

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS – UEG  
CAMPUS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS - CCET  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS APLICADAS A  
PRODUTOS PARA SAÚDE (PPG-CAPS)

**ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS EM  
CARVÃO ATIVADO DO ENDOCARPO DE *Orbignya phalerata*  
(BABAÇU) IMPREGNADO COM PRATA**

JÉSSICA PIRES VALLE

Anápolis – GO  
2017

JÉSSICA PIRES VALLE

**ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS EM  
CARVÃO ATIVADO DO ENDOCARPO DE *Orbignya phalerata*  
(BABAÇU) IMPREGNADO COM PRATA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação  
*Stricto Sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para  
Saúde (nível mestrado) da Universidade Estadual de Goiás  
como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves

Co-Orientador: Prof. Dr. José Daniel Ribeiro de Campos

Anápolis – GO  
2017

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UEG  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

PP567a Pires Valle, Jéssica  
Análise da formação de biofilmes bacterianos em carvão ativado do endocarpo de *Orbignya phalerata* (babaçu) impregnado com prata / Jéssica Pires Valle; orientador Plínio Lázaro Faleiro Naves; co-orientador José Daniel Ribeiro de Campos. -- Anápolis, 2017.  
61 p.

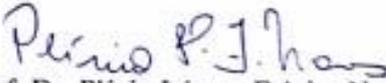
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação Mestrado Acadêmico em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) -- Câmpus-Anápolis CET, Universidade Estadual de Goiás, 2017.

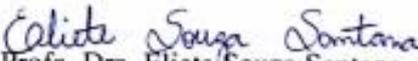
1. Carvão ativado. 2. Prata. 3. Impregnação. 4. *Pseudomonas aeruginosa*. 5. *Escherichia coli*. I. Faleiro Naves, Plínio Lázaro, orient. II. Ribeiro de Campos, José Daniel, co-orient. III. Título.

Jéssica Pires Valle

“Análise da formação de biofilmes bacterianos em carvão ativado do endocarpo de *Orbignya phalerata* (babaçu) impregnado com prata”

Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás, para a obtenção do título de Mestre, aprovada em 28 de setembro de 2017, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores

  
Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Nunes  
Presidente da Banca  
UEG/CCET

  
Profa. Dra. Eliete Souza Santana  
Membro Interno  
UEG/CCET

  
Profa. Dra. Lucimar Pinheiro Rosseto  
Membro Externo  
UniEvangélica

## AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente à minha mãe, Maria Aparecida Pires de Oliveira, por todo apoio dado no início e no decorrer do curso e ao meu noivo e companheiro, Leonardo Batista Vasconcelos cuja compreensão e amor ao longo destes dois anos tornaram esta etapa possível e menos árdua.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves e Co-orientador, Prof. Dr. José Daniel Ribeiro de Campos, pelos conhecimentos compartilhados e pelos grandes incentivos à pesquisa.

Aos amigos queridos, Lucas Leonardo da Silva e Larissa Batista da Silva que permaneceram comigo até o fim, vivenciando todas as adversidades e prazeres encontrados pelo caminho; Em especial à colega e companheira de mestrado Sinara Pereira Brasil e à amiga querida Patrícia Lima D'Abadia por todo auxílio, ensinamentos, pela paciência, tempo e apoio. Aos técnicos dos laboratórios de química e de microbiologia da UEG que me auxiliaram em várias etapas: Cleiber Cintra Morais e Osvaldo Gomes Pinto. Sem todos vocês não teria conseguido!

À FAPEG pela bolsa concedida.

À empresa Bahiacarbon Agro Industrial pela concessão das amostras de carvão ativado.

Aos professores da banca examinadora, que aceitaram participar e estão dispostos a colaborar com a pesquisa.

Muito obrigada!

*“Quero a certeza dos loucos que brilham. Pois se o louco persistir na sua loucura, acabará sábio.”*

*Raul Seixas*

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	16
2.1. Carvão ativado.....	16
2.2. O processo de fabricação do carvão ativado.....	18
2.3. Carvão ativado do endocarpo de babaçu ( <i>Orbignya phalerata</i> ).....	20
2.4. Biofilmes bacterianos .....	21
2.5. Formação de biofilmes mistos de <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em carvão ativado .....	24
2.6. Carvão ativado impregnado com prata .....	26
3. OBJETIVOS .....	28
3.1. Objetivo geral .....	28
3.2. Objetivo específico .....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	29
4.1. Caracterização do carvão ativado do endocarpo de babaçu ( <i>Orbignya phalerata</i> )	29
4.1.1. Determinação do teor de cinzas .....	29
4.1.2. Determinação de solúveis em água .....	29
4.1.3. Determinação da granulometria .....	30
4.2. Impregnação do carvão ativado com prata .....	30
4.2.1. Preparação das amostras .....	30
4.2.2. Determinação da concentração de prata impregnada em carvão ativado por absorção atômica .....	31
4.2.3. Determinação do número de iodo .....	32
4.2.4. Determinação da lixiviação de prata em água através de filtros de carvão ativado impregnado .....	32
4.3. Ensaio microbiológicos .....	32
4.3.1. Manutenção das cepas .....	32
4.3.2. Preparação da água desafio .....	33
4.3.3. Preparação dos filtros de leito fixo com carvão ativado .....	34

4.3.4. Processamento das amostras de carvão ativado .....	35
4.3.5. Preparação dos corpos-de-prova para análise em MEV .....	37
4.4. Análises estatísticas dos dados .....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
5.1. Caracterizações do carvão ativado do endocarpo de babaçu ( <i>Orbignya phalerata</i> ) .....	38
5.2. Impregnação de prata no carvão ativado .....	40
5.2.1. Determinação da concentração de prata impregnada em carvão ativado ...	40
5.2.2. Determinação do número de iodo .....	41
5.2.3. Determinação da lixiviação de prata em água através dos filtros de carvão ativado impregnado .....	42
5.3. Ensaio microbiológicos .....	43
5.3.1. Contagem de <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> nas amostras de água desafio .....	43
5.3.2. Formação de biofilme por <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em meio filtrante de leito fixo e sua inibição por carvão ativado impregnado com prata .....	44
6. CONCLUSÃO .....	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50
8. ANEXOS .....	61

## LISTA DE SIGLAS

<b>AD</b>	Água desafio
<b>ASTM</b>	<i>American Society of Tests and Materials</i>
<b>ATCC</b>	<i>American Tipe Culture Collection</i>
<b>BHI</b>	<i>Brain Heart Infusion</i>
<b>CA</b>	Carvão ativado
<b>CAi</b>	Carvão ativado impregnado
<b>CAni</b>	Carvão ativado não impregnado
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EMB</b>	<i>Eosin Methylene Blue</i>
<b>EPS</b>	Exopolissacarídeo
<b>ETA</b>	Estação de tratamento de água
<b>IUPAC</b>	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<b>NHC</b>	Não houve crescimento
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colônias
<b>&lt;LD</b>	Abaixo do limite de detecção

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da classificação dos poros do carvão ativado conforme as dimensões apresentadas .....	17
Figura 2 – Representação química dos grupos funcionais presentes na superfície do carvão ativado .....	18
Figura 3 – Esquema da carbonização e ativação química com FeCl <sub>2</sub> .....	19
Figura 4 – Processo de produção do carvão ativado (carbonização e ativação física) ....	20
Figura 5 – Estrutura química dos principais componentes do coco: lignina, celulose e hemicelulose .....	21
Figura 6 – Etapas da formação de biofilme .....	22
Figura 7 – Filtro de água de carvão ativado saturado com micro-organismos .....	24
Figura 8 – Mecanismo de ação dos íons de prata .....	27
Figura 9 – Metodologia empregada na determinação do teor de prata impregnada nas amostras de carvão ativado .....	31
Figura 10 – Método de conservação e reativação das cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 .....	33
Figura 11 – Preparação da água desafio .....	34
Figura 12 – Preparo dos filtros piloto para posterior filtração da suspensão bacteriana mista de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 .....	35
Figura 13 – Processamento das amostras de carvão ativado após filtração .....	36
Figura 14 – Unidades formadoras de colônia (ufc.mL <sup>-1</sup> ) crescidas em ágar EMB .....	36

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Inibição na formação de biofilme misto de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 para CA <sub>ni</sub> e CA <sub>i</sub> .....	47
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição das respectivas concentrações de prata nas amostras de carvão ativado .....	30
Tabela 2 – Análise das características do carvão ativado do endocarpo de babaçu ( <i>Orbignya phalerata</i> ) .....	38
Tabela 3 – Determinação da porcentagem de prata impregnada no carvão ativado por espectrofotometria de absorção atômica .....	41
Tabela 4 – Superfície do carvão ativado detectada pela técnica da massa de iodo adsorvida .....	41
Tabela 5 – Teor de prata lixiviada em carvão ativado .....	42
Tabela 6 – Quantificação de células viáveis de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 associadas ao biofilme formado na superfície das amostras de carvão ativado impregnadas .....	44

## RESUMO

O carvão ativado é muito utilizado em filtros de água, contudo, é susceptível à formação de biofilmes microbianos em sua superfície. Quando aderidos à superfície do carvão ativado, os biofilmes podem saturar de forma prematura o filtro e desprender-se durante o processo de filtração, contaminando a água filtrada. Uma alternativa industrial para evitar a contaminação da água por meio de micro-organismos é a impregnação do carvão ativado com prata, pois ela possui atividade bactericida e pode inibir a formação de biofilmes. Neste contexto, objetivou-se impregnar prata em carvão ativado do endocarpo de babaçu *Orbignya phalerata*, quantificar e caracterizar as amostras de carvão, avaliar a formação de biofilmes mistos de *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 na superfície do carvão ativado, avaliar a lixiviação de prata e verificar a atividade inibitória do metal na formação de biofilmes mistos. A metodologia aplicada para impregnação de prata foi realizada por aquecimento com agitação até completa secura, seguida de calcinação em mufla. As caracterizações seguiram os métodos da Sociedade Americana de Testes e Materiais. A análise de formação e inibição do biofilme, juntamente com a lixiviação dos metais foram realizadas em meio filtrante de leito fixo. Os resultados da quantificação de metal nas amostras foram: 0,0180%, 0,0218% e 0,0453% de prata em massa. As caracterizações das amostras demonstraram que o carvão ativado possui elevada capacidade adsorptiva, que não foi afetada pela impregnação dos metais. A concentração em massa de prata lixiviada na água permaneceu dentro das normas exigidas pela ABNT NBR 16098/2012 e pela Portaria 2914/2011 quanto à concentração de metal presente na água filtrada demonstrando que o processo de impregnação do carvão ativado com prata não alterou a qualidade da água filtrada. A formação de biofilme misto de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* ocorreu nas amostras de carvão ativado não impregnado, enquanto que para amostras de carvão ativado impregnado houve inibição completa do crescimento de biofilme por *Escherichia coli* e redução concentração-dependente para *Pseudomonas aeruginosa*, chegando a completa inativação. Nas condições experimentais utilizadas, a prata impregnada no carvão ativado inibiu a formação de biofilmes mistos, se apresentando como metal altamente eficaz na inativação bacteriana. Portanto o uso de prata em menores concentrações que as empregadas comercialmente (0,08%) apresentaram propriedades de inativação de biofilmes microbianos mistos, sem comprometimento da água potável, mostrando sua aplicação como meio filtrante em filtros de água domésticos e alternativa industrial visando possível economia de recursos.

**Palavras-chave:** Biofilmes mistos. Carvão ativado. *Escherichia coli*. Prata. *Pseudomonas aeruginosa*.

## ABSTRACT

Activated carbon is used in water filters, however, it is susceptible to the formation of microbial biofilms on its surface. When adhered to the surface of the activated carbon, biofilms can prematurely saturate the filter and dislodge during the filtration process, contaminating the filtered water. An industrial alternative to avoid the contamination of water by means of microorganisms is the impregnation of activated carbon with silver, since it has bacteriostatic activity and may inhibit the formation of biofilms. In this context, the objective was to impregnate silver in activated carbon of the *Orbignya phalerata* Babaçu endocarp, to quantify and characterize the carbon samples, to evaluate the formation of mixed biofilms of *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 on the activated carbon surface, to evaluate the silver leaching and verify the inhibitory activity of the metal in the formation of mixed biofilms. The methodology applied for silver impregnation was carried out by heating with stirring until complete dryness, followed by calcination in muffle. The characterizations followed the methods of the American Society of Testing and Materials. The analysis of formation and inhibition of the biofilm, together with the leaching of the metals were carried out in fixed bed filter medium. The results of metal quantification in the samples were: 0.0180%, 0.0218% and 0.0453% silver by mass. The characterization of the samples showed that the activated carbon had a high adsorptive capacity, which was not affected by the impregnation of the metals. The bulk concentration of silver leached into the water remained within the standards required by ABNT NBR 16098/2012 and Ordinance 2914/2011 regarding the concentration of metal present in the filtered water demonstrating that the process of impregnation of activated carbon with silver did not alter the quality filtered water. The mixed biofilm formation of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* occurred in the samples of non-impregnated activated carbon, while for impregnated activated carbon samples there was complete inhibition of the biofilm growth by *Escherichia coli* and concentration-dependent reduction for *Pseudomonas aeruginosa*, arriving at complete inactivation. Under the experimental conditions used, silver impregnated with activated carbon inhibited the formation of mixed biofilms, presenting as highly effective metal in bacterial inactivation. Therefore, the use of silver at lower concentrations than those used commercially (0.08%) showed inactivation properties of mixed microbial biofilms, without compromising drinking water, showing its application as a filter medium in domestic water filters and industrial alternative for possible savings of resources.

