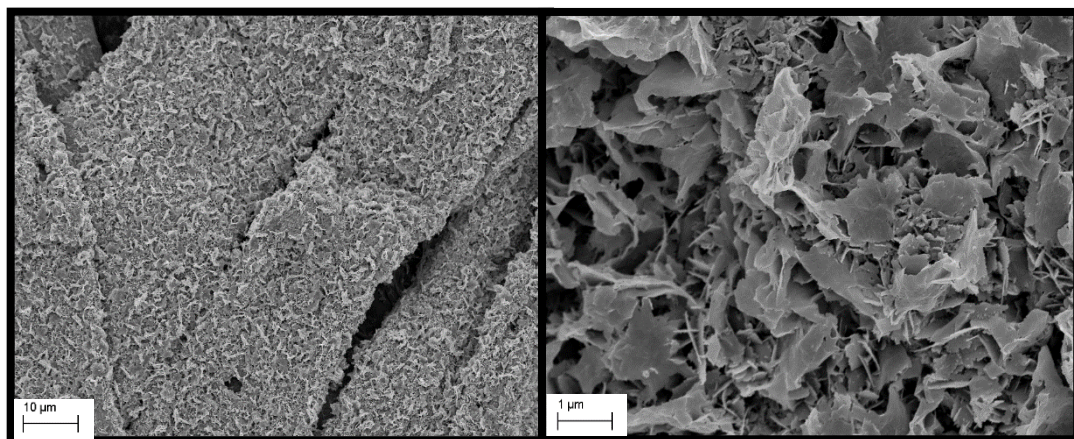


Figura 18 Imagens SEM dos filtros de celulose impregnados com nanopartículas de prata e de óxido de zinco – dupla impregnação designada por Ag+ZnO.

Observa-se uma cobertura completa da superfície do filtro de celulose com nanopartículas, que apresentam uma estrutura em flor, semelhante à observada na impregnação com nanopartículas de

óxido de zinco. A cobertura, neste caso, é muito mais completa do que no filtro com nanopartículas de óxido de zinco. Tendo em conta que a impregnação destas foi feita após a das de prata e observando o formato das nanopartículas, conclui-se que a concentração de ZnO NPs é muito superior à das Ag NPs, fato que pode ser confirmado pelas técnicas de caracterização nos pontos seguintes.

A cobertura completa, ou seja, a proximidade das nanopartículas, e o facto de se tratar de nanopartículas de prata e de óxido de zinco, impede que se possa obter informação sobre a sua dimensão através da imagem SEM. No entanto, tratando-se em ambos os casos do mesmo processo utilizado nos filtros com um único tipo de nanopartículas, como descrito em 2.1.1 e 2.1.2, não se prevê que haja alteração no tamanho médio das mesmas.

4.3.2 Espectroscopia dispersiva de raios-X

A Figura 19 representa a análise dos filtros duplamente impregnados, primeiro com nanopartículas de prata seguidas das de óxido de zinco, permitindo confirmar a presença dos elementos químicos que compõem a amostras .

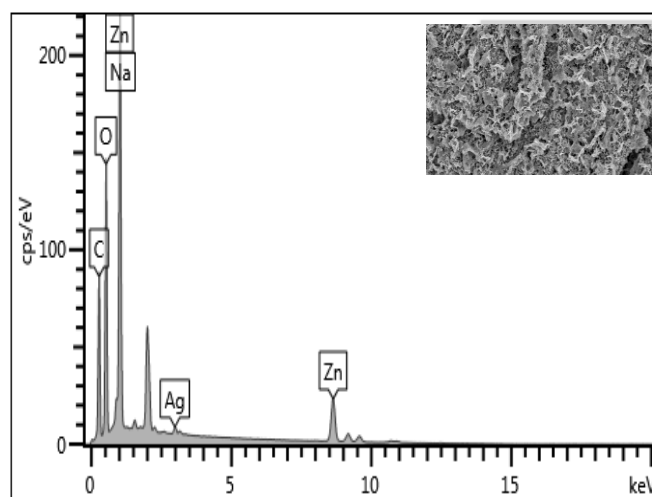


Figura 19 Análise por espectroscopia dispersiva de raios X do filtro de café impregnado nanopartículas de prata e de óxido de zinco (Ag+ZnO).

Pela análise por espectroscopia dispersiva de raios X da amostra do filtro de celulose duplamente impregnado, com nanopartículas de prata seguidas de nanopartículas de óxido de zinco, verificou-se a presença dos picos de carbono ($E= 0,28$ keV), oxigénio ($E= 0,53$ keV), zinco ($E= 1,01$ e $E= 8,63$ keV), sódio sobreponente ao zinco ($E= 1,04$ keV) e prata ($E= 2,98$ keV). A intensidade do pico do carbono, claramente inferior quando comparado com os resultados dos filtros impregnados com apenas um dos tipos de nanopartículas, é explicada pela cobertura quase completa da superfície do filtro, como discutido em 4.3.1. Os picos de oxigénio e de zinco são mais intensos do que nos filtros impregnados com nanopartículas de óxido de zinco, o que indica este procedimento resulta numa melhor

impregnação de nanopartículas de óxido de zinco. A prata, por sua vez, apresenta um pico de menor intensidade, indicando uma concentração baixa destas nanopartículas.

4.3.3 Difração de raios-X

A Figura 20 corresponde ao difratograma de uma amostra dos filtros impregnados com nanopartículas de prata e de óxido de zinco, pela ordem de menção.

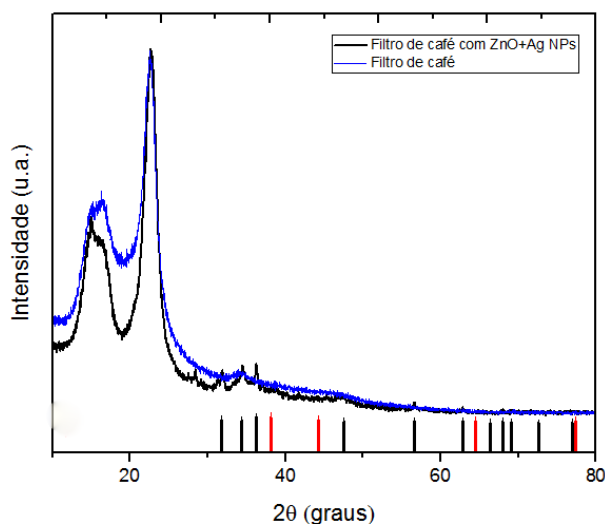


Figura 20 Difratograma de raios X do filtro impregnado com Ag NPs e ZnO NPs. As linhas verticais a preto correspondem à estrutura *wurtzite* do óxido de zinco de acordo com a ficha ICDD 00-036-1451 e as linhas a vermelho, à estrutura cúbica da prata, segundo a ficha ICDD 00-004-0783.

O difratograma permite observar os picos da celulose, para 2θ $15,5^\circ$ e $23,49^\circ$, sendo esta o substrato em que foram impregnadas primeiramente as nanopartículas de prata e, posteriormente, as de óxido de zinco. Confirma-se a presença de óxido de zinco, apresentando os picos mais intensos e bem definidos quando comparados com os demais filtros em que se procedeu à impregnação destas nanopartículas. Além dos picos nos ângulos 2θ de $31,77^\circ$, $34,42^\circ$, $36,25^\circ$, $47,53^\circ$, $56,60^\circ$ e $62,86^\circ$ correspondentes aos planos (100), (002), (101), (110), (102) e (103) já observados, é possível visualizar, ainda que com menor intensidade, os picos a 2θ $67,96^\circ$, plano (112) e $69,1^\circ$, plano (201), de acordo com a ficha de referência com o código 00-036-1451.

No que concerne à prata, os ângulos para os quais se esperaria obter picos (segundo a ficha de referência da prata cúbica), no difratograma assinalados a vermelho, não forneceram sinais observáveis (à semelhança do ponto 4.2.2). A presença de nanopartículas de prata, neste caso, foi confirmada por Espectroscopia Dispersiva de Raios-X.

O tamanho da cristalite foi calculado pela equação de Scherrer, tendo-se mais uma vez obtido um valor muito abaixo do esperado, tendo em conta a literatura. Neste caso, além do que foi discutido em 4.1.3, coloca-se a situação de sobreposição de sinais relativamente à celulose, como pode ser observado no difratograma.

4.4 Filtros de celulose impregnados com nanopartículas de óxido de zinco e de prata (ZnO+Ag)

A figura 21 representa o resultado da impregnação do filtro de café com nanopartículas de óxido de zinco. A cor observada resulta da impregnação das nanopartículas de prata.



Figura 21 Filtro de celulose impregnado com nanopartículas de óxido de zinco e de prata (ZnO+Ag).

4.4.1 Microscopia eletrônica de varrimento

Por microscopia eletrônica de varrimento, cujas imagens são apresentadas na Figura 22, foi possível analisar morfológicamente e avaliar a qualidade da impregnação dupla, de nanopartículas de óxido de zinco e, de seguida, de nanopartículas de prata (ZnO+Ag).

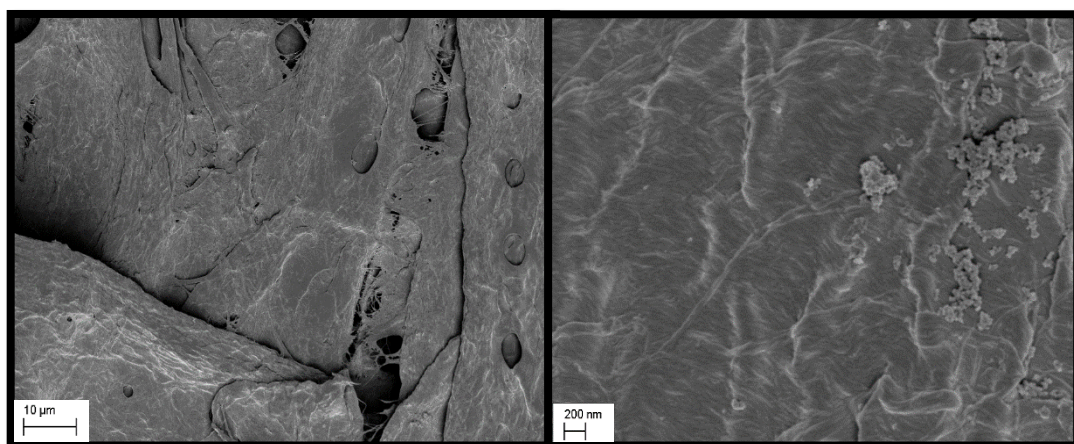


Figura 22 Imagens SEM dos filtros de celulose impregnados com ZnONPs e AgNPs – dupla impregnação designada por ZnO+Ag.

Observa-se pouca cobertura das fibras de celulose. A distribuição das nanopartículas não é homogênea, observando-se alguns aglomerados em determinadas zonas do papel e outras, completamente despidas. A eficiência do procedimento de impregnação de nanopartículas de óxido de zinco seguida de nanopartículas de prata é baixa, o que se deve ao fato de a síntese de nanopartículas de prata requerer temperatura e agitação elevadas (banho de óleo a 100 °C e agitação de 1100 rpm).

É de salientar que a síntese das ZnO NPs é feita à temperatura ambiente, a 450 rpm. As nanopartículas de óxido de zinco previamente impregnadas terão impedido o acesso das nanopartículas de prata ao filtro e, simultaneamente, as condições anteriormente referidas terão feito com que as primeiras se soltassem do filtro. A perda de óxido de zinco pôde ser avaliada por espectroscopia de absorção atômica de chama, através da quantificação de Zn^{2+} na solução de síntese e águas de lavagem do segundo processo de síntese (de Ag NPs).

4.4.2 Espectroscopia dispersiva de raios-X

Na Figura 23 é apresentado o resultado da análise dos filtros com dupla impregnação, ZnO+Ag.

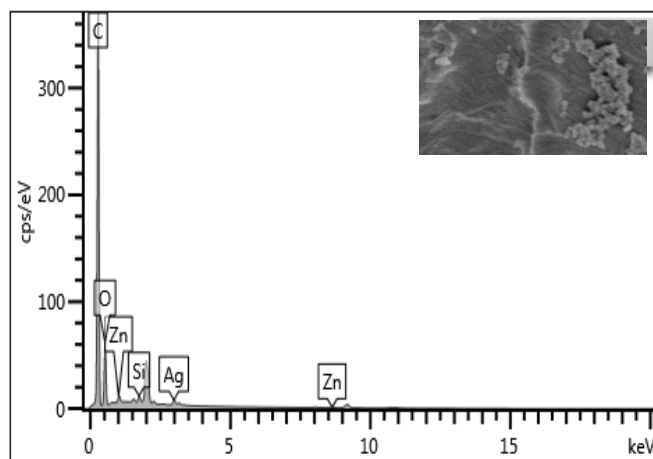


Figura 23 Análise por espectroscopia dispersiva de raios X do filtro de café impregnado com nanopartículas de óxido de zinco e de prata (ZnO+Ag). As linhas verticais a preto correspondem à estrutura wurtzite do óxido de zinco de acordo com a ficha ICDD 00-036-1451 e as linhas a vermelho, à estrutura cúbica da prata de acordo com a ficha ICDD 00-004-0783.

Pela análise por EDS, foi possível confirmar que o processo de impregnação foi pouco eficaz. Apesar de se observar a presença de prata ($E= 2,93$ keV), zinco ($E= 1,01$ e $E= 8,64$ keV), oxigênio ($E= 0,52$ keV) e carbono ($E= 0,28$ keV), à exceção do último, os picos são de baixa intensidade, proporcionais à concentração dos elementos na amostra. O carbono é o único elemento a apresentar um pico de elevada intensidade, devendo-se à má cobertura do substrato de celulose. Estes dados vão de encontro ao observado nas imagens SEM.

4.4.3 Difração de raios-X

A caracterização estrutural dos filtros impregnados com nanopartículas de óxido de zinco e de prata (ZnO+Ag), por difração de raios X, encontra-se representada na Figura 24.

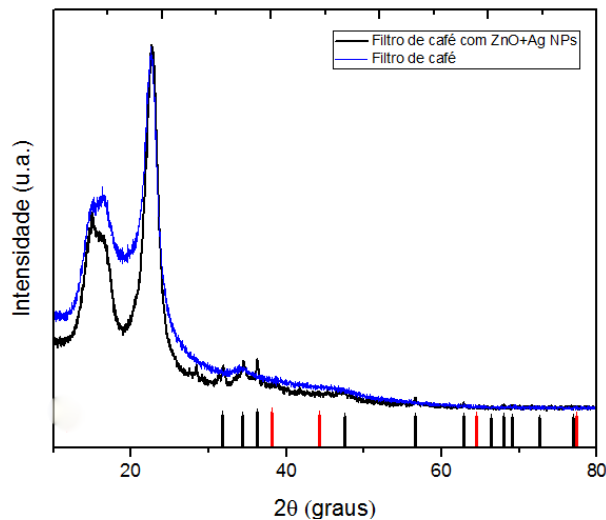


Figura 24 Difratoograma do filtro impregnado com nanopartículas de óxido de zinco seguidas de nanopartículas de prata (ZnO+Ag). As linhas verticais a preto correspondem à estrutura wurtzite do óxido de zinco de acordo com a ficha ICDD 00-036-1451 e as linhas a vermelho, à estrutura cúbica da prata de acordo com a ficha ICDD 00-004-0783.

O difratograma acima permite a observação dos picos característicos do substrato (celulose), bem como picos do óxido de zinco, assinalados com linhas verticais a preto, de acordo com a ficha de referência do óxido de zinco (código 00-036-1451), sob a forma de wurtzite hexagonal. A vermelho, estão assinalados os ângulos para os quais prever-se-iam os picos da prata, segundo a ficha de referência da prata cúbica. No entanto, não foi possível distinguir tais picos, pelos motivos referidos em 4.2.2.

À semelhança do filtro impregnado com nanopartículas de óxido de zinco (exclusivamente), os picos detetados são 2θ de $31,77^\circ$; $34,42^\circ$; $36,25^\circ$; $47,53^\circ$; $56,60^\circ$ e $62,86^\circ$, referentes aos planos (100), (002), (101), (102), (110) e (103), respetivamente.

Feita a caracterização dos filtros ZnO+Ag, optou-se por não prosseguir com os ensaios de filtração, por não haver no filtro uma concentração de nanopartículas que justificasse o procedimento.

4.5 Espectroscopia de absorção atômica de chama

A espectroscopia de absorção atômica de chama foi realizada no Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, visando quantificar o teor dos metais constituintes das nanopartículas utilizadas no presente trabalho, nos filtros impregnados com as mesmas bem como nas respectivas soluções de síntese das nanopartículas e nas águas de lavagem dos filtros.