**Keywords:** Activated carbon. *Escherichia coli*. Mixed biofilm. *Pseudomonas aeruginosa*. Silver.

## 1. INTRODUÇÃO

Devido à sua elevada área superficial e alto poder de adsorção (LI et al., 2002), o carvão ativado é utilizado para purificar, desintoxicar, desodorizar, filtrar, descolorir ou modificar a concentração de uma infinidade de materiais líquidos e gasosos, sendo de grande interesse em vários setores econômicos de diversas áreas por representar um processo de baixo custo e de fácil operação (OLIVEIRA, 2003; LYUBCHIKA et al., 2004).

Também possui aplicabilidade como suporte para catalisadores (LIAKAKOU et al., 2015), agente descolorante (TIAN et al., 2015) e na remoção de metais pesados em efluentes (BACCAR et al., 2009). O aumento contínuo na demanda faz com que seja necessário o uso de diferentes matérias-primas, principalmente de origem vegetal como, por exemplo, madeira, endocarpo de coco, resíduos de babaçu, etc. (WILSON, 1981; JANKOWSKA et al., 1991).

O carvão ativado é extensivamente utilizado como filtros de água (SCHMIDT, 2011). Contudo, é susceptível à formação de biofilmes microbianos, pois a água a ser filtrada pode estar contaminada com micro-organismos que se alojam em suas superfícies, consomem a matéria orgânica do meio e secretam exopolissacarídeos (EPS) – metabólitos secundários, produzidos principalmente durante a fase estacionária do crescimento microbiano – formando assim o biofilme (SUTHERLAND, 1998; DONLAN & COSTERTON, 2002).

Para a indústria, os biofilmes custam bilhões de dólares por ano em equipamentos danificados, contaminação de produtos e perdas energéticas. O fenômeno da formação de biofilme impacta em uma ampla gama de empresas, incluindo produção do petróleo, de especialidades químicas, da saúde, de produtos domésticos, mineração e utilidades, além da obtenção de água potável (PIZZOLITTO et al., 2001).

Quando aderidos à superfície do carvão ativado, os biofilmes podem saturar de forma prematura os filtros e desprender-se durante o processo de filtração, contaminando a água filtrada (FONG & WOOD, 2006).

A impregnação do carvão ativado com prata representa uma alternativa para evitar a sua contaminação microbiana e auxiliar na obtenção de água com alto grau de potabilidade,

ou seja, baixa densidade microbiana por meio da ação sinérgica da adsorção do material orgânico pelo carvão ativado e na ação bactericida da prata (XAVIER et al., 2010).

Tang et al. (2007) citam que a prata possui propriedades antibacterianas sem efeitos tóxicos em comparação com íons de outros metais pesados. Nas pesquisas sobre antibacterianos, é o primeiro metal apontado como melhor candidato inclusive em estudos da redução de infecções bacterianas em zonas próximas a superfícies de biomateriais que possuem prata em sua composição.

Lalley et al. (2014) comparou demais metais capazes de inativar bactérias e a prata se mostrou o mais eficiente, além de ser a nanopartícula metálica mais comumente investigada. Seu efeito oligodinâmico é forte para uma gama de bactérias, mas se mantém relativamente não tóxico para as células dos mamíferos.

Sendo assim, sugere-se que caso a concentração de prata seja aumentada, haja também um aumento na ação antimicrobiana. Porém, conforme se aumenta a concentração de prata sobre a superfície do carvão ativado, diminui-se a área superficial do adsorvente, resultando na diminuição de sua capacidade adsortiva. A prata é recurso dispendioso e, se utilizado em excesso torna o carvão ativado impregnado economicamente inacessível (FONG & WOOD, 2006).

O desenvolvimento de produtos antimicrobianos está em constante crescimento. Essa atividade depende da superfície de contato, sendo que uma superfície de contato maior permite uma ampla interação com as substâncias orgânicas e inorgânicas (CLEMO, 2005; JONES & HOEK, 2010).

Portanto, este trabalho propõe a impregnação do carvão ativado com prata em concentrações inferiores às utilizadas comercialmente, para desenvolvimento de filtro experimental com leito fixo e para o estudo da inibição da formação de biofilmes mistos de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* em condições laboratoriais.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Carvão ativado

O carvão ativado (CA) é um material carbonoso poroso que foi submetido a processos como carbonização e ativação, subsequente à pirólise, que consiste em submeter o material carbonizado a reações secundárias visando o aumento da porosidade (RAMOS et al., 2009). A maior parte dos materiais carbonáceos possui certo grau de porosidade, sendo que no decorrer da ativação a área superficial aumenta com a oxidação dos átomos de carbono. Após a ativação, o carvão pode apresentar área superficial na ordem de dezenas de  $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$  (SHOAIB & AL-SWAIDAN, 2015).

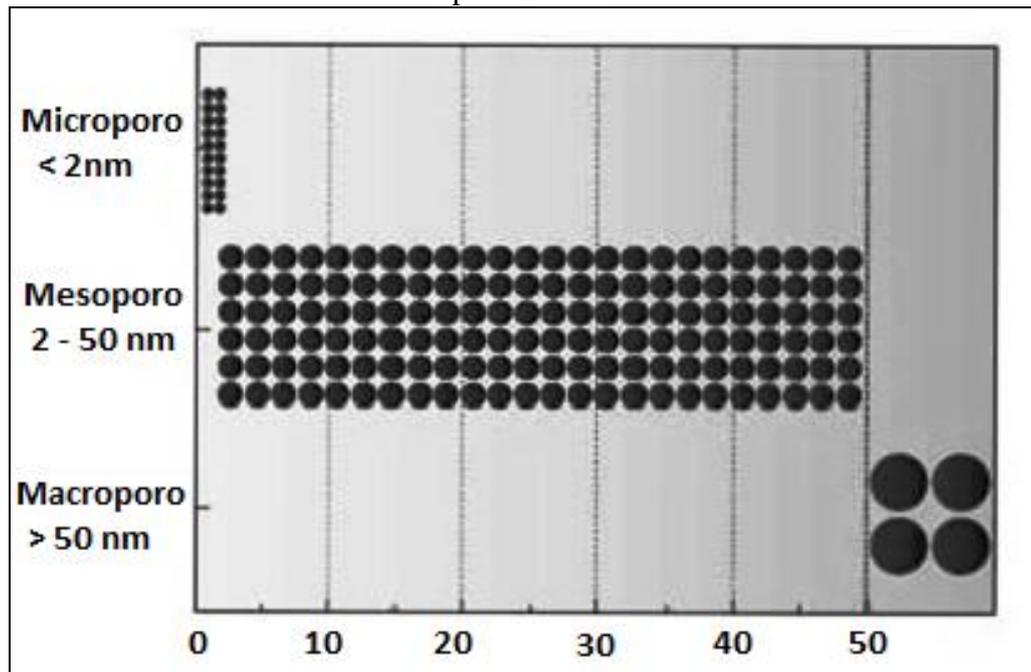
A química da superfície do CA, e conseqüentemente, o caráter ácido e básico da sua superfície, podem ser modificados através de processos biológicos e físico-químicos, (BHATNAGAR et al., 2013), tais como tratamento térmico, oxidação ou impregnação com vários compostos orgânicos e inorgânicos. A oxidação é uma das modificações convencionais mais utilizadas, em que se empregam agentes oxidantes, em fase gasosa ou em solução (COOKSON, 1980). Nessa fase, o carbono irá reagir com o agente oxidante produzindo óxidos de carbono que se difundem para a superfície, formando a estrutura porosa interna do CA (SMÍSEK & CERNÝ, 1970).

O CA possui características como a forma, tamanho de partícula, volume do poro, área superficial, estrutura, distribuição de poro e características físicas e químicas da superfície. Todos esses parâmetros podem ser modificados, obtendo-se diferentes tipos de carvão com características melhoradas, o que lhes confere maior capacidade de adsorção (PIS et al., 1996; WANG et al., 2001).

A produção de CA pode partir de diferentes materiais tais como madeira, endocarpo do coco, sementes, osso, coque, petróleo, plástico, pneus, entre outros. A matéria-prima de origem, juntamente com o modo de ativação do carvão, confere diferentes características ao produto final, resultando em diferentes capacidades adsorptivas para cada CA. Além disso, sua efetividade em adsorver um determinado composto também é altamente influenciada pelas características do composto a ser adsorvido (DONATI et al., 1994).

Dotada de uma porosidade, sabe-se que a área interna é variável, organizada de acordo com a dimensão dos poros. Segundo as normas da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), os poros se classificam em macroporos (acima de 50 nm), mesoporos (2 nm a 50 nm) e microporos (inferior a 2 nm) granulares (CLARK, 2010; ROUQUEROL et al., 2013), conforme representado na Figura 1.

Figura 1 - Representação da classificação dos poros do carvão ativado conforme as dimensões apresentadas.



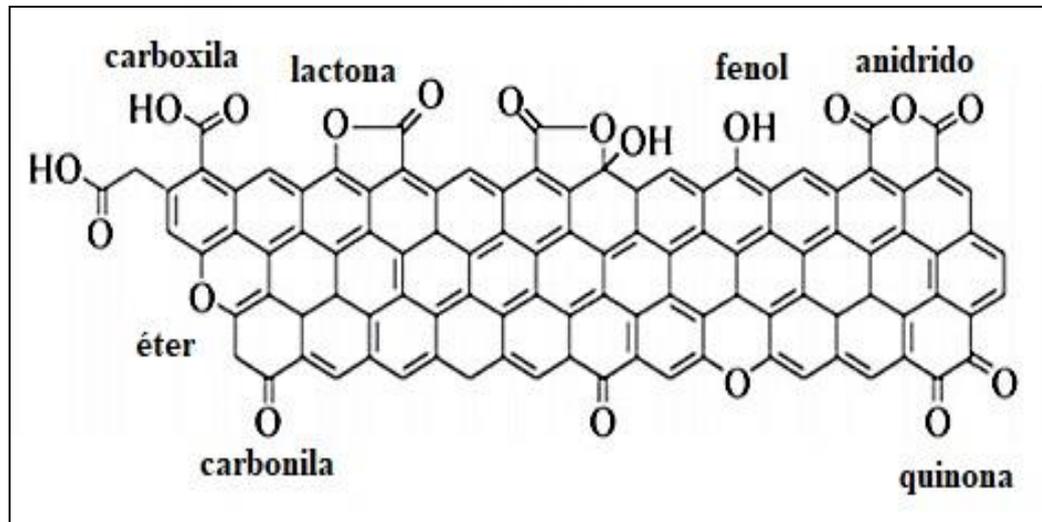
Fonte: CLARK, 2010.

A maior parte da superfície do CA reside na região de microporos, sendo estes os principais responsáveis por sua capacidade de adsorção (RODRÍGUEZ & MOLINA, 2004), proporcionando alta capacidade de adsorção para moléculas de dimensões pequenas, tais como gases e solventes comuns.

Já os mesoporos são importantes na remoção de moléculas grandes, tais como corantes, e proporcionam maior contribuição na área superficial para carvões impregnados com produtos químicos. Por fim, os macroporos não apresentam contribuição significativa para a área superficial, mas são de fundamental importância para a condução do adsorvato na direção dos meso e microporos (BANSAL & GOYAL, 2005; COSTA, 2007).

Constituindo-se basicamente de carbono, o CA forma estruturas grafiticas, sendo que sua superfície contém grupos funcionais oxigenados, tais como álcoois, fenóis e ácidos carboxílicos (OZDEMIR et al., 2014), conforme mostra a Figura 2:

Figura 2 – Representação química dos grupos funcionais presentes na superfície do carvão ativado.



Fonte: Adaptado de NA et al, 2012.

A quantidade e os tipos de grupos funcionais dependem do tipo de ativação (NOWICKI et al., 2015).

## 2.2. O processo de fabricação do carvão ativado

No processo de fabricação do CA há duas etapas: carbonização da matéria-prima e ativação, sendo que no processo de carbonização já ocorrem transformações irreversíveis na matéria prima (BRITO & BARRICHELO, 1981).

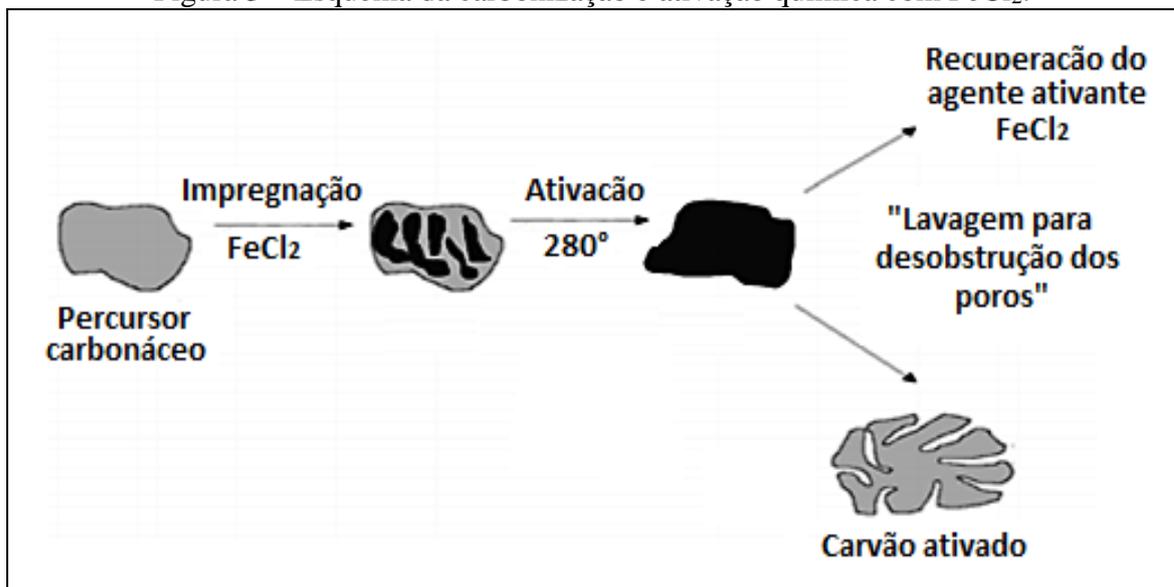
A carbonização consiste na decomposição térmica, conhecida como pirólise, que implica na ruptura de ligações carbono-carbono e na formação de ligações carbono-oxigênio. Durante a carbonização, parte do material carbonáceo é reduzida a carbono a temperaturas acima de  $350^{\circ}\text{C}$ , onde são eliminados os componentes voláteis ( $\text{CO}$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$ ) e espécies não carbônicas, produzindo um resíduo sólido: carvão (SOARES, 2001).

Etapa subsequente à carbonização e indispensável na promoção do aumento de poros do carvão, a ativação consiste na retirada de componentes como naftas, alcatrão e

resíduos orgânicos que possam obstruir os poros (OZDEMIR et al., 2014). São dois os tipos de processo de ativação: ativação física ou química (KATESA et al., 2013).

A ativação química pode ser dada a partir de ácidos ou bases, tais como: carbonato de potássio, hidróxido de potássio (OKMAN et al., 2014), cloreto de zinco (OZDEMIR et al., 2014), ácido fosfórico (GUO & ROCKSTRAW, 2007), cloreto de ferro (PEREIRA et al., 2008), ilustrado na Figura 3:

Figura 3 – Esquema da carbonização e ativação química com  $\text{FeCl}_2$ .



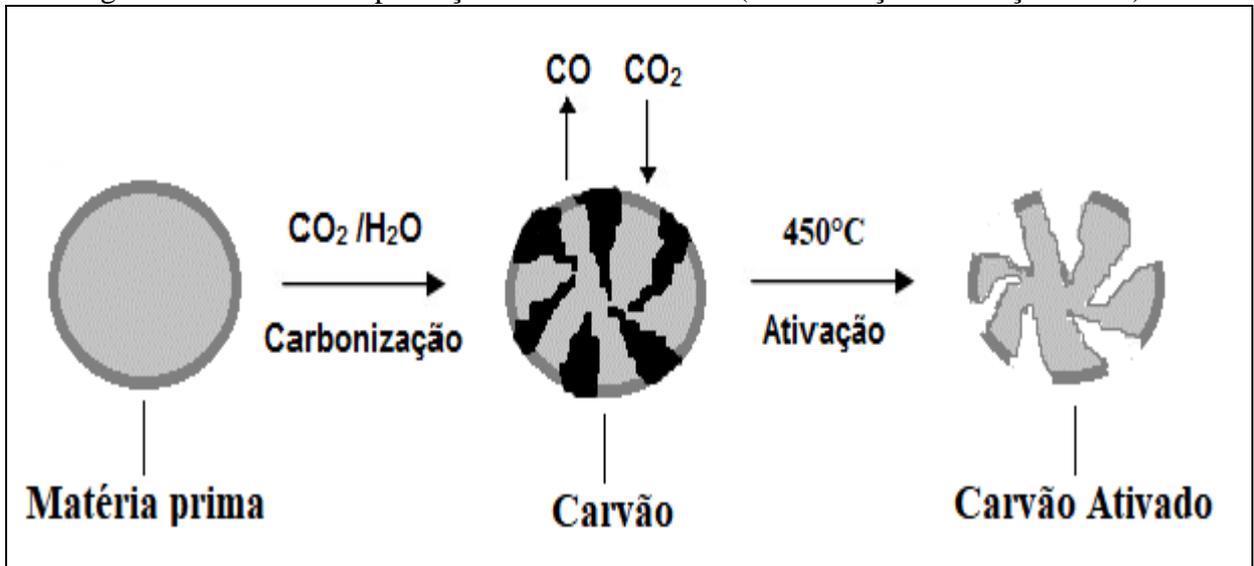
Fonte: Adaptado de PEREIRA et al., 2008.

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

Na ativação física são utilizados gases oxidantes tais como  $\text{CO}_2$  (SHOAIIB & AL-SWAIDAN, 2015) ou vapor de água (SOUSA et al., 1994), podendo-se empregar temperaturas de 450°C, 550°C e 650°C durante o processo (VELÁZQUEZ-TRUJILLO et al., 2010). O processo de ativação por  $\text{CO}_2$  exige uma temperatura mais elevada que o vapor, pois o  $\text{CO}_2$  possui baixa reatividade devido seu tamanho molecular maior, o que impede sua difusão (LI et al., 2015).

A incorporação desses gases (gaseificação física) eleva o volume de poros, ocorrendo remoção de resíduos de decomposição e de material carbonáceo, como representado na Figura 4 (COSTA, 2007).

Figura 4 – Processo de produção de carvão ativado (carbonização e ativação física).



Fonte: Autoria própria

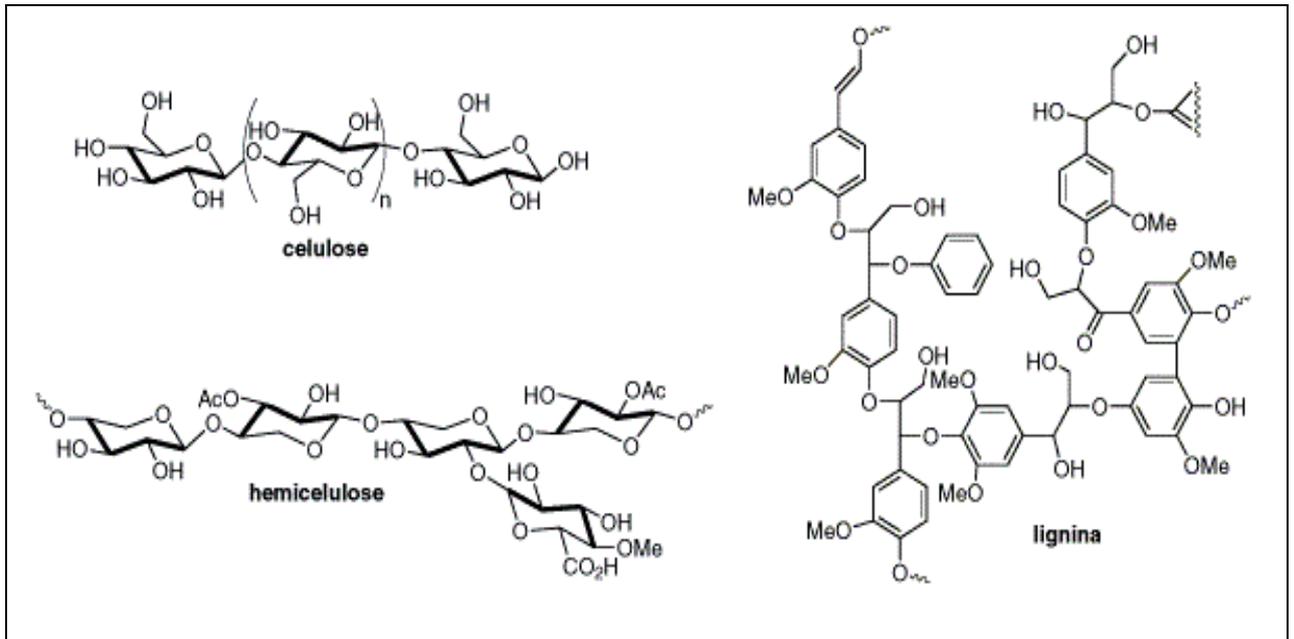
### 2.3. Carvão ativado do endocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata*)

Vários materiais de natureza lignocelulósica podem ser utilizados para fabricação de carvões: madeiras, caroços de frutas, bagaço de cana-de-açúcar, resíduos da indústria têxtil, folhas de plantas, grãos de café, entre outros, com referido destaque ao endocarpo do coco, como no caso do babaçu (*Orbignya phalerata* Mart., Arecaceae) (ANNUNCIADO et al., 2005).

O endocarpo, conhecido como a casca do coco, representa 60% do coco e é matéria-prima para a fabricação de isolantes e para a produção de ácido acético e carvão (PINHEIRO & FRAZÃO, 1995). Outras utilizações deste resíduo advêm do uso do pó das cascas de coco verde, no tratamento de efluentes industriais, para remoção de metais tóxicos (PINO et al., 2006).

A composição química do coco é constituída por alto teor de lignina (50%), celulose (23-43%) e hemicelulose, dando a este material um forte potencial de uso como bioadsorvente (RODRÍGUEZ & MOLINA, 2004) (Figura 5).

Figura 5 – Estrutura química dos principais componentes do coco: lignina, celulose e hemicelulose.



Fonte: Adaptado de FERREIRA et al., 2009.

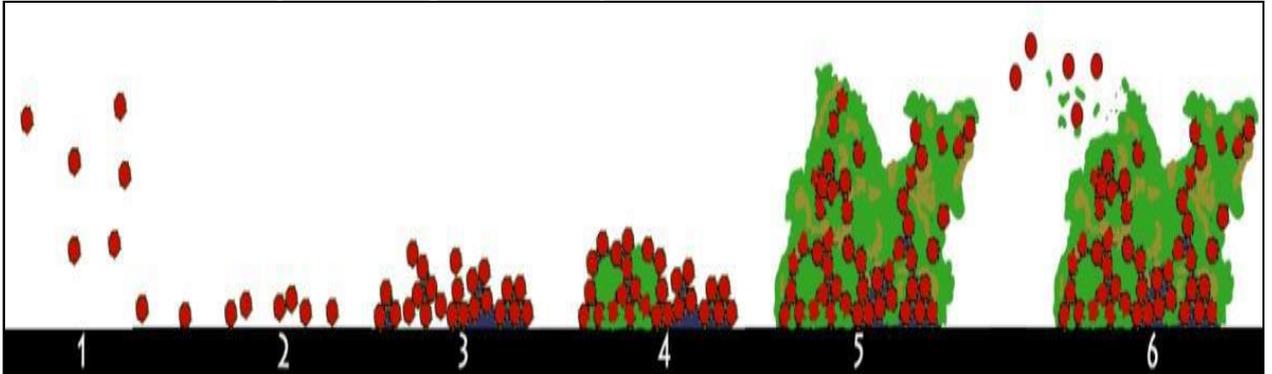
#### 2.4. Biofilmes bacterianos

O crescimento bacteriano era em sua grande maioria, considerado como sendo planctônico, ou seja, em suspensão em meio aquoso (DAVEY & O'TOOLE, 2000). No entanto, já há algum tempo, a maioria dos estudos reconhece que grande parte das populações bacterianas, independentemente do meio em que se encontram (ambiental, alimentar ou médico), está propícia a formar agregados de várias espécies constituindo comunidades de micro-organismos (COSTERTON, 1999; JACOBSEN & SHIRTLIFF, 2011).