Após cada impregnação, reservou-se a solução de síntese e águas de lavagem. Portanto, nos casos de dupla impregnação, reservaram-se as soluções de síntese tanto de nanopartículas de óxido de zinco como de prata e respectivas soluções de lavagem. Nestes casos, além do filtro duplamente impregnado, analisaram-se quatro amostras, sendo duas de síntese e duas de lavagem. Além da quantificação dos metais formados no processo de síntese e das perdas provocadas pela lavagem do filtro, foi possível avaliar a perda de nanopartículas previamente impregnadas na segunda síntese e lavagem e, conseqüentemente, a eficiência do procedimento de dupla impregnação.

Para a quantificação das nanopartículas de óxido de zinco e de prata, foram preparados os padrões da prata e do zinco e procedeu-se à leitura das concentrações dos iões Zn^{2+} e Ag^+ . Os resultados apresentados referem-se às soluções acidificadas, preparadas com o objetivo de prevenir a precipitação dos metais em solução, tendo apresentado resultados mais consistentes.

4.5.1 Quantificação de Zn^{2+} e de Ag^+ nos filtros impregnados com nanopartículas de óxido de zinco e de prata

A análise quantitativa de prata e zinco, sob a forma iónica, é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 Concentração de Zn^{2+} e de Ag^+ nos filtros impregnados com nanopartículas de óxido de zinco e de prata: ZnO, Ag, Ag+ZnO e ZnO+Ag.

Filtro	[Zn^{2+}] (g/kg)		[Ag^+] (g/kg)	
	Média	Erro	Média	Erro
ZnO	26	6,0	0,0	0,0
Ag	0,029	0,015	13	1,9
Ag+ZnO	40	12	2,1	1,9
ZnO+Ag	15	8,0	3,6	1,5

Pela análise do teor de zinco nos filtros impregnados com ZnO NPs, Ag NPs, ZnO+Ag NPs e Ag+ZnO NPs, conclui-se que a concentração mais elevada de zinco, que compõe o óxido de zinco que se pretendeu estudar, encontra-se nos filtros com os dois tipos de nanopartículas, tendo-se impregnado Ag NPs e posteriormente ZnO NPs (40g/kg). O fato de ter sido feita uma impregnação de nanopartículas

anterior à do óxido de zinco terá causado alterações na estrutura fibrosa do papel, tendo em conta as condições da primeira síntese (agitação e temperatura elevadas). Tais condições terão provocado o alargamento dos poros[82] fazendo com que o papel ficasse mais suscetível à segunda impregnação, isto é, incorporasse mais nanopartículas comparativamente a um filtro sem tratamento prévio.

Os filtros impregnados exclusivamente com ZnO NPs apresentam o segundo melhor resultado em termos de eficiência da impregnação de ZnO NPs (26g/kg), seguidos dos filtros com dupla impregnação, de ZnO NPs seguida de Ag NPs (15 g/kg). Tendo em conta se ter procedido à síntese de Ag NPs após a síntese de ZnO NPs que, como anteriormente referido, exige elevadas temperaturas, terá havido lixiviação de ZnO NPs com a segunda síntese, razão pela qual se observa um valor baixo quando comparado com os filtros que só foram impregnados com ZnO NPs. Portanto, a dupla impregnação poderá causar a perda de parte das nanopartículas previamente impregnadas. A avaliação da perda de nanopartículas foi feita pela quantificação de Zn^{2+} das soluções de síntese e águas de lavagem de Ag NPs. No que diz respeito aos filtros só com Ag NPs, a concentração de zinco é residual (29 mg/kg), com um erro padrão elevado (15 mg/kg). A presença deste metal deve-se à contaminação das amostras.

Contrariamente ao observado na análise do teor de zinco, a impregnação das Ag NPs é mais eficaz nos filtros que possuem apenas esse tipo de nanopartículas (13g/kg), seguidos dos filtros com dupla impregnação, em que se sintetizaram primeiro as ZnO NPs e de seguida as Ag NPs (3,6 g/kg). Pelas imagens SEM, verificou-se que os filtros impregnados com ZnO NPs apresentam uma boa cobertura, o que terá impedido que as Ag NPs tivessem acesso à superfície do filtro. Por outro lado, a elevada temperatura da síntese das nanopartículas de prata terá causado uma gradual lixiviação das ZnO NPs. Como consequência, a impregnação não foi suficientemente eficaz para nenhum dos tipos de nanopartículas, fato confirmado pelas imagens SEM dos filtros ZnO+Ag. Relativamente aos filtros Ag+ZnO, verificou-se a perda de Ag NPs no processo síntese de ZnO NPs, que requer agitação constante durante uma hora. Como esperado, as filtros com ZnO NPs apenas, não continham prata.

4.5.2 Quantificação de Zn²⁺ nas soluções de síntese e águas de lavagem

A tabela abaixo apresenta os valores obtidos para as concentrações de Zn²⁺ nas soluções de síntese das ZnO NPs e Ag NPs. O erro apresentado refere-se ao erro padrão das medições, feitas em triplicado.

Tabela 2 Concentração de Zn²⁺ nas soluções de síntese das nanopartículas e águas de lavagem dos filtros impregnados e erro padrão associado às medições. Nos casos de dupla impregnação, a designação foi atribuída da seguinte forma: antes dos parênteses, a síntese cujo teor de metais foi quantificado e, entre parênteses, o filtro preparado.

NPs impregnadas	[Zn ²⁺] (mg/L)			
	Solução de Síntese		Águas de Lavagem	
	Média	Erro	Média	Erro
ZnO	1673	21,72	58,13	11,00
Ag	0,039	0,039	0,067	0,055
Ag(Ag+ZnO)	0,494	0,152	0,117	0,003
ZnO(Ag+ZnO)	2883	1231	457,0	341,0
ZnO(ZnO+Ag)	3532	244,2	159,0	32,00
Ag(ZnO+Ag)	20,23	5,202	27,00	20,00

Observa-se que uma elevada dispersão de resultados, mesmo em sínteses semelhantes, como é o caso da síntese de ZnO NPs, na impregnação com apenas este tipo de nanopartículas, quando comparada com a síntese de ZnO NPs, sendo esta a primeira na dupla impregnação ZnO+Ag – designada por ZnO(ZnO+Ag). Tal indica que esta síntese pode apresentar resultados bastante díspares, por não se ter um controlo no que diz respeito ao número de nanopartículas que, efetivamente, fica impregnado no filtro. Neste caso, a quantificação de Zn²⁺, proveniente das ZnO NPs, forneceu os valores médios de 1673 mg/L e 3532 mg/L nas soluções de síntese e de 58,13 mg/L e 159,0 mg/L nas águas de lavagem de ZnO e ZnO(ZnO+Ag), respetivamente, o que corresponde a uma dispersão de 47% nos resultados da síntese e 36% nas águas de lavagem. Por outro lado, observou-se que nos filtros de ZnO a impregnação foi mais eficiente, tendo apresentado o valor de 26 g/kg, contra os 15 g/kg dos filtros de ZnO+Ag, de acordo com a Tabela 1. Há que ter em conta, no entanto, que a caracterização do filtro foi feita após as duas sínteses, pelo que as condições da segunda síntese, neste caso de Ag NPs, terão influenciado os resultados obtidos no filtro. As perdas de nanopartículas nas águas de lavagem apresentaram, frequentemente, valores muito elevados de erro padrão, o que vem reafirmar a baixa precisão do procedimento.

Em todos os casos, foram utilizados triplicados das amostras e, frequentemente, observou-se uma dispersão considerável dos resultados.

Ainda sobre os filtros ZnO+Ag, relativamente à síntese de Ag NPs, verifica-se que há uma certa quantidade de ZnO NPs que se solta do filtro, passando para a solução de síntese de Ag NPs, bem como para a água de lavagem (20,23 mg/L e 27 mg/L, respetivamente). Como anteriormente referido, as condições da síntese de Ag NPs utilizada, isto é, temperatura e agitação elevadas, foram propícias a que as ZnO NPs se soltassem do filtro e passassem, como se pode verificar, para a solução de síntese de Ag NPs, ou se soltassem durante a lavagem com água destilada. No entanto, observou-se um valor superior de ZnO NPs que se soltaram nas águas de lavagem relativamente às que passaram para a solução de síntese. Também existirá a hipótese de as nanopartículas não se terem solto completamente do filtro durante a síntese, o que só terá sucedido durante a lavagem com água destilada. Por outro lado, o erro padrão de 20 mg/L, num valor médio de 27 mg/L evidencia a elevada imprecisão do procedimento.