Estas comunidades, conhecidas como biofilmes, podem ser definidas como um conjunto de micro-organismos que estão envoltas em uma matriz polimérica auto-produzida, composta de substâncias como polissacarídeos, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA) extracelular, que confere estabilidade estrutural ao biofilme, definida como a matriz do biofilme. Uma vez na forma de biofilme, as bactérias apresentam maior resistência à fagocitose, aos mecanismos de defesa inata e adaptativa do hospedeiro e à terapia antimicrobiana (COSTERTON, 1999; SOTO, 2013).

A formação de um biofilme numa superfície envolve várias etapas, sendo as principais a adesão inicial à superfície seguida da ligação intercelular, como é demonstrado na Figura 6:

Figura 6 – Etapas de formação de biofilme em substrato.



Legenda: 1- as bactérias em modo planctônico; 2- adesão à superfície; 3- crescimento agregado; 4- formação da matriz extracelular; 5- o crescimento celular e liberação de compostos celulares para a matriz formam a estrutura irregular típica dos biofilmes; 6- a liberação de células e da matriz do biofilme maduro para colonização de outras regiões. Fonte: HENRIQUES et al, 2013.

Muito antes de 1970, foi identificada a formação de biofilmes bacterianos, porém apenas em meados de 1999 é que vários estudos se empenharam em identificar e entender os mecanismos de sua formação (COSTERTON et al., 1999). Vários fatores estão envolvidos no desenvolvimento do biofilme, como a temperatura, presença de agentes microbianos, quantidade de inóculo, forças hidrodinâmicas, características do substrato, variação de pH, teor de nutrientes, assim como as concentrações de metabólitos microbianos (NAVES et al., 2008).

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

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

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

Durante o processo de maturação do biofilme, há um aumento pronunciado na quantidade de micro-organismos e materiais polissacarídicos secretados, sendo aumentada a espessura do biofilme (HEYDORN et al., 2000). Quando o biofilme atinge uma determinada massa crítica e o equilíbrio dinâmico é alcançado, as camadas mais externas começam a liberar células em estado planctônico, se dispersando e multiplicando rapidamente e assim colonizam novas superfícies e organizam biofilmes em novos locais (GUPTA et al., 2016).

Os biofilmes têm importância em várias atividades, como a produção de vinagre e de ácido cítrico; em aplicações farmacêuticas pela produção de metabólitos secundários e em processos biológicos, para a extração de metais a partir de minério. Em contrapartida, o crescimento indesejável de biofilmes tem impacto negativo em várias aspectos, como, por exemplo: estragos em equipamentos devido à biocorrosão, contaminação de produtos alimentícios, perdas energéticas relacionadas com o aumento de atrito, diminuição da transferência de calor, perdas de pressão em tubulações e, ou, em equipamentos e perdas significativas para a indústria, em âmbito geral (PIZZOLITTO et al., 2001) e principalmente tornarem-se fontes de contaminação microbiana (GERMANO & GERMANO, 2001), como é o caso dos filtros de água.

Várias espécies bacterianas são capazes de formar biofilmes (COSTERTON et al., 1995). Dentre os agentes patogênicos estão a *Escherichia coli* que representa um dos micro-organismos melhor estudados quanto à formação de biofilmes, *Pseudomonas aeruginosa*, sendo a segunda extensivamente utilizada como modelo para o estudo, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium spp.*, *Listeria monocytogenes* (COSTERTON, 1999; WATNICK & KOLTER, 2000; CHEW & YANG, 2016).

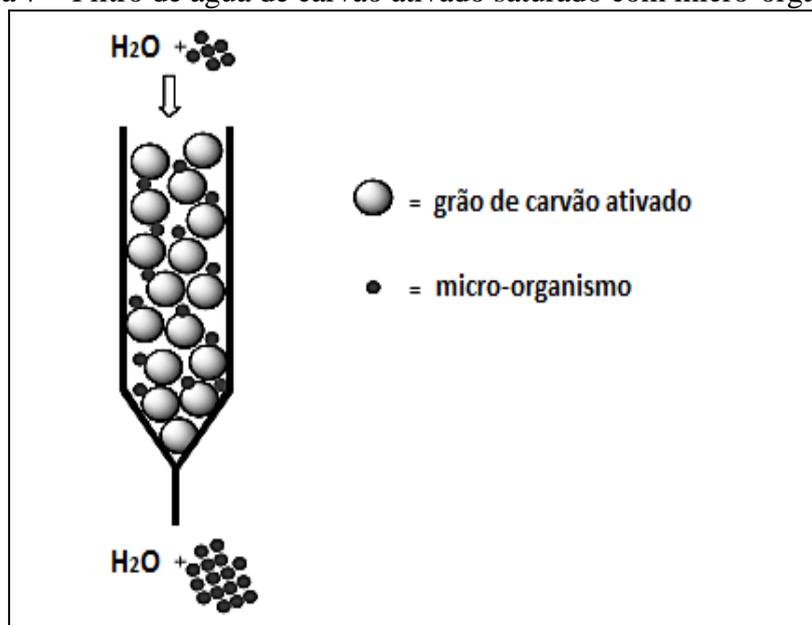
## 2.5. Formação de biofilmes mistos de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* em carvão ativado

A aplicabilidade do CA está relacionada à sua alta porosidade, adsorção rápida e estabilidade térmica (HESAS et al., 2013). Como consequência, são numerosas as aplicações, como na catálise (LIMA et al., 2013), na indústria de alimentos, na medicina (AWWAD et al., 2015), na proteção ambiental para o controle de tratamento de água (LIU et al., 2014) e efluentes (HAFTKA et al., 2004).

Filtros domésticos de CA são capazes de adsorver contaminantes (matéria orgânica) presentes na água de consumo e também removem cloro residual proveniente da estação de tratamento de água (ETA) (HENNING & VON, 2012). No entanto, o CA em meio úmido, pode se tornar propício ao desenvolvimento de micro-organismos patogênicos (NANGMENYI et al., 2009).

A irregularidade, rugosidade e porosidade da superfície do CA fornecem um excelente ambiente para o desenvolvimento e crescimento de biofilmes. A colonização e proliferação bacteriana trazem prejuízos como a diminuição de tempo de vida útil do filtro e, posteriormente, o desprendimento dos micro-organismos da estrutura do CA contaminando a água filtrada (GIBERT et al., 2013; ISLAM et al., 2016), conforme ilustrado na Figura 7:

Figura 7 – Filtro de água de carvão ativado saturado com micro-organismo.



Legenda: H<sub>2</sub>O – Oxigênio. Fonte: Autoria própria.

Na natureza, as bactérias estão frequentemente presentes e associadas entre si na forma de biofilmes, constituindo aglomerados de micro-organismos que formam comunidades compostas por múltiplas espécies ou predominantemente por um tipo específico que aderem a um substrato abiótico ou substrato vivo (WRIGHT et al., 2013), podendo ser denominado como biofilme monoespécie ou biofilme misto (heterotípico) (BANDARA et al., 2009).

Algumas bactérias possuem habilidade de interagir com outras espécies de bactérias por coagregação, que consiste num processo específico, envolvendo interações entre moléculas complementares da superfície bacteriana que funcionariam como adesinas e receptores. Portanto, através destas interações podem-se estabelecer relações entre os micro-organismos que podem ser dadas de modo sinérgico ou antagonista/competição entre os componentes da microbiota associada ao biofilme (KOLENBRANDER, 1988; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002; LEVESQUE et al., 2003; DELEON et al, 2014).

Acredita-se que *Pseudomonas aeruginosa* usam o sistema de *quorum sensing* desempenhando um papel crítico na formação de estruturas maduras e diferenciadas do biofilme (DONLAN & COSTERTON, 2002). De uma forma simplista, este fenômeno baseia-se no fato de certos membros do biofilme utilizarem a secreção de metabólitos que vão agir como sinais de comunicação para os restantes membros da comunidade do biofilme (KIRAN et al., 2008).

Assim, a *Pseudomonas aeruginosa* apresenta uma versatilidade metabólica, sendo capaz de formar biofilmes sob quase todas as condições, enquanto o biofilme de *Escherichia coli* somente os formam se estiverem em meios mínimos suplementados com aminoácidos, ou em meios pobres em nutrientes (WATNICK & KOLTER, 2000). São muitos os mecanismos que regulam a formação destas comunidades (O'GARA, 2007; SMITH & SPATAFORA, 2012).

As propriedades químicas e físicas da superfície do CA e da superfície do biofilme influenciam na fixação e no desenvolvimento do biofilme (CHARACKLIS, 1981). As interações que ocorrem entre esses micro-organismos componentes do biofilme e a superfície em que se alojam, dependem do balanço final entre forças atrativas e repulsivas: interações eletrostáticas e hidrofóbicas, forças de van der Waals e impedimento estérico, geradas entre as duas superfícies (SILVA et al., 2006).

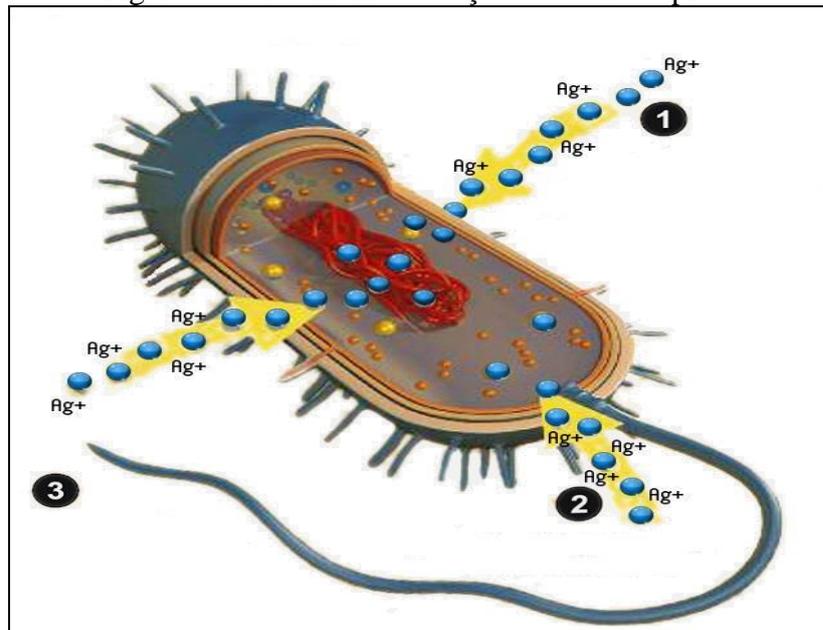
## 2.6. Carvão ativado impregnado com prata

A impregnação do CA com metal é empregada como uma estratégia para se aumentar a eficácia dos filtros devido a ação antimicrobiana de alguns metais (XAVIER et al., 2010). Essa utilização foi proposta por Mitsumori e colaboradores (1977) que descreveram o tratamento do CA com prata com fins purificadores e processos de esterilização e remoção de bactérias na água, porém antes disso, a prata já era impregnada no CA como catalisador na remoção de vapor de mercúrio (MANES, 1968).

Morones et al., (2005) determinaram em suas pesquisas uma concentração mínima para a toxicidade da prata em relação à *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* sendo de  $<75\mu\text{g.mL}$ , demonstrando que íons prata são seletivamente tóxicos para micro-organismos procarióticos, exercendo pequeno efeito sobre células eucarióticas (PARK & JANG, 2003). A prata tem um longo histórico de usos na medicina como agente antimicrobiano e tem sido empregada como um desinfetante de água desde os tempos dos gregos antigos, que o empregavam nos jarros em substituição aos tradicionais feitos de cerâmica (LALLEY et al., 2014; MENDES et al., 2012; TORTORA et al., 2012).

Os mecanismos de ação de íons e das nanopartículas de prata sobre micro-organismos ainda não são bem estabelecidos e diferenciados. Alguns mecanismos têm sido propostos e aceitos para os íons de prata (Figura 8). Acredita-se que ocorra ligação extracelular ou precipitação de prata na parede e membrana celular (BELLANTONE et al., 2002). A parede celular contém peptidoglicano carregado negativamente que provavelmente irá interagir com proteínas celulares, incluindo enzimas por meio de grupos sulfidrílicos (-SH) levando à inativação das proteínas e, conseqüentemente, das bactérias. Estas enzimas são chaves e participam da geração de energia transmembrana e transporte de íons, podendo levar ao bloqueio da respiração e da transferência de elétrons (FENG et al., 2002; KLUEH et al., 2000). Outra opção proposta refere-se à interação da prata com o DNA por meio de deslocamento das ligações de hidrogênio entre as bases purina e pirimidina impedindo a replicação do DNA. Por último, também é aceito que a prata se liga a grupos doadores de elétrons, como aminas, hidroxilas e fosfatos que contêm nitrogênio, oxigênio e enxofre (RODRIGUEZ et al., 2007).

Figura 8 – Mecanismos de ação dos íons de prata.



Legenda:  $\text{Ag}^+$  - Íons de prata; 1- Os íons de prata penetram na membrana celular do organismo; 2- Os íons de prata sufocam o micro-organismo, prejudicando sua respiração; 3- Os íons de prata atacam o DNA, impedindo sua replicação. Fonte: Adaptado de Anatofeet© 2017.

A impregnação de prata na superfície do CA é uma alternativa de preparar filtros de água com ação bactericida e/ou bacteriostática (FONG & WOOD, 2006). Sugere-se que ela iniba a formação de biofilmes na superfície do carvão, evitando a contaminação da água com micro-organismos provenientes destes biofilmes, pois gera um ambiente hostil ao crescimento microbiano (CASAGRANDE, 2010).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar a formação de biofilmes mistos de *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 na superfície do carvão ativado do endocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata*) impregnado com prata.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar as amostras de carvão ativado do endocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata*) por meio da determinação dos teores de cinzas e solúveis, área superficial e granulometria;
- Impregnar o carvão ativado com prata e determinar suas respectivas concentrações através da técnica de absorção atômica;
- Verificar a lixiviação da prata impregnada na superfície do carvão ativado;
- Estudar a formação de biofilmes mistos de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* na superfície das amostras de carvão ativado impregnadas e não impregnada, após a passagem de água desafio inoculada com suspensão desses microorganismos, em meio filtrante de leito fixo;
- Verificar a atividade inibitória em diferentes concentrações de prata impregnada no carvão ativado, na formação de biofilme mistos de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Caracterização do carvão ativado do endocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata*)

O carvão ativado foi fornecido pela empresa Tobasa Bioindustrial de Babaçu S.A., localizada em Tocantinópolis-TO, sendo fabricado através do processo de carboativação física com alta temperatura em processo contínuo e controlado. Todas as amostras foram lavadas com água deionizada para remoção de possíveis resíduos vegetais, sendo posteriormente levadas à chapa de aquecimento a 250°C durante  $\pm 50$  minutos ou até completa secagem. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados expressos em média e desvio padrão.

#### 4.1.1. Determinação do teor de cinzas

Amostras de 1 g do CA foram dispostas em cadinhos para pesagem, sendo posteriormente levadas em mufla a 550°C durante 24 horas. Após esse período de arrefecimento, as amostras foram novamente pesadas para a determinação do teor de cinzas, conforme a norma ASTM D 2866/1994. O cálculo do teor de cinzas foi feito com base na equação:

$$\text{Cinzas totais (\%)}: [(D - B) / (C - B)] * 100, \text{ na qual:}$$

B = Peso do cadinho vazio (g)

C = Peso da amostra original + cadinho (g)

D = Peso da amostra incinerada + cadinho (g)

#### 4.1.2. Determinação de solúveis em água

Amostras de 10 g de CA foram colocadas em balões de fundo redondo, juntamente com 100 mL de água deionizada, sendo posteriormente mantidas sob refluxo durante 15 minutos. Após este intervalo, uma porção de 25 mL de água de lavagem foi transferida do balão volumétrico para cápsula de porcelana (previamente pesada) e levada em chapa de aquecimento a 250°C até completa secagem. Por fim, após arrefecimento, foi realizada a pesagem final da cápsula de porcelana para verificar o aumento de peso, como determinado pela norma ASTM D 5029/1998.

### 4.1.3. Determinação da granulometria

Amostras com 100 g de CA foram submetidas à peneiração com peneiras de 20, 36, 40 e 50 *mesh* da série *Tyler*, as quais foram agitadas por um período de 30 minutos com o objetivo de determinar o diâmetro médio dos poros do CA. Por fim, as quantidades de grânulos de CA que ficaram retidos entre estas peneiras foram pesados segundo as normas da ASTM D 2862/1997.

## 4.2. Impregnação do carvão ativado com prata

### 4.2.1. Preparação das amostras

Foram preparados 100 mL de solução 5 g.mL<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub> que em seguida foi diluída para obtenção de teores em massa de Ag em relação à massa de 20 g de CA de endocarpo de babaçu *Orbignya phalerata* (Tabela 1). As concentrações de AgNO<sub>3</sub> impregnadas na superfície das amostras de CA utilizadas neste estudo foram determinadas com base nos valores de prata (0,03%) em carvão de casca de coco de dendê (*Elaeis guineenses*) utilizada pela empresa Bahiacarbon Bioindustrial Ltda., localizada em Valença-BA.

Posteriormente, as amostras de CA foram impregnadas. Em três cápsulas de porcelana foram adicionados 20 g de CA (cada) e 50 mL das soluções de AgNO<sub>3</sub>, obedecendo às seguintes concentrações em cada cápsula:

Tabela 1 – Distribuição das respectivas concentrações de prata nas amostras de carvão ativado.

Amostras	Ag
CAi <sub>0,01</sub>	0,01%
CAi <sub>0,02</sub>	0,02%
CAi <sub>0,04</sub>	0,04%

Legenda: Ag – prata; CAi – carvão ativado impregnado.

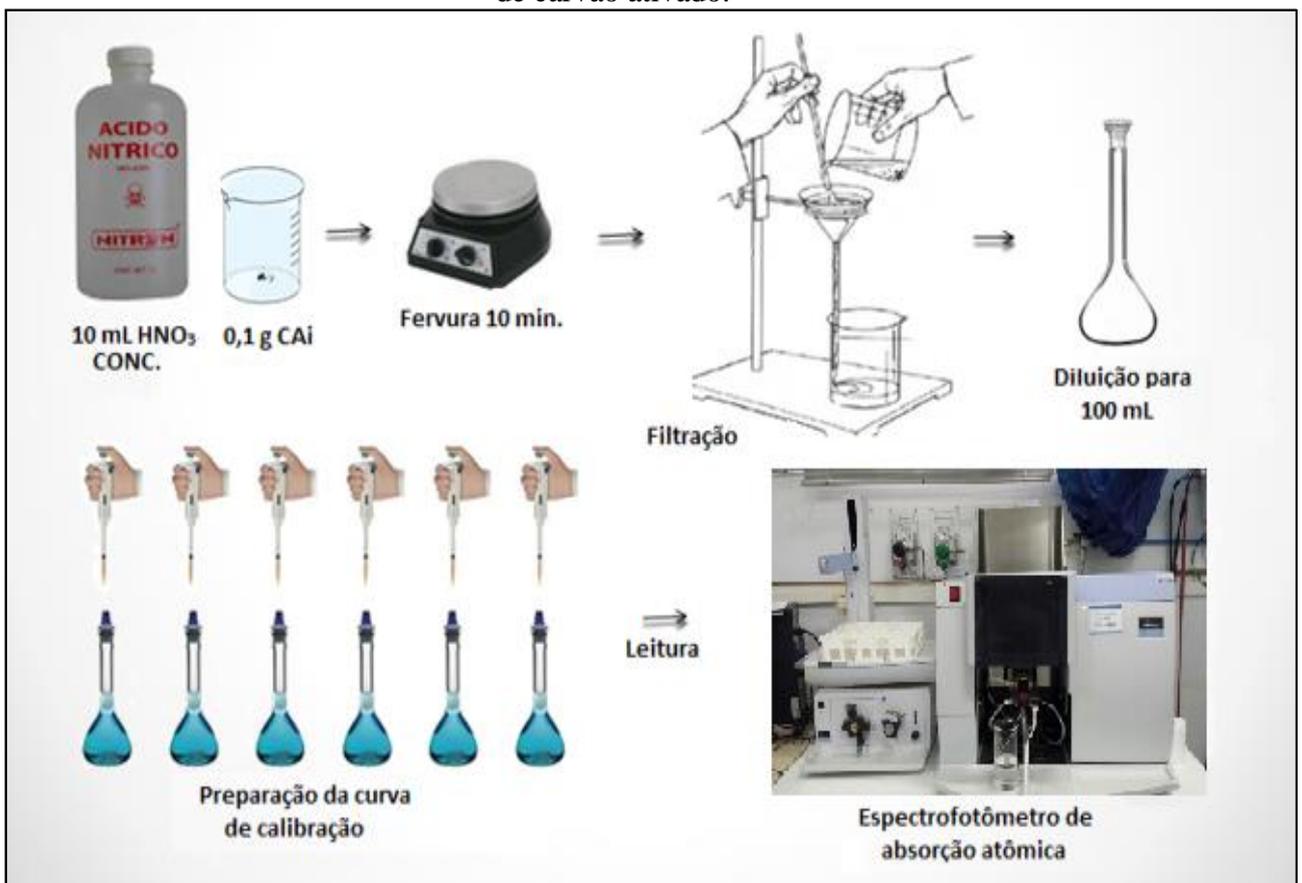
Em sequência, as amostras foram submetidas a aquecimento e agitação até secagem completa, depois transferidas para cadinhos e colocadas em mufla a 550°C durante duas horas a fim de que este metal na forma iônica (Ag<sup>+</sup>) fosse reduzido à forma metálica (Ag<sup>0</sup>) na superfície do CA, conferindo estabilidade da amostra para com o meio reacional.

#### 4.2.2. Determinação da concentração de prata impregnada em carvão ativado por absorção atômica

No ensaio padrão, foram colocadas 0,1 g das amostras de CAi em béqueres com 10 mL de ácido nítrico concentrado (65%) e as suspensões aquecidas até a fervura em chapa de aquecimento a 100°C, durante 10 minutos. Em seguida, cada suspensão foi filtrada e lavada com água deionizada. A solução final recolhida foi diluída para 100 mL com água deionizada em balão volumétrico (Figura 9).

Para a quantificação de metais presentes nos filtrados foram preparadas curvas de calibração (0,05; 0,1; 0,5; 1; 2; 3; 5 e 7 ppm) com a solução padrão de prata ( $1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A concentração de prata impregnada em cada amostra foi determinada em um espectrofotômetro de absorção atômica AAnalyst 400 - Perkin Elmer (Figura 9).

Figura 9 – Metodologia empregada na determinação do teor de prata impregnada nas amostras de carvão ativado.



Legenda: HNO<sub>3</sub> CONC. – ácido nítrico concentrado; CAi – carvão ativado impregnado. Fonte: Autoria própria.

### 4.2.3. Determinação do número de iodo

Foram preparadas e padronizadas soluções de tiosulfato de sódio (0,100 N), solução de iodo padrão (0,100 N) e solução de iodato de potássio (0,100 N) para a execução dos procedimentos a seguir. Em um Erlenmeyer, foram colocados 25 mL de solução de iodo e 1 g de cada amostra de CA, posteriormente as misturas foram submetidas à agitação branda por 30 segundos e deixadas em repouso por 2 minutos.

Em seguida, foi realizada a titulação com a solução de tiosulfato de sódio. A determinação do número de iodo do CA foi realizada em concordância com a norma ASTM D 4607/1994.

### 4.2.4. Determinação da lixiviação de prata em água através de filtros de carvão ativado impregnado

Foram dispostos suportes universais com garras de condensador, anexadas três seringas com capacidade para 60 mL adaptadas com algodão em sua extremidade e inserido 5g de cada amostra de CAi. Para cada uma das amostras, foram realizadas cinco filtrações aplicando 100 mL de água deionizada por vez, nas quais os primeiros 200 mL foram descartados e as três seguintes filtrações foram recolhidas e armazenadas separadamente em balões volumétricos para posterior análise.

Os teores de prata lixiviados nas amostras foram determinados por espectrofotômetro de Absorção Atômica AAnalyst 400 - Perkin Elmer. Previamente à realização das análises, o equipamento foi calibrado com curvas padrão de 1, 2, 5, 7 e 10 ppm com solução padrão de prata ( $1 \text{ g.mL}^{-1}$ ).