No que concerne à dupla impregnação Ag+ZnO, em que foi feita a síntese de Ag NPs e posteriormente a de ZnO NPs, pela análise do Zn^{2+} na solução de síntese e na água de lavagem de Ag NPs, encontrou-se uma quantidade residual deste ião, de 0,494 mg/L e 0,117 mg/L respetivamente, o que estará associado a contaminações da amostra. Sabe-se que é comum ao nível laboratorial serem encontradas quantidades residuais de zinco, devido a contaminações.

Relativamente à impregnação de ZnO NPs, de eficiência comprovada, apresentou o valor de 2883,06 mg/L na solução de síntese. Trata-se de um valor elevado, mas abaixo dos 3532 mg/L obtidos na síntese de ZnONPs em ZnO+Ag. Verifica-se que há mais nanopartículas que se soltam do filtro durante a lavagem; neste caso 457 mg/L, com o elevado erro padrão de 341, contra 159 mg/L, com o erro de 32 mg/L, em ZnO+Ag. Os valores obtidos nas águas de lavagem, também neste caso, estarão associados ao fato de as nanopartículas não se soltarem completamente do filtro durante o processo de síntese, permanecendo *presas* às outras nanopartículas sintetizadas ou às fibras do papel, soltando-se depois, com a passagem da água.

Analisou-se também a presença de Zn^{2+} na solução de síntese e na água de lavagem da síntese de Ag NPs, tratando-se neste caso de impregnação única. Observou-se, à semelhança da Ag(Ag+ZnO), um teor de zinco residual, neste caso de 0,039 mg/L na síntese e de 0,067mg/L na lavagem. É pertinente comparar os dois casos tendo em conta que, no segundo, se trata da primeira síntese de uma dupla impregnação, ou seja, uma síntese de Ag NPs anterior à impregnação de ZnO NPs. A quantidade residual de zinco foi obtida em ambos os casos, proveniente de contaminação das amostras, como anteriormente referido.

Com base na estequiometria da reação de síntese de nanopartículas (Equações 1 a 3), calculou-se o a quantidade total esperada de zinco, tendo-se estabelecido uma comparação com os valores obtidos experimentalmente. O total experimental consistiu na soma de todas as quantificações feitas para cada filtro: filtros, soluções de síntese e águas de lavagem. A massa total esperada era de 523 mg, no entanto, os valores obtidos experimentalmente foram muito inferiores. Em ZnO, obteve-se a massa total de 207 mg, em Zn+OAg, 440 mg, e em Ag+ZNO, 383 mg. Para Ag, não foram feitos os

cálculos, visto que o zinco detectado era proveniente de contaminação da amostra. Além de muito abaixo do esperado, verifica-se uma grande dispersão dos resultados. Tendo em conta terem sido usados os resultados das soluções acidificadas, não se coloca a possibilidade de ter havido precipitação do metal na solução medida. No entanto, as sínteses foram feitas vários dias antes de se proceder às medições. Se, por um lado, as soluções preparadas para a execução da técnica não precipitaram, por outro, existe uma grande probabilidade de as nanopartículas se terem depositado nos frascos em que foram conservados desde a síntese até à análise, apesar da agitação vigorosa. A medição de soluções preparadas de fresco seria aconselhável.

Os resultados apresentados demonstram pouca precisão, indicando que o procedimento requer otimização.

4.5.3 Quantificação de Ag⁺ nas soluções de síntese e águas de lavagem

Na Tabela 3 apresentam-se as concentrações obtidas de Ag⁺ nas soluções de síntese das ZnO NPs e Ag NPs e o erro padrão associado às medidas das amostras.

Tabela 3 Concentração de Ag⁺ nas soluções de síntese das nanopartículas e águas de lavagem dos filtros impregnados, e respetivo erro padrão. Nas duplas impregnações, antes dos parênteses está designada a síntese cujo teor de metais foi quantificado e, entre parênteses, o filtro preparado.

NPs impregnadas	[Ag ⁺] (mg/L)			
	Solução de Síntese		Águas de Lavagem	
	Média	Erro	Média	Erro
ZnO	0,000	0,000	0,000	0,000
Ag	240,5	15,47	28,26	19,76
Ag(Ag+ZnO)	537,4	53,76	9,071	3,190
ZnO(Ag+ZnO)	3,616	2,427	0,140	0,061
ZnO(ZnO+Ag)	0,027	0,027	0,000	0,000
Ag(ZnO+Ag)	467,1	125,0	36,82	19,60

Pela análise da solução de síntese e águas de lavagem dos filtros impregnados com ZnO NPs, comprovou-se a ausência da prata, como esperado, por se tratar da única impregnação efetuada. O mesmo se observou na síntese e lavagem de ZnO NPs em ZnO+Ag, designada por ZnO(ZnO+Ag), tratando-se de uma síntese similar à anteriormente referida. Neste caso, a primeira impregnação realizada foi de ZnO NPs, pelo que não seria exatável obter resultados positivos para a prata.

Relativamente à síntese de AgNPs, neste mesmo tipo de filtros, observou-se um teor considerável de Ag⁺ (467,1 mg/L). No conjunto de todas as sínteses de Ag NPs (em Ag, Ag+ZnO e ZnO+Ag), apresentou um valor intermédio, sendo mais elevado o obtido na síntese de Ag NPs em Ag+ZnO - representada por Ag(AgZnO) - com a concentração de 537,4 mg/L, e o mais baixo em Ag, com 240,5 mg/L. Trata-se, mais uma vez, de resultados pouco coerentes, tendo em conta tratar-se de sínteses semelhantes.

Olhando para os resultados da quantificação dos iões Zn²⁺ e Ag⁺ nos filtros, o ZnO+Ag apresentou, igualmente, o resultado intermédio. Relativamente a Ag+ZnO, a impregnação demonstrou-se menos eficiente (2,1 mg/kg), apesar de se ter observado a maior concentração de Ag⁺ na síntese, contrariamente a Ag, com a melhor concentração no filtro (13 mg/kg) e menor na solução de síntese. Estabelece-se, assim, a relação inversa entre as concentrações de nanopartículas impregnadas e de

nanopartículas que são sintetizadas, sem serem incorporadas no papel. Isto é, uma elevada concentração de nanopartículas remanescente na solução de síntese indica uma menor qualidade de impregnação. Observou-se também a perda de Ag NPs na processo de impregnação de ZnO NPs. Nas águas de síntese destas últimas, obteve-se o valor de 3,616 mg/L de Ag⁺.

Analisando a perda de nanopartículas causada pela lavagem, a mais significativa foi observada na síntese de Ag NPs em ZnO+Ag (36,82 mg/L), seguida das mesmas sínteses em Ag (28,26 mg/L) e Ag+ZnO (9,071 mg/L) e, por último, a síntese de ZnONPs em Ag+ZnO (0,140 mg/L). Não se observou uma relação direta entre as perdas na lavagem e a concentração de Ag NPs nos filtros ou a concentração na solução de síntese. Em todos os resultados acima referidos, o erro associado foi muito elevado indicando, à semelhança do que foi observado nos resultados obtidos em 4.5.2, que o procedimento é pouco preciso.

À semelhança do que foi feito em relação à massa de Zn²⁺ total, procedeu-se ao cálculo da massa de Ag⁺ total por estequiometria da reação (Equação 7) que, experimentalmente, consistiu na soma de todas as quantificações, dos filtros e respectivas soluções de síntese e águas de lavagem. Dos 160 mg esperados esperados, obtiveram-se apenas 16 mg em Ag, e 30 mg tanto em ZnO+Ag como em Ag+ZnO. Nas soluções e águas de lavagem que continham prata, observou-se uma elevada deposição nos frascos em que foram conservadas após a síntese. Agitou-se vigorosamente, mas a agitação não terá sido suficiente para ressuspender toda a massa de prata depositada. A partir dessas soluções, foram preparadas as diluições e soluções acidificadas utilizadas para as medições. Em soluções preparadas de fresco, a discrepância de valores deverá ser inferior.

4.6 Ensaio de filtração e testes microbiológicos

Os ensaios de filtração e testes microbiológicos foram realizados nos Serviços Municipalizados de Água e Saneamento de Almada. Os ensaios consistiram na filtração do volume de 100mL de peptona salina contaminada com *E.coli*, utilizando pilhas de três e de cinco filtros, alternando filtros virgens (que ocuparam sempre as posições mais externas) com o(s) filtro(s) impregnado(s). As pilhas de três filtros consistiram num filtro impregnado entre dois filtros virgens e as de cinco, em três filtros virgens alternados com dois filtros impregnados com nanopartículas.

O procedimento foi aplicado a três tipos de filtros previamente preparados no Centro de Investigação de Materiais da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. É de recordar que foram testados apenas três tipos de filtros impregnados com nanopartículas (ZnO, Ag, Ag+ZnO). Pelos motivos descritos em 4.4, optou-se por não prosseguir os ensaios com os filtros de café com a dupla impregnação ZnO+Ag.

4.6.1 Ensaio de filtração

Os ensaios basearam-se na filtração de 100 mL de peptona salina contaminada com *E.coli*, tendo-se medido o tempo de passagem, em pilhas de três e de cinco filtros, como descrito em 2.4. Os resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 Velocidade de filtração média e erro padrão das filtrações pelos três tipos de filtro testados, em pilhas de três e de cinco filtros.

Pilha	Velocidade (mL/s)					
	ZnO		Ag		Ag+ZnO	
	Média	Erro	Média	Erro	Média	Erro
3 filtros	0,6	0,06	0,5	0,04	0,3	0,05
5 filtros	0,4	0,02	0,4	0,07	0,2	0,04

Observa-se, como esperado, que as velocidades de filtração foram inferiores quando se aumentou o número de filtros. Com o aumento do número de filtros, aumenta a densidade de fibras pela qual a solução de peptona salina contaminada com *E.coli* teve de passar. O papel é um material poroso mas a sobreposição de camadas fez com que os poros não fossem necessariamente coincidentes, o que igualmente terá retardado a passagem da solução acima referida.

No caso das pilhas de cinco filtros, é de salientar que foram adicionados dois filtros à pilha, tendo um deles passado pelo processo de impregnação de nanopartículas, o que poderá ter causado a colmatação parcial dos poros do filtro em causa.

Olhando para os três tipos de filtros, a filtração foi aproximadamente 29 % mais lenta nas pilhas de cinco filtros.

Comparando os três grupos de filtros impregnados, verifica-se que a velocidade é inferior nos filtros com dupla impregnação, tanto nas pilhas de três como nas de cinco filtros (0,3 e 0,2 mL/s, respetivamente). Neste caso, a cobertura dos filtros é muito superior, de acordo com o observado em 4.3.1, o que terá provocado a colmatação dos poros, funcionando como um obstáculo à passagem da solução contaminada e, conseqüentemente, tornando mais lenta a filtração. Os filtros impregnados com nanopartículas de óxido de zinco e os com nanopartículas de prata, por seu turno, apresentaram resultados mais próximos: 0,6 e 0,5 mL/s nas pilhas de três filtros, respetivamente; 0,4 mL/s nas pilhas de cinco filtros. É de salientar que os filtros em causa são filtros de café comuns e de baixo custo. Tendo em conta a sua finalidade, não são rigorosamente controlados em aspetos tais como a dimensão dos poros que, no presente estudo, provocam dispersão de resultados. Se se tratasse de uma estrutura controlada à escala micrométrica, o erro associado às medições efetuadas seria inferior.

4.6.2 Testes microbiológicos

Tabela 5 Contagens do crescimento de colónias de *E.coli* em meio Lauryl, nos filtros impregnados com ZnO NPs, Ag NPs e Ag+ZnO NPs, nas estruturas montadas (pilhas) de três e cinco filtros e no controlo.

Pilha	Contagem (UFC)							
	ZnO		Ag		Ag+ZnO		Controlo	
	Média	Erro	Média	Erro	Média	Erro	Média	Erro
3 filtros	16	0,03	5	2	23	6	24	2
5 filtros	17	0,33	3	3	17	4		

Relativamente às contagens, observa-se que nos filtros impregnados com ZnO NPs, o número de colónias é ligeiramente superior nas pilhas de cinco filtros (17 UFC contra 18UFC nas pilhas de 3 filtros), apesar de a diferença ser pouco significativa. Espera-se que, tendo poder biocida, este seja superior com o aumento do número de filtros, com conseqüente aumento do tempo de contato da solução contaminada, acrescendo ainda o fato de se aumentar o número de filtros impregnados com nanopartículas. O erro associado é, no entanto, o mais baixo de todos os tipos de filtros (3 UFC e 0,3 UFC, para pilhas de três e de cinco filtros, respetivamente).

Olhando para a contagem do controlo, verifica-se que a diferença é pouco significativa, pelo que não se pode afirmar que os filtros de celulose impregnados ZnO NPs sejam eficazes para o tratamento de água contaminada com *E.coli*.

Relativamente aos filtros de celulose impregnados com Ag NPs, pode-se concluir que as Ag NPs influenciam o aparecimento de colónias de *E.coli*, sendo mais eficazes nas pilhas de cinco filtros, em que se observou um crescimento médio de 3 UFC; nas pilhas de três filtros contabilizou-se o crescimento médio de 5 UFC. O erro associado às contagens é elevado mas continua a ser possível afirmar que as Ag NPs, de fato, têm atividade bactericida ou bacteriostática em *E.coli*. Os dois filtros adicionados à pilha propiciaram um aumento significativo no tempo de contato, enquanto a eficiência da impregnação e a duplicação do número de filtros impregnados com Ag NPs fizeram com que aumentasse o número de Ag NPs com que as bactérias contataram. A combinação destes dois fatores, o número de nanopartículas e o tempo de contato, estará na origem da eficiência do procedimento. Conclui-se, portanto, que os filtros de celulose impregnados com nanopartículas de prata podem ser utilizados no tratamento de água contaminada com *E.coli*. No entanto, não foi possível determinar se o efeito foi bactericida ou bacteriostático. Estudos adicionais são necessários para determinar os mecanismos por detrás da diminuição do crescimento das colónias pela interação com as Ag NPs.

Por último, nos filtros com dupla impregnação, designados por Ag+ZnO, não se verifica atividade biocida. As contagens são elevadas, de 23 UFC nas pilhas de 3 filtros e 17 UFC nas de cinco filtros, com um elevado erro associado (respetivamente, 6 UFC e 4 UFC), indicando baixa reprodutibilidade. Apesar de a média das contagens das pilhas de cinco filtros ser inferior às das pilhas de três filtros, o que vai de encontro ao esperado, o erro padrão associado contraria a possibilidade de haver um verdadeiro efeito biocida. Como anteriormente referido, a reprodutibilidade é baixa, isto é, o procedimento não demonstra precisão, podendo-se obter valores próximos aos observados no controlo, o que invalida a hipótese de que os filtros de celulose impregnados com Ag+ZnO NPs possam ser eficazes no tratamento de água contaminada com *E.coli*.

Capítulo 5

5 Conclusões e Perspetivas Futuras

O acesso a água potável é, em diversas regiões do planeta, e particularmente no continente Africano e no Médio Oriente, muito difícil. A situação económica e, conseqüentemente, as tecnologias e infraestruturas para o tratamento da água, apresentam uma gritante heterogeneidade. Sabe-se que a *Escherichia coli* é um dos principais agentes contaminantes da água de consumo, proveniente de contaminação fecal. São vários os projetos desenvolvidos com o objetivo de universalizar o acesso a água potável que, até ao momento, está longe de ser equitativo. Uma das apostas é no desenvolvimento de tecnologias domésticas para a purificação da água, de modo a ser acessível às famílias.

O presente trabalho surge como uma tentativa de otimizar uma possível alternativa, a baixo custo, para o tratamento de água. Tendo conhecimento do efeito antimicrobiano, nomeadamente em *E.coli*, das nanopartículas metálicas de óxido de zinco e de prata, procedeu-se à impregnação *in situ* em filtros de café. O procedimento e as técnicas utilizadas não acarretaram custos muito elevados, o que vai de encontro ao objetivo do estudo.

Além dos filtros impregnados com nanopartículas de óxido de zinco e os impregnados com nanopartículas de prata, testou-se a dupla impregnação, com as de óxido de zinco seguidas das de prata, e pela ordem inversa. Procedeu-se à caracterização do material e foram realizados ensaios de filtração e testes microbiológicos. As nanopartículas de óxido de zinco não demonstraram efeito em *E.coli*. As nanopartículas de prata, por sua vez, demonstraram atividade em *E.coli*, observada pela diminuição nas contagens de colónias após o período de incubação, em comparação com o controlo. As pilhas de cinco filtros foram mais eficazes, tendo aumentado o tempo de contato com a solução filtrada bem como o número de nanopartículas na estrutura de filtração. Portanto, os filtros de café impregnados com nanopartículas de prata podem ser uma alternativa para o tratamento de água contaminada com *E.coli*. A dupla impregnação, com nanopartículas de prata e de óxido de zinco, por esta ordem, apresentou a maior incorporação de óxido de zinco. O fato de o papel ter sofrido tratamento prévio (a primeira impregnação) tê-lo-á tornado mais suscetível à segunda impregnação, pelo alargamento dos poros como consequência da temperatura elevada da síntese de nanopartículas de prata. A dupla impregnação pela ordem inversa demonstrou baixa qualidade na impregnação, fato explicado pelas condições de síntese de nanopartículas de prata mencionadas, que terão provocado a lixiviação das nanopartículas de óxido de zinco anteriormente impregnadas, além da baixa impregnação de óxido de zinco. Por esta razão, não foram utilizados nos ensaios de filtração.