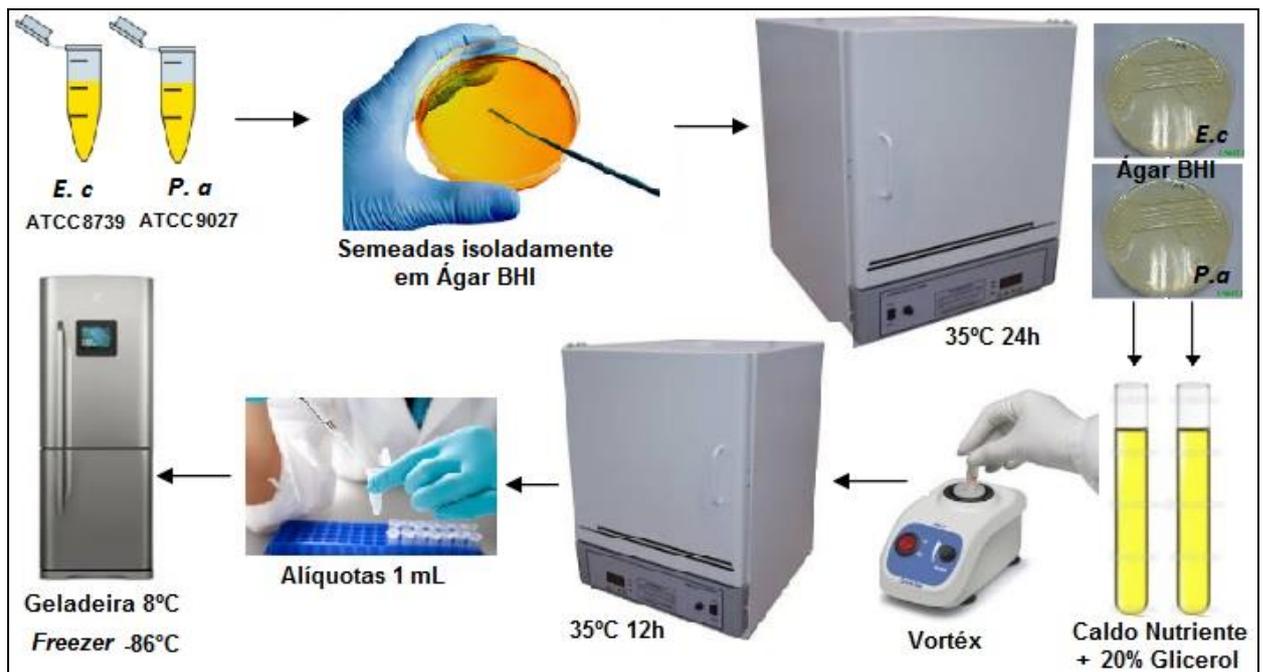
## 4.3. Ensaio microbiológicos

### 4.3.1. Manutenção das cepas

*Escherichia coli* ATCC 8739 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 foram semeadas em ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubadas a 37°C durante 24 horas. Em seguida, foram transferidas de três a cinco colônias isoladas e típicas para um tubo com 15 mL de caldo nutriente + 20 % de glicerol que foi incubado por 12 horas a 37°C. Após esse período, o caldo crescido foi homogeneizado com agitador de tubos para completa

homogeneização e alíquotas de 1 mL foram fracionadas em microtubos *Eppendorf*, previamente esterilizados e devidamente rotulados (rendimento de 15 alíquotas por micro-organismo). Os microtubos foram armazenados em geladeira à 8°C durante sete dias e na semana seguinte foram congelados no *freezer* com temperatura -86°C, conforme esquematizado na Figura 10 (SILVA et al., 2008).

Figura 10 – Método de conservação e reativação das cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.



Legenda: *E. c* – *Escherichia coli*; *BHI* – *Brain Heart Infusion*; *P. a* – *Pseudomonas aeruginosa*. Fonte: Autoria própria.

As cepas foram reativadas a partir das alíquotas congeladas que foram transferidas do *freezer* para a geladeira durante 30 minutos. Em seguida, os microtubos foram deixados até atingirem a temperatura ambiente e os micro-organismos foram inoculados separadamente em ágar *Eosin Methylene Blue* (EMB) Levine, seletivo para bactérias Gram-negativas, durante 24 horas em estufa de cultura FANEM modelo 002 CB a 37°C, antes da realização dos ensaios de formação de biofilme nos filtros de carvão ativado.

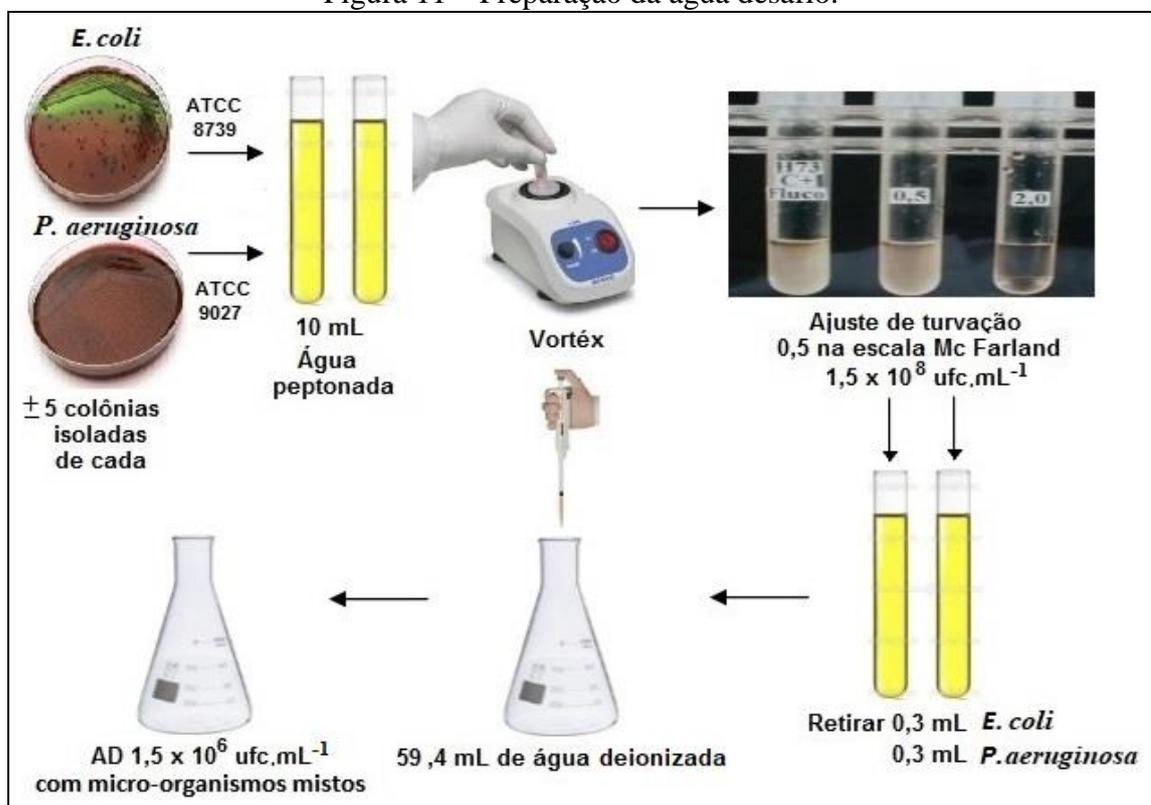
#### 4.3.2. Preparação da Água Desafio

Colônias isoladas e típicas de cada bactéria crescida no ágar EMB foram suspensas separadamente em 10 mL de água peptonada estéril e os inóculos ajustados de acordo com a escala 0,5 McFarland ( $1,5 \times 10^8$  ufc.mL<sup>-1</sup>). Em seguida, 0,3 mL de ambos os

caldos crescidos foram transferidos em conjunto para um Erlenmeyer contendo 59,4 mL de água deionizada esterilizada, conforme esquematizado na Figura 11.

Os inóculos microbianos da água desafio (AD) foram ajustados para se aproximarem dos valores preconizados pela norma ABNT NBR 16098/2012 e portaria INMETRO 394/2014 para critérios de eficiência bacteriológica que estabelece um mínimo de  $1 \times 10^5$  e máximo de  $9 \times 10^6$  ufc.mL<sup>-1</sup> para *Escherichia coli* e um mínimo de  $1 \times 10^4$  e máximo de  $9 \times 10^5$  ufc.mL<sup>-1</sup> para *Pseudomonas aeruginosa*, sendo feita a verificação do inóculo com a diluição e contagem dos micro-organismos presentes na AD antes da realização dos ensaios de filtração.

Figura 11 – Preparação da água desafio.



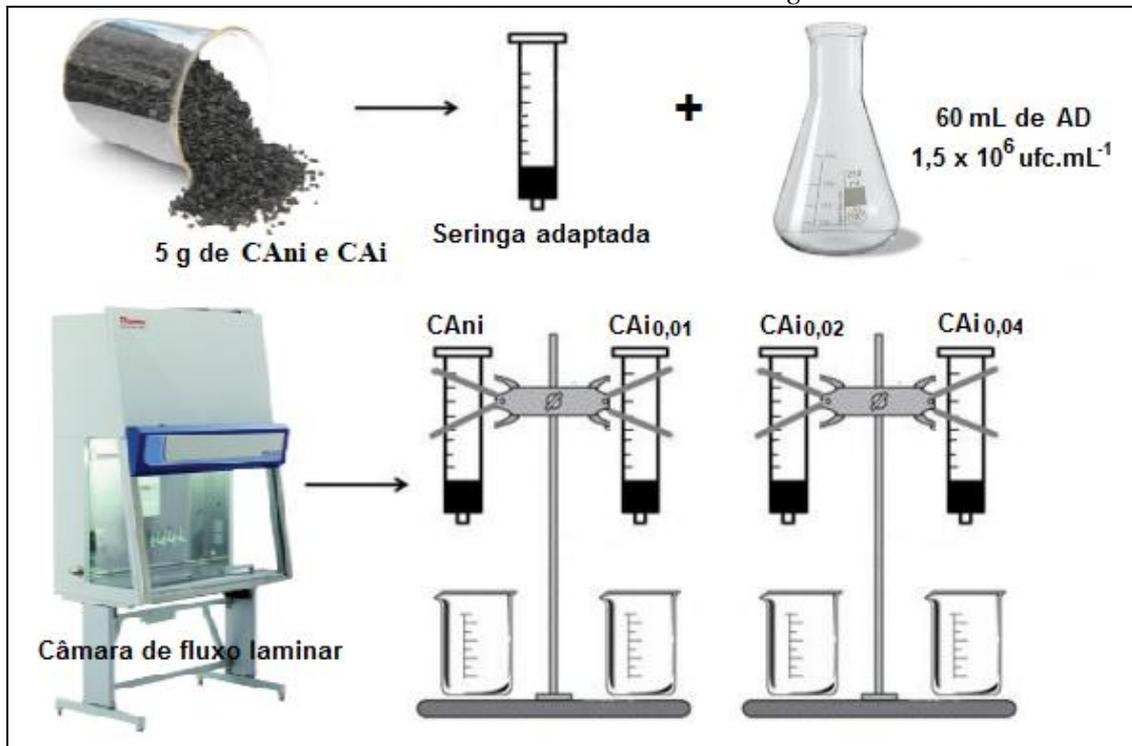
Legenda: AD – Água desafio; *E.coli* – *Escherichia coli*; *P.aeruginosa* – *Pseudomonas aeruginosa*; ufc.mL<sup>-1</sup> – unidade formadora de colônia por mL<sup>-1</sup>. Fonte: Autoria própria.

#### 4.3.3. Preparação dos filtros de leito fixo com carvão ativado

Seringas esterilizadas de 60 mL foram adaptadas com algodão em suas extremidades e fixadas em suportes universais com garras de condensador em câmara de fluxo laminar. Foram adicionados 5 g de cada uma das amostras de CA, impregnadas com prata (CAi) e não impregnadas (CANi) nas seringas. O sistema foi montado de forma que as

seringas permanecessem suspensas sobre béqueres para recolhimento do filtrado. Logo após, as AD previamente preparadas foram adicionadas simultaneamente em cada filtro piloto e filtradas por aproximadamente 50 minutos (Figura 12).

Figura 12 – Preparo dos filtros piloto para posterior filtração da suspensão bacteriana mista de *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.