Quantificou-se o teor de iões metálicos (Zn^{2+} e Ag^+) nas soluções de síntese e águas de lavagem, tendo-se determinado a quantidade de nanopartículas formadas no processo de síntese, bem como as perdas na lavagem e, nas duplas impregnações, foi quantificada a perda de nanopartículas na segunda impregnação. Os resultados foram, no entanto, pouco precisos. Comparando-os com o valor total de

nanopartículas esperado, por estequiometria, verificou-se que o procedimento não apresenta exatidão e requer, portanto, um trabalho de otimização.

Futuramente, alguns estudos adicionais poderão ser levados a cabo, com vista a otimizar o procedimento e, conseqüentemente, melhorar os resultados.

No presente trabalho, o efeito antimicrobiano só foi verificado em nanopartículas de prata. No entanto, não foi possível determinar se o efeito observado é bactericida ou bacteriostático, o que poderá ser esclarecido por estudos subsequentes. Poder-se-á testar nanopartículas de prata sintetizadas por redução com borohidreto de sódio. Esta síntese origina partículas mais pequenas, podendo ser mais eficientes equanto agentes antimicrobianos.

No que concerne aos ensaios de filtração, poder-se-á testar múltiplas passagens da solução contaminada utilizando o mesmo filtro, para avaliar a sua reutilização, isto é, determinar o volume máximo de água possível de ser tratado com cada filtro. A qualidade da água tratada deverá ser avaliada, não apenas ao nível microbiológico como também da presença de metais, que deverão ser rigorosamente quantificados. Com isto, poderá ser possível melhorar a qualidade da água para consumo, a um custo acessível, particularmente em regiões onde o acesso a água potável ainda não é uma realidade.

Referências Bibliográficas

- [1] H. Balfaqih and Z. Mohd, “Performance Measurement Factors for Water Supply : A Systematic Review,” vol. 2014, pp. 770–775, 2015.
- [2] S. Islam and L. Susskind, “Understanding the water crisis in Africa and the Middle East: How can science inform policy and practice?,” 2015.
- [3] Q. Li, S. Mahendra, D. Y. Lyon, L. Brunet, M. V. Liga, D. Li, and P. J. J. Alvarez, “Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications,” *Water Research*, vol. 42, no. 18. pp. 4591–4602, 2008.
- [4] P. Batabyal, S. Mookerjee, D. Sur, and A. Palit, “Acta Tropica Diarrheogenic Escherechia coli in potable water sources of West,” *Acta Trop.*, vol. 127, no. 3, pp. 153–157, 2013.
- [5] S. Brazilian, “Cover photo Polio in Iraq Guinea-worm disease near eradication Mental health meeting at World Bank Testing water treatment products Copyright of Bulletin of the World Health Organization is the property of World Health Organization and its content may not,” pp. 161–162, 2016.
- [6] T. A. Dankovich and D. G. Gray, “Bactericidal Paper Impregnated with Silver Nanoparticles for Point-of-Use Water Treatment,” pp. 1992–1998, 2011.
- [7] J. Hulla, S. Sahu, and A. Hayes, “Nanotechnology: History and future,” *Hum. Exp. Toxicol.*, vol. 34, no. 12, pp. 1318–1321, 2015.
- [8] A. Albanese, P. S. Tang, and W. C. W. Chan, “The Effect of Nanoparticle Size , Shape , and Surface Chemistry on Biological Systems.”
- [9] M. G. M. Guzmán, J. Dille, and S. Godet, “Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity,” *Int J Chem Biomol Eng*, vol. 2, no. 3, pp. 104–111, 2009.
- [10] R. Das, S. Gang, and S. S. Nath, “Preparation and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles,” vol. 2011, no. October, pp. 472–475, 2011.
- [11] S. Ranjan, N. Dasgupta, and A. Roy, “Nanoscience and nanotechnologies in food industries : opportunities and research trends,” 2014.
- [12] R. Feynman, “editorial ‘ Plenty of room ’ revisited,” vol. 4, no. December, 2009.
- [13] V. K. Sharma, R. A. Yngard, and Y. Lin, “Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities,” *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 145, no. 1–2. pp. 83–96, 2009.
- [14] T. E. A. Chalew, G. S. Ajmani, H. Huang, and K. J. Schwab, “Evaluating Nanoparticle Breakthrough during Drinking Water Treatment,” vol. 121, no. 10, pp. 1161–1167, 2013.
- [15] Y. H. Ngo, D. Li, G. P. Simon, and G. Garnier, “Paper surfaces functionalized by nanoparticles,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 163, no. 1, pp. 23–38, 2011.
- [16] J. A. Fuller, J. Goldstick, J. Bartram, and J. N. S. Eisenberg, “Science of the Total Environment Tracking progress towards global drinking water and sanitation targets : A within and among country analysis,” *Sci. Total Environ.*, vol. 541, pp. 857–864, 2016.

- [17] “Zinc Oxide.” [Online]. Available: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/zinc_oxide#section=Top.
- [18] Z. L. Wang and W. Zhong Lin, “Zinc oxide nanostructures: growth, properties and applications,” *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 16, no. 25, pp. R829–R858, 2004.
- [19] A. Janotti and C. G. Van de Walle, “Fundamentals of zinc oxide as a semiconductor,” *Reports Prog. Phys.*, vol. 72, p. 126501, 2009.
- [20] S. Balta, A. Sotto, P. Luis, L. Benea, B. Van der Bruggen, and J. Kim, “A new outlook on membrane enhancement with nanoparticles: The alternative of ZnO,” *J. Memb. Sci.*, vol. 389, pp. 155–161, 2012.
- [21] J. You, Y. Zhang, and Z. Hu, “Bacteria and bacteriophage inactivation by silver and zinc oxide nanoparticles,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 85, no. 2, pp. 161–167, 2011.
- [22] S. a Rana and P. T. Kalaichelvan, “Antibacterial activities of metal nanoparticles.” *Advanced Biotechnology*, 2011.
- [23] H. Mu and Y. Chen, “Long-term effect of ZnO nanoparticles on waste activated sludge anaerobic digestion,” *Water Res.*, vol. 45, no. 17, pp. 5612–5620, 2011.
- [24] A. Kołodziejczak-Radzimska and T. Jesionowski, “Zinc Oxide—From Synthesis to Application: A Review,” *Materials (Basel)*, vol. 7, pp. 2833–2881, 2014.
- [25] X. Li and J. J. Lenhart, “Aggregation and dissolution of silver nanoparticles in natural surface water,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 46, no. 10, pp. 5378–5386, 2012.
- [26] Y. H. Ngo, D. Li, G. P. Simon, and G. Garnier, “Paper surfaces functionalized by nanoparticles,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 163, no. 1, pp. 23–38, 2011.
- [27] M. Giovanni, C. Y. Tay, M. I. Setyawati, J. Xie, C. N. Ong, R. Fan, J. Yue, L. Zhang, and D. T. Leong, “Toxicity Profiling of Water Contextual Zinc Oxide , Silver , and Titanium Dioxide Nanoparticles in Human Oral and Gastrointestinal Cell Systems,” pp. 1459–1469, 2014.
- [28] D. Van Phu, L. A. Quoc, N. N. Duy, and N. Quoc, “Study of incorporation of silver nanoparticles onto PE-g-PAAc nonwoven fabric by γ -irradiation for water treatment,” *Radiat. Phys. Chem.*, vol. 88, pp. 90–94, 2013.
- [29] C. A. Mecha and V. L. Pillay, “Development and evaluation of woven fabric micro filtration membranes impregnated with silver nanoparticles for potable water treatment,” *J. Memb. Sci.*, vol. 458, pp. 149–156, 2014.
- [30] M. Rai, A. Yadav, and A. Gade, “Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials,” *Biotechnology Advances*, vol. 27, no. 1. pp. 76–83, 2009.
- [31] A. Fernández, E. Soriano, G. López-carballo, P. Picouet, E. Lloret, R. Gavara, and P. Hernández-muñoz, “Preservation of aseptic conditions in absorbent pads by using silver nanotechnology,” *Food Res. Int.*, vol. 42, no. 8, pp. 1105–1112, 2009.
- [32] H. Koga and T. Kitaoka, “On-paper Synthesis of Silver Nanoparticles for Antibacterial Applications,” in *Silver Nanoparticles*, 2008, pp. 277–295.
- [33] R. Dosoky, S. Kotb, and M. Farghali, “Efficiency of silver nanoparticles against bacterial contaminants isolated from surface and ground water in Egypt,” vol. 2, no. June, pp. 175–184, 2015.
- [34] M. J. Hajipour, K. M. Fromm, A. Akbar Ashkarran, D. Jimenez de Aberasturi, I. R. de

- Larramendi, T. Rojo, V. Serpooshan, W. J. Parak, and M. Mahmoudi, “Antibacterial properties of nanoparticles,” *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 10, pp. 499–511, 2012.
- [35] M. V. D. Garcia, “Síntese , caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis,” p. 89, 2011.
- [36] T. a Dankovich, M. R. De Moura, L. H. C. Mattoso, and V. Zucolotto, “Bactericidal Paper Containing Silver Nanoparticles for Water Treatment by,” *J. Food Eng.*, vol. 109, no. 3, pp. 1992–1998, 2012.
- [37] B. Rowe, C. Public, and C. Avenue, “Escherichia coli diarrhoea,” pp. 531–550, 1985.
- [38] D. Gould, “Escherichia coli recognition and prevention,” *Prim. Heal. care*, vol. 21, no. 8, pp. 32–39, 2011.
- [39] S. T. Shulman, H. C. Friedmann, and R. H. Sims, “Theodor Escherich : The First Pediatric Infectious Diseases Physician ?,” vol. 45, pp. 1025–1030, 2007.
- [40] J. B. Kaper, J. P. Nataro, and H. L. T. Mobley, “Escherichia coli,” vol. 2, no. February, 2004.
- [41] R. Mary and N. S. G. D. Causes, “learning zone Causes , prevention and treatment of Escherichia coli infections,” vol. 24, no. 31, 2010.
- [42] “WHO | Enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC),” *WHO*, 2016.
- [43] “Escherichia coli (E. coli) Infection.” [Online]. Available: <http://epi.publichealth.nc.gov/cd/diseases/ecoli.html>.
- [44] M. Zarei, A. Jamnejad, and E. Khajehali, “Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles Against Four Foodborne Pathogens,” vol. 7, no. 1, pp. 1–4, 2014.
- [45] T. Esherich and D. Control, “Detailed Information for Escherichia coli,” 1982.
- [46] U. Obolski, E. Dellus-Gur, G. Y. Stein, and L. Hadany, “Antibiotic cross-resistance in the lab and resistance co-occurrence in the clinic: Discrepancies and implications in E. coli,” *Infect. Genet. Evol.*, vol. 40, pp. 155–161, 2016.
- [47] V. Gurnani, A. K. Singh, and B. Venkataramani, “Cellulose functionalized with 8-hydroxyquinoline: new method of synthesis and applications as a solid phase extractant in the determination of metal ions by flame atomic absorption spectrometry,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 485, no. 2, pp. 221–232, 2003.
- [48] C. Ibrahima, K. Diop, J. Lavoie, and M. A. Huneault, “Structural changes of Salix miyabeana cellulose fibres during dilute-acid steam explosion : Impact of reaction temperature and retention time,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 119, pp. 8–17, 2015.
- [49] I. Cropsproducts, C. V. Ministry, K. G. National, and H. Envir, “Fiber dimensions , lignin and cellulose content of various plant materials and their suitability for paper production . Ind Crop Prod,” no. April, 2016.
- [50] “Cellulose,” *My Organic Chemistry*. [Online]. Available: <https://myorganicchemistry.wikispaces.com/Cellulose>.
- [51] M. R. De Moura, L. H. C. Mattoso, and V. Zucolotto, “Development of cellulose-based bactericidal nanocomposites containing silver nanoparticles and their use as active food packaging,” *J. Food Eng.*, vol. 109, no. 3, pp. 520–524, 2012.
- [52] A. Hadjadj, O. Jbara, A. Tara, M. Gilliot, F. Malek, and E. Miloud, “Effects of cellulose fiber content on physical properties of polyurethane based composites,”

- Compos. Struct.*, vol. 135, pp. 217–223, 2016.
- [53] S. Ahmadzadeh, S. Desobry, J. Keramat, and A. Nasirpour, “Crystalline structure and morphological properties of porous cellulose/clay composites: The effect of water and ethanol as coagulants,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 141, pp. 211–219, 2016.
- [54] T. A. Dankovich and D. G. Gray, “Contact Angle Measurements on Smooth Nanocrystalline Cellulose (I) Thin Films,” vol. 25, pp. 699–708, 2011.
- [55] B. Jaber and L. La??nab, “One step synthesis of ZnO nanoparticles in free organic medium: Structural and optical characterizations,” *Mater. Sci. Semicond. Process.*, vol. 27, no. 1, pp. 446–451, 2014.
- [56] P. B. Khoza, M. J. Moloto, and L. M. Sikhwivhilu, “The Effect of Solvents , Acetone , Water , and Ethanol , on the Morphological and Optical Properties of ZnO Nanoparticles Prepared by Microwave,” vol. 2012, 2012.
- [57] F. R. F. Simões, “Desenvolvimento de um papel de filtro de baixo custo para tratamento de água,” 2014.
- [58] N. Bagdatlioglu, C. Nergiz, and P. G. Ergonul, “Heavy metal levels in leafy vegetables and some selected fruits,” *J. fur Verbraucherschutz und Leb.*, vol. 5, no. 3, pp. 421–428, 2010.
- [59] M. F. Chisholm, *Scanning Microscopy for Nanotechnology*. 2006.
- [60] D. C. Joy, “Scanning electron microscopy for materials characterization,” *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, vol. 2, pp. 465–468, 1997.
- [61] K. D. Vernon-Parry, “Scanning electron microscopy: an introduction,” *III-Vs Rev.*, vol. 13, no. 4, pp. 40–44, 2000.
- [62] W. Zhou, R. P. Apkarian, and Z. L. Wang, “Fundamentals of Scanning Electron Microscopy,” *Scanning Microsc. Nanotechnol.*, pp. 1–40, 2007.
- [63] F. Li, Y. Yuan, J. Luo, Q. Qin, J. Wu, Z. Li, and X. Huang, “Synthesis and characterization of ZnO-Ag core-shell nanocomposites with uniform thin silver layers,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 256, no. 20, pp. 6076–6082, 2010.
- [64] “Specimen Interaction.” [Online]. Available: <http://ncmn.unl.edu/cfem/microscopy/interact.shtml>.
- [65] “Sample-Electron Interaction.” [Online]. Available: <http://www.nanoscience.com/products/sem/technology-overview/sample-electron-interaction/>.
- [66] “Energy Dispersive X-ray Spectroscopy,” *Materials Evaluation and Engineering, INC.* [Online]. Available: <http://www.mee-inc.com/hamm/energy-dispersive-x-ray-spectroscopyeds/>.
- [67] B. Hafner, “Energy Dispersive Spectroscopy on the SEM: A Primer,” *Charact. Facil. Univ. Minnesota*, pp. 7–10, 2006.
- [68] “Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy, EDS Analysis,” *Materials Characterization*. [Online]. Available: <http://www.eag.com/mc/energy-dispersive-x-ray-spectroscopy.html>.
- [69] “X-ray Diffraction (XRD) Analysis,” *Materials Characterizations*. [Online]. Available: <http://www.eag.com/mc/x-ray-diffraction.html>.