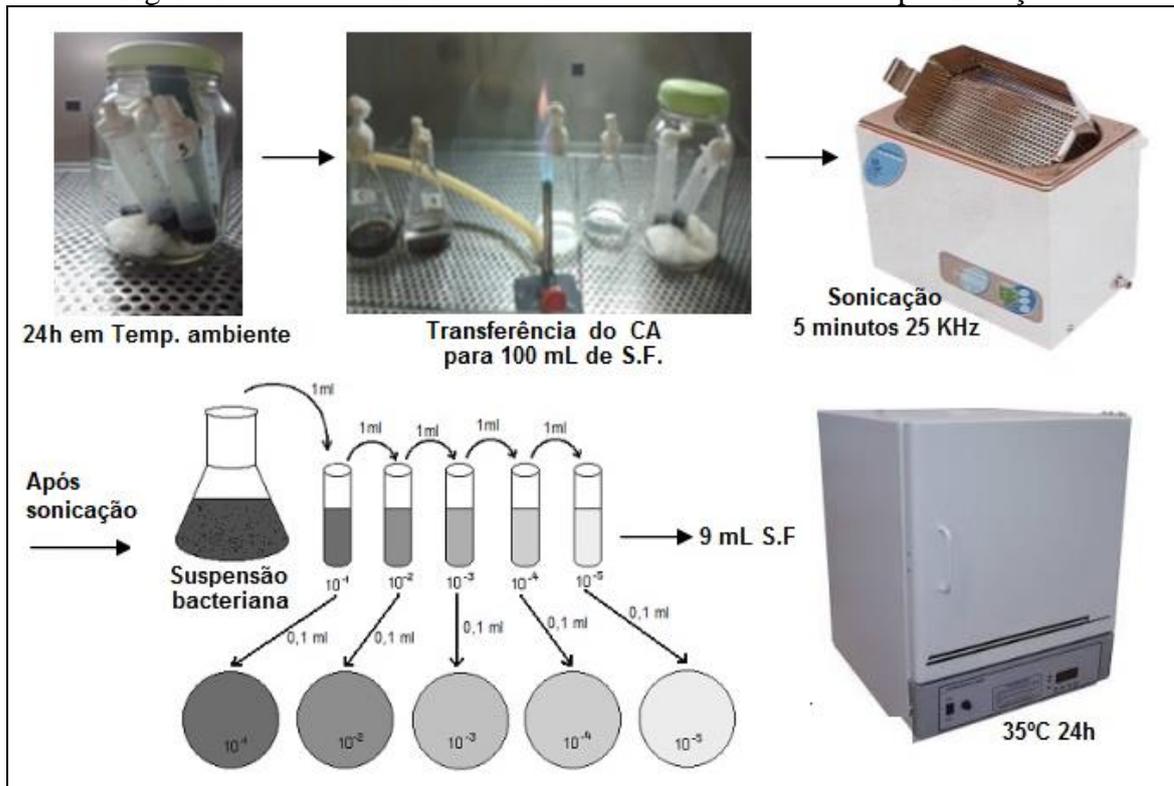
Legenda: AD – água desafiada; CAi – carvão ativado impregnado; CAi<sub>0,01</sub> – 0,01% de Ag; CAi<sub>0,02</sub> – 0,02% de Ag; CAi<sub>0,04</sub> – 0,04% de Ag; CAi – carvão ativado não impregnado; ufc.mL<sup>-1</sup> – unidade formadora de colônia por mL<sup>-1</sup>. Fonte: Autoria própria.

#### 4.3.4. Processamento das amostras de carvão ativado

Após a filtração completa, as seringas foram mantidas em câmara úmida durante 24 horas à temperatura ambiente. As amostras de CA foram transferidas para Erlenmeyers contendo 100 mL de solução fisiológica e submetidas a sonicação em banho-ultrassônico UNIQUE modelo USC 1 450 por 5 minutos, na frequência de 25 KHz para o desprendimento do biofilme microbiano da superfície do CA e quantificação das bactérias desprendidas das superfícies do CA, por meio da diluição seriada e plaqueamento (Figura 13).

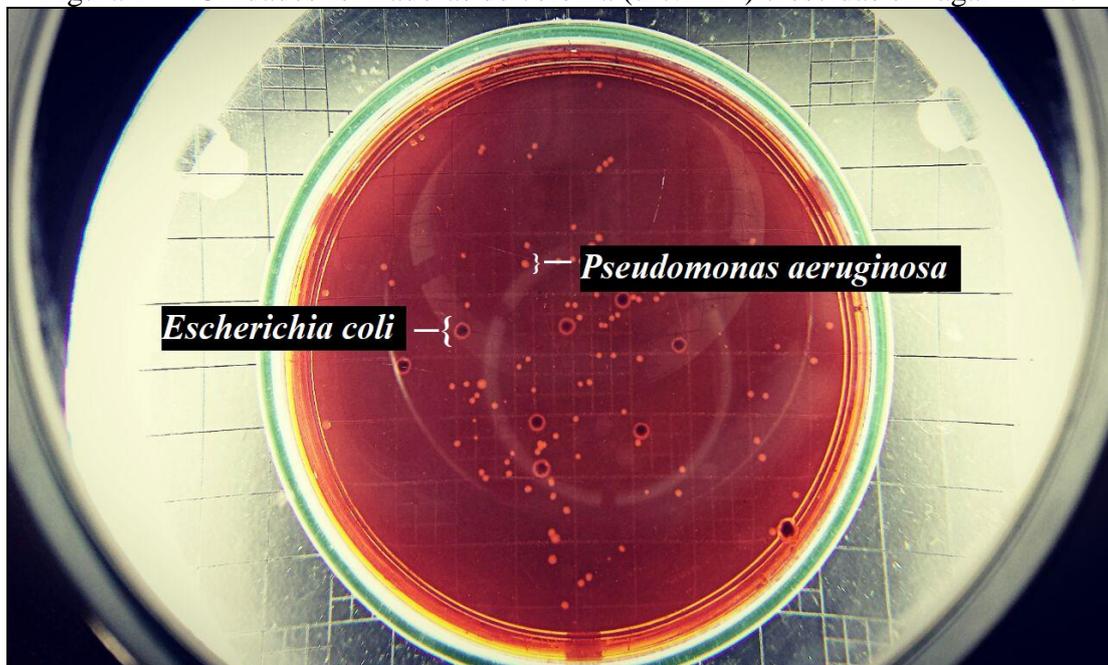
As placas foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por 24 horas. As unidades formadoras de colônia (ufc.mL<sup>-1</sup>) crescidas foram contadas e consideradas apenas placas contendo entre 30 e 300 colônias (Figura 14).

Figura 13 – Processamento das amostras de carvão ativado após filtração.



Legenda: CA – carvão ativado; KHz – Khertz; S.F. – solução fisiológica. Fonte: Autoria própria.

Figura 14 – Unidades formadoras de colônia (ufc.mL<sup>-1</sup>) crescidas em ágar EMB.



Fonte: Autoria própria.

#### 4.4. Análise estatística dos dados

Os testes químicos e microbiológicos foram reproduzidos em triplicata em ensaios independentes. A contagem das células desprendidas na sonicação foram convertidas para escala logarítmica de base 10 e analisadas descritivamente por meio de cálculos das médias e dos desvios padrão.

Para as análises estatísticas dos dados foi aplicado o programa *RStudio 1.0.143*. na comparação das médias da massa de iodo adsorvida em carvão ativado e na formação de biofilmes microbianos realizando a Análise de Variância (ANOVA *one way*) entre amostras de CA<sub>ni</sub> vs CA<sub>i</sub> e entre os tratamentos de CA<sub>i</sub> vs CA<sub>i</sub>, como também o teste de comparação de médias, teste Tukey, com 95% de confiança, sendo significativo um  $p \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterizações do carvão ativado do endocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata*)

Na Tabela 2 verifica-se que a média do teor de cinzas foi de 8,10%. Os resultados foram semelhantes aos encontrados por Martinez et al. (2011) de 8,9% em massa do CA granular de babaçu, no entanto, divergiram dos valores encontrados por Reis et al. (2015) com teor de 3,61% em amostra de CA do endocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata martius*).

Tabela 2 – Análise das características do carvão ativado do endocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata*).

<b>CAni</b>	<b>Cinzas (%)</b>	<b>Solúveis (%)</b>
1	9,29	0,23
2	7,24	0,19
3	7,79	0,35
<b>MED±DP</b>	<b>8,10±0,88</b>	<b>0,26±0,07</b>

Legenda: CAni – carvão ativado não impregnado; DP – desvio padrão; MED – média.

Em outras análises realizadas com CA obtidos de outros precursores, Oliveira (2014) encontrou 2% e 1,24% de cinzas totais em amostras de CA de casca de coco verde (*Cocos nucifera*), enquanto que Pinto et al. (2013) obtiveram 8,4% em massa do CA de caroço de buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.).

O elevado teor de cinzas pode influenciar negativamente na capacidade de adsorção dos materiais, podendo estar relacionado com o processo de ativação e ao fato dos compostos inorgânicos presentes no material de partida ficarem retidos (occlusos ou ligados ao material carbonáceo) após o processo de pirólise, não sendo lixiviados no processo de lavagem (RAMOS et al., 2009).

De acordo com Oliveira et al. (1982) e Arantes et al. (2013), o teor de cinzas é a massa do resíduo sólido inorgânico existente. Segundo esses mesmos autores, o carvão vegetal retém todas as cinzas da matéria prima de origem, podendo conter cinzas compostas, principalmente, de cálcio, potássio e fósforo, além de magnésio, ferro e silício. Carvões ativados de endocarpo do coco comerciais apresentam teores de cinzas de 4% em massa (Carvão Ativado Granular – Calgon Carbon®, 2013 - mostrado em Anexo 1). Acredita-se que o teor de cinzas determinado no presente trabalho esteja superior ao comercial devido ao

processo de ativação utilizado pela indústria fabricante do carvão, contudo o valor apontado apresenta pouca interferência na aplicabilidade deste carvão em filtros de água domésticos.

Na determinação de solúveis em água de lavagem do CA do endocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata*) pequenas quantidades de substâncias solúveis foram identificadas, sendo em média 0,26%, como acurado na Tabela 2. Este resultado indica que praticamente todos os componentes do CA estudado são insolúveis em água, o que não compromete a eficácia e funcionalidade do carvão em filtros de água.

O baixo valor encontrado no presente trabalho, pode ser devido à lavagem precedente realizada na amostra total de CA (item 4.1.), onde Barbosa et al. (2014) menciona o mesmo procedimento com a finalidade de remoção dos compostos solúveis em água. Em estudos semelhantes, Oliveira (2014) determinou um teor de solúveis de 0,19% em água de lavagem de CA de casca de coco de dendê (*Elaeis guineensis*) e Sebastiany (2015) avaliou uma quantidade de substâncias solúveis de 0,33% presentes em amostras de CA também gerado da mesma matéria-prima (casca de coco de dendê).

Pode-se inferir que a quantidade de substâncias solúveis irá variar de acordo com a forma de preparo e ativação, onde pode ocorrer a formação de óxidos de minerais que se prendem nos poros do CA, como também poderá ser influenciada pela localização de origem da matéria-prima utilizada em sua fabricação. O teor de solúveis está diretamente relacionado com o teor de cinzas, já que os mesmos óxidos metálicos, carbonatos, sulfatos e cloretos podem formar sais solúveis em água (GUIMARÃES, 2006; OLIVEIRA, 2014).

Na análise de granulometria, as maiores porções de carvão ativado (95%) ficaram entre as peneiras de 20 (0,84 mm) e 40 (0,42 mm) *mesh*, 65% na peneira de 20 *mesh*, 17% na peneira de 36 *mesh*, 13% na peneira de 40 *mesh* e 5% na peneira de 50 *mesh*, estando em concordância com a granulometria do CA utilizado neste estudo e informada pela Tobasa Bioindustrial de Babaçu S.A. (20x40 *mesh*).

Esta granulometria encontrada está entre as mais comuns e utilizadas na filtração de água com carvão ativado. Dentre elas têm-se: 6 x 12 / 8 x 16 / 8 x 30 / 12 x 25 / 12 x 40 / 20 x 40 / 20 x 50 / 30 x 60 / 40 x 80 *mesh*, como por exemplo o CA do endocarpo do coco utilizado comercialmente pela Calgon Carbon® que possui granulometria 20x50 *mesh* (Anexo 1).

Além de apresentar elevada área superficial, a granulometria 20 x 40 *mesh* cumpre com as necessidades para uso em filtração de água, como a distribuição de grãos homogêneos, favorecendo a compactação do CA quando utilizados em filtros de água (REIS et al., 2015). Tais valores obtidos representam-se adequados para aplicação em filtros por gravidade, uma vez que para grãos com diâmetros inferiores, a filtração ocorre muito lentamente e para grãos com diâmetros superiores, a filtração ocorre rapidamente e a adsorção de impurezas não é efetiva (NIEDERSBERG et al., 2015).

## **5.2. Impregnação de prata no carvão ativado**

As concentrações de prata selecionadas para a impregnação do CA foram escolhidas com base na prata utilizada pela empresa Bahiacarbon Bioindustrial Ltda., que emprega um valor de 0,03% e também na literatura, onde Mie et al., (2014) citam a eficiência antimicrobiana das nanopartículas de Ag, revelando que as mesmas apresentam grande potencial contra bactérias Gram-negativas. Comercialmente a prata é utilizada numa concentração de 0,08% impregnada no CA dos filtros de água domésticos.

Em um estudo similar em que CAi com prata é utilizado, Srinivasan et al. (2013) utilizaram nanopartículas de prata impregnadas no CA a 1% em massa para remoção de *Escherichia coli* no processo de desinfecção de água e alcançaram resultados eficazes, no qual as nanopartículas mostraram um grande potencial, assegurando uma mortalidade de agentes patogênicos nocivos na água potável.

Uma concentração menor poderia impactar indústrias utilizadoras do recurso da impregnação do CA com prata em filtros de água domésticos, podendo modificar as concentrações utilizadas, tendo em vista possíveis resultados encontrados neste trabalho.

### **5.2.1. Determinação da concentração de prata impregnada em carvão ativado**

Na Tabela 3, verifica-se a porcentagem de prata impregnada na superfície do CA. Observa-se que o método de impregnação atingiu a porcentagem esperada para cada amostra utilizada, assim como CANi apresentou valores abaixo dos limites de detecção para Ag, comprovando a ausência de prata nas amostras separadas para impregnação.