- [70] “X-ray Diffraction (XRD),” *XOS*. [Online]. Available: <https://xos.com/technologies/xrd/>.
- [71] E. Bash, *Crystallography made crystal clear*, vol. 1. 2015.
- [72] H. Kahn, “Difração de raios X,” pp. 1–18.
- [73] A. P. F. Albers, F. G. Melchiades, R. Machado, J. B. Baldo, A. O. Boschi, P. Candido, D. Castejón, S. J. Campos, R. W. Luiz, and S. Carlos, “Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X (A simple method for the characterization of clay minerals by X-ray diffraction),” pp. 34–37, 2002.
- [74] Y. C. Zhou and M. N. Rahaman, “Hydrothermal synthesis and sintering of ultrafine CeO₂ powders,” *J. Mater. Res.*, vol. 8, no. 07, pp. 1680–1686, 1993.
- [75] A. K. Gilmudinov, “_____ Atomic Absorption, Theory,” in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, vol. 1 (A-L), 2000, p. 1308.
- [76] R. D. Beaty and J. D. Kerber, “Concepts , Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry,” pp. 1–96, 1993.
- [77] B. V L’Vov, “Fifty years of atomic absorption spectrometry,” *J. Anal. Chem.*, vol. 60, p. 382, 2005.
- [78] R. García and a P. Báez, “Atomic Absorption Spectrometry (AAS),” *At. Absorpt. Spectrosc.*, pp. 1–12, 2012.
- [79] B. V. L’vov, “Fifty years of atomic absorption spectrometry,” *J. Anal. Chem.*, vol. 60, no. 4, pp. 382–392, 2005.
- [80] A. Kumar, V. V. Bhanu Prasad, K. C. James Raju, and A. R. James, “Ultra high strain properties of lanthanum substituted PZT electro-ceramics prepared via mechanical activation,” *J. Alloys Compd.*, vol. 599, pp. 53–59, 2014.
- [81] P. Goel and K. L. Yadav, “Substitution site effect on structural and dielectric properties of La-Bi modified PZT,” *J. Mater. Sci.*, vol. 42, no. 11, pp. 3928–3935, 2007.
- [82] P. H. F. De Castro, “Processos Químicos Industriais II Apostila 4 PAPEL E CELULOSE,” p. 6, 2009.

ANEXOS

ANEXO I Concentração de Zn²⁺ nos filtros impregnados com nanopartículas de óxido de zinco e de prata

Filtros		Leituras Zn ²⁺				
Amostra	Massa (g)	Em solução (mg/L)	No filtro (mg)	[Zn] (mg/kg)	Média (g/kg)	Erro padrão
ZnO1	0,0835	61,22	3,06	36658	26,047	6,297
ZnO2	0,0857	25,48	1,27	14865		
ZnO3	0,0907	48,28	2,41	26615		
Zn+OAg1	0,0817	22,44	1,12	13733	14,953	1,364
Zn+OAg2	0,0847	49,42	2,47	29173		
Zn+OAg3	0,0837	3,266	0,16	1951,0		
Ag+ZnO1	0,0868	84,26	4,21	48537	39,647	12,391
Ag+ZnO2	0,0886	26,88	1,34	15169		
Ag+ZnO3	0,0974	107,6	5,38	55236		
Ag1	0,0888	0,061	0,00	34,391	0,0286	15,148
Ag2	0,0858	0,000	0,00	0,0000		
Ag3	0,0846	0,087	0,00	51,518		

ANEXO II Concentração de Ag⁺ nos filtros impregnados com nanopartículas de óxido de zinco e de prata

Filtros		Leituras Ag				
Amostra	Massa (g)	Em solução (mg/L)	No filtro (mg)	[Zn] (mg/kg)	Média (g/kg)	Erro padrão
ZnO1	0,0835	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
ZnO2	0,0857	0,00	0,00	0,00		
ZnO3	0,0907	0,00	0,00	0,00		
ZnO+Ag1	0,0817	16,67	0,834	5289	3,577	1,513
ZnO+Ag2	0,0847	0,950	0,047	560,6		
ZnO+Ag3	0,0837	8,173	0,409	4882		
Ag+ZnO1	0,0868	0,651	0,033	375,1	2,147	1,943
Ag+ZnO2	0,0886	10,68	0,534	6027		
Ag+ZnO3	0,0974	0,073	0,004	37,40		
Ag1	0,0888	20,42	1,021	11498	12,97	1,926
Ag2	0,0858	18,25	0,913	10636		
Ag3	0,0846	28,42	1,421	16797		

ANEXO III Quantificação de Zn²⁺ nas soluções de síntese e águas de lavagem dos filtros impregnados ZnO NPs e Ag NPs

Amostra	Solução	Em solução (mg/L)	Média Síntese(mg/L)	Erro padrão	Média Lavagem (mg/L)	Erro padrão
ZnO1	Síntese	1706,00	1672,93	21,72	58,13	10,69
	Lavagem	75,84				
ZnO2	Síntese	1632,00				
	Lavagem	38,90				
ZnO3	Síntese	1680,80				
	Lavagem	59,66				
ZnO(ZnO+Ag1)	Síntese	3934,80	3532,13	244,15	158,52	32,36
	Lavagem	97,92				
ZnO(ZnO+Ag2)	Síntese	3570,00				
	Lavagem	208,52				
ZnO(ZnO+Ag3)	Síntese	3091,60				
	Lavagem	169,12				
ZnO(Ag+ZnO1)	Síntese	4444,00	2883,07	1230,89	457,22	341,03
	Lavagem	200,68				
ZnO(Ag+ZnO2)	Síntese	3751,20				
	Lavagem	38,19				
ZnO(Ag+ZnO3)	Síntese	454,00				
	Lavagem	1132,80				
Ag1	Síntese	0,00	0,04	0,04	0,07	0,05
	Lavagem	0,00				
Ag2	Síntese	0,00				
	Lavagem	0,18				
Ag3	Síntese	0,12				
	Lavagem	0,03				
Ag(ZnO+Ag1)	Síntese	27,88	20,23	5,20	27,26	19,71
	Lavagem	11,40				
Ag(ZnO+Ag2)	Síntese	10,30				
	Lavagem	3,92				
Ag(ZnO+Ag3)	Síntese	22,52				
	Lavagem	66,45				
Ag(Ag+ZnO1)	Síntese	0,75	0,49	0,15	0,12	0,00
	Lavagem	0,11				
Ag(Ag+ZnO2)	Síntese	0,51				
	Lavagem	0,12				
Ag(Ag+ZnO3)	Síntese	0,22				
	Lavagem	0,12				

ANEXO IV Quantificação de Ag⁺ nas soluções de síntese e águas de lavagem dos filtros impregnados ZnO NPs e Ag NPs

Amostra	Solução	Em solução (mg/L)	Média Síntese (mg/L)	Erro padrão	Média Lavagem (mg/L)	Erro padrão
ZnO1	Síntese	0,00	0,00	0,00	58,13	0,00
	Lavagem	0,00				
ZnO2	Síntese	0,00				
	Lavagem	0,00				
ZnO3	Síntese	0,00				
	Lavagem	0,00				
ZnO(ZnO+Ag1)	Síntese	0,00	0,03	0,03	158,52	0,00
	Lavagem	0,00				
ZnO(ZnO+Ag2)	Síntese	0,08				
	Lavagem	0,00				
ZnO(ZnO+Ag3)	Síntese	0,00				
	Lavagem	0,00				
ZnO(Ag+ZnO1)	Síntese	0,11	3,62	2,43	457,22	0,06
	Lavagem	0,03				
ZnO(Ag+ZnO2)	Síntese	2,46				
	Lavagem	0,15				
ZnO(Ag+ZnO3)	Síntese	8,28				
	Lavagem	0,24				
Ag1	Síntese	210,28	240,45	15,47	0,07	19,76
	Lavagem	67,76				
Ag2	Síntese	249,64				
	Lavagem	7,40				
Ag3	Síntese	261,44				
	Lavagem	9,62				
Ag(ZnO+Ag1)	Síntese	553,20	537,40	53,76	27,26	3,19
	Lavagem	4,47				
Ag(ZnO+Ag2)	Síntese	437,40				
	Lavagem	7,53				
Ag(ZnO+Ag3)	Síntese	621,60				
	Lavagem	15,21				
Ag(Ag+ZnO1)	Síntese	295,60	467,07	125,02	0,12	19,59
	Lavagem	72,74				
Ag(Ag+ZnO2)	Síntese	395,2				
	Lavagem	5,3				
Ag(Ag+ZnO3)	Síntese	710,4				
	Lavagem	32,42				

ANEXO V Contagens do crescimento de *E.coli* em meio Lauryl após incubação a 37°C durante 24h, nas amostras em triplicado

Amostra		Pilha de 3 filtros			Pilhas de 5 filtros		
		Contagem (UFC)	Média (UFC)	Erro padrão	Contagem (UFC)	Média (UFC)	Erro padrão
ZnO	A	22	18	3	17	17	0,3
	B	12			17		
	C	19			18		
Ag	A	4	5	2	8	3	3
	B	8			0		
	C	2			0		
Ag+ZnO	A	22	23	6	13	17	4
	B	33			24		
	C	13			14		