Tabela 3 – Determinação da porcentagem de prata impregnada no carvão ativado por espectrofotometria de absorção atômica.

% Impregnação de Ag no CA		
Amostras	MED±DP	EP
CAni	<LD	-
CAi <sub>0,01</sub>	0,0180±0,0022	0,0010
CAi <sub>0,02</sub>	0,0218±0,0003	0,0001
CAi <sub>0,04</sub>	0,0453±0,0006	0,0003

Legenda: Ag – prata; CA – carvão ativado; CAi – carvão ativado impregnado; CAi<sub>0,01</sub> – 0,01% de Ag; CAi<sub>0,02</sub> – 0,02% de Ag; CAi<sub>0,04</sub> – 0,04% de Ag; CAni – carvão ativado não impregnado; EP – erro padrão; <LD – abaixo do limite de detecção.

### 5.2.2. Determinação do número de iodo

A norma ABNT EB 2133/1991 determina para o CA que o número de iodo (I) seja no mínimo 600 mgI<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup>. Nos ensaios realizados foi obtido um valor mínimo de 1200,70 mgI<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup> e máximo de 2158,51 sendo considerados satisfatórios para o presente estudo (Tabela 4).

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

Amostras	Massa de iodo adsorvida em CA (mgI <sub>2</sub> .g <sup>-1</sup> )
	MED±DP
CAni	2158,51±18,54
CAi <sub>0,01</sub>	1505,52±33,99 <sup>a</sup>
CAi <sub>0,02</sub>	1200,70±1,38 <sup>ab</sup>
CAi <sub>0,04</sub>	1220,62±161,37 <sup>ab</sup>

Legenda: CA – carvão ativado; CAi – carvão ativado impregnado; CAi<sub>0,01</sub> – 0,01% de Ag; CAi<sub>0,02</sub> – 0,02% de Ag; CAi<sub>0,04</sub> – 0,04% de Ag; CAni – carvão ativado não impregnado; DP – desvio padrão; MED – média; mgI<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup> – miligrama de Iodo por grama de carvão ativado; <sup>a</sup> Diferenças significativas entre CAni vs CAi (p<0,05); <sup>b</sup> Diferenças significativas entre CAi<sub>0,01</sub> vs demais CAi (p<0,05).

O número de iodo é um dos parâmetros estabelecidos pela norma ABNT EB 2133/1991 e está relacionado com a adsorção de moléculas de pequeno peso molecular (DI BERNARDO & DANTAS, 2006), sendo usado como indicador da capacidade adsorviva do CA e como um índice representativo da quantidade de microporos presente na amostra de carvão (BRANDÃO & SILVA, 2006).

Na Tabela 4, pode-se observar que o CAni apresentou em média uma massa de 2158,51 mgI<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup> de iodo adsorvido, ou seja, uma massa demasiadamente superior ao mínimo estabelecido indicando que o CA do endocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata*) possui

extensa área superficial, sendo confirmado pela alta quantidade de iodo adsorvido pelo carvão.

A impregnação de metais à superfície do CA ocasiona uma obstrução de poros, diminuindo assim a área superficial interna (YANG et al., 2012) e como pode ser observado, os valores das massas de iodo adsorvidas pelos CAis foram baixos, chegando a quase metade do valor adsorvido por CAni. Estatisticamente, houve diferença significativa na comparação das médias entre CAni vs CAi, como também CAi<sub>0,01</sub> vs CAi<sub>0,02</sub> e 3. Porém, os resultados obtidos mostraram que não há diferenças significativas entre CAi<sub>0,02</sub> e CAi<sub>0,04</sub>.

Estes resultados mostram a influência do processo de impregnação sofrido pelo CAi, entretanto o metal impregnado não alterou de forma significativa a área superficial do carvão, permanecendo com uma eficiente capacidade adsortiva e ainda dentro das normas estipuladas pela ABNT EB 2133/1991.

### 5.2.3. Determinação da lixiviação de prata em água através de filtros de carvão ativado impregnado

Para cada uma das amostras (CAni, CAi<sub>0,01</sub>, CAi<sub>0,02</sub> e CAi<sub>0,04</sub>), foram realizadas cinco filtrações, sendo as duas primeiras descartadas e as três seguintes recolhidas (conforme descrito no item 4.2.4.). Os resultados em massa de prata lixiviadas para água nos experimentos de filtração, utilizando filtros gravitacionais contendo amostras de CA impregnadas prata, para a terceira, quarta e quinta filtração, seguem na Tabela 5:

Tabela 5 – Teor de prata lixiviada do carvão ativado.

Amostras	Filtrações						MED±DP	
	Terceira		Quarta		Quinta			
	mg.L <sup>-1</sup>	%						
CAni	<LD	-	<LD	-	<LD	-	<LD	-
CAi <sub>0,01</sub>	<LD	-	<LD	-	<LD	-	<LD	-
CAi <sub>0,02</sub>	<LD	-	<LD	-	<LD	-	<LD	-
CAi <sub>0,04</sub>	0,006	0,0006	0,005	0,0005	0,004	0,0004	0,0050±0,0010	0,0005±0,0001

Legenda: CAi – carvão ativado impregnado; CAi<sub>0,01</sub> – 0,01% de Ag; CAi<sub>0,02</sub> – 0,02% de Ag; CAi<sub>0,04</sub> – 0,04% de Ag; DP – desvio padrão; MED – média; mg.L<sup>-1</sup> – miligrama por litro; <LD – abaixo do limite de detecção.

Estes resultados mostram que todos os filtros produzidos com suas respectivas amostras atenderam aos critérios estabelecidos pela ABNT NBR 16098/2012 e pela Portaria

2914/2011 quanto à concentração de metal presente na água filtrada, que preconiza valores limites máximos de 0,10 mg.L<sup>-1</sup> de prata.

A lixiviação é o processo de remoção de espécies químicas que não estão presas à estrutura da amostra (CHEN et al., 2015). No presente estudo, o carvão ativado passa pelo processo de impregnação de Ag à sua superfície. Partes dessa Ag impregnada não se fixa totalmente à estrutura do carvão, sendo desprendida e liberada durante as primeiras filtrações de água.

Nas amostras CA<sub>ni</sub>, não foi detectado percentual de lixiviação em nenhuma das filtrações apresentadas na Tabela 5, demonstrando mais uma vez a ausência de Ag na amostra controle. Nas amostras CA<sub>i0,01</sub> e CA<sub>i0,02</sub>, o percentual de lixiviação de Ag ficou abaixo do limite de detecção em todas as filtrações, não sendo detectado possivelmente devido à baixa concentração de prata impregnada (0,01% e 0,02%). Já em CA<sub>i0,04</sub>, comparando a terceira filtração com a quinta, observa-se que com a sequência de filtrações a Ag lixiviada diminui constantemente. A terceira filtração obteve um percentual de 0,0006%, enquanto que a quinta obteve 0,0004% de teor em massa de Ag lixiviada, mostrando que a medida que a água é filtrada, o metal vai se desprendendo da superfície do CA em menor quantidade.

Sendo assim, é recomendado o descarte das primeiras 200 mL de água que será filtrada no CA<sub>i</sub>, processo este chamado de pré-lavagem do meio filtrante. Essas quantidades de metal lixiviado serão reduzidas até não serem mais liberadas. A perda de metal deixa a superfície do CA desprotegida, susceptível à formação de biofilmes microbianos, porém no presente trabalho foi verificado um valor mínimo de metais lixiviados (0,0005% de Ag) em relação ao teor impregnado (0,04% de Ag).

### **5.3. Ensaio microbiológicos**

#### **5.3.1. Contagem de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* nas amostras de água desafio**

A contagem dos micro-organismos nas suspensões bacterianas obtidas na água desafio foi realizada conforme descrito no item 4.3.2., A suspensão inicial obteve uma quantidade média de 5,15±0,47 Log<sub>10</sub> ufc 100 mL<sup>-1</sup> para *Escherichia coli* e de 5,96±0,24 Log<sub>10</sub> ufc 100 mL<sup>-1</sup> para *Pseudomonas aeruginosa*.

Os resultados encontrados nos inóculos de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* nas amostras de água desafio estão próximos aos preconizados pela norma ABNT NBR 15176/2004 e Portaria INMETRO 394/2014 que determina a variação de 5 a 6,95 Log<sub>10</sub> ufc em 100 mL<sup>-1</sup> de água para *Escherichia coli* e 4 a 5,95 Log<sub>10</sub> ufc em 100 mL<sup>-1</sup> de água para *Pseudomonas aeruginosa*, nos ensaios de controle microbiológico. A verificação do inóculo ajustado nas amostras de água desafio se torna importante ao passo que determina quais as quantidades de micro-organismos que estão presentes na suspensão inicial.

### 5.3.2. Formação de biofilme por *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* em meio filtrante de leito fixo e sua inibição por carvão ativado impregnado com prata

A contagem de células viáveis associadas à formação de biofilme misto de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* na superfície do carvão ativado das amostras estudadas estão apresentadas na Tabela 6:

Tabela 6 – Quantificação de células viáveis de *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 associadas ao biofilme formado nas amostras de carvão ativado empregadas.

Amostras	Log <sub>10</sub> ufc.5g <sup>-1</sup> de CA (MED±DP)	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
CAni	4,66±0,40	6,26±0,37
CAi <sub>0,01</sub>	NHC	5,08±0,41 <sup>ab</sup>
CAi <sub>0,02</sub>	NHC	3,67±0,44 <sup>ab</sup>
CAi <sub>0,04</sub>	NHC	NHC

Legenda: CA – carvão ativado; CAi – carvão ativado impregnado; CAi<sub>0,01</sub> – 0,01% de Ag; CAi<sub>0,02</sub> – 0,02% de Ag; CAi<sub>0,04</sub> – 0,04% de Ag; CAni – carvão ativado não impregnado; DP – desvio padrão; MED – média; NHC – não houve crescimento; ufc.5g<sup>-1</sup> – unidade formadora de colônia por 5 gramas de carvão ativado; <sup>a</sup> Diferenças significativas entre CAni vs CAi (p< 0,05); <sup>b</sup> Diferenças significativas entre CAi<sub>0,01</sub> vs CAi<sub>0,02</sub> (p<0,05).

O carvão ativado apresenta uma superfície porosa de elevada área superficial que favorece a colonização, proliferação de micro-organismos e posterior formação de biofilme. Ao se alojarem na estrutura, os micro-organismos se alimentam da matéria orgânica presente no carvão, secretam polissacarídeos, se reproduzem e formam o biofilme (ZHANG et al., 2011). A formação de biofilmes com a associação entre estas duas bactérias Gram-negativas foi significativa, sendo que estes micro-organismos foram submetidos a baixos teores de nutrientes.

Foi observado que após a passagem da água desafio e incubação das amostras, houve formação de biofilme com valores médios de 4,66 Log<sub>10</sub> ufc.5g<sup>-1</sup> de *Escherichia coli* e 6,26 Log<sub>10</sub> ufc.5g<sup>-1</sup> de *Pseudomonas aeruginosa* em carvão ativado não impregnado. Todas as amostras impregnadas (CAi), apresentaram significativas inibições do biofilme misto: para *Escherichia coli* ATCC 8739, as amostras CAi<sub>0,01</sub>, CAi<sub>0,02</sub> e CAi<sub>0,04</sub> apresentaram total inibição de biofilme, ao contrário de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 demonstra uma relação concentração-dependente observada com a diminuição de Log formado à medida que se aumenta a concentração de Ag impregnada no CA.

Os ensaios realizados se adequam aos critérios estabelecidos pela norma ABNT NBR 15176/2004 e Portaria INMETRO 394/2014. Inibições significativas foram verificadas ao comparar as amostras CAni com as amostras CAi, assim como CAi vs CAi. Analisando os dados da Tabela 6, verifica-se que a inativação completa de *Escherichia coli* e a redução gradual de Log em *Pseudomonas aeruginosa*, sendo possível considerar que à medida que a concentração do metal aumentava o número de colônias da bactéria diminuía: CAi<sub>0,01</sub>, apresentou redução de 1,18 Log (18,8%), CAi<sub>0,02</sub> exibiu redução de 2,59 Log (58,6%), chegando por fim na completa inativação em CAi<sub>0,04</sub>.

Zhao et al. (2013) avaliaram o efeito antimicrobiano de prata (0,97% em massa) em *Escherichia coli*, e observaram um efeito bactericida para este micro-organismo em que todas as células foram inativadas. Os presentes resultados demonstram inibição total no crescimento de *Escherichia coli* para teores em massa de 0,01%, 0,02% e 0,04% de Ag. O efeito antimicrobiano observado nesta pesquisa apresentou a mesma inibição completa de micro-organismos quanto os resultados de Zhao et al. (2013), que utilizou teores de Ag de 0,97% em massa, praticamente vinte cinco vezes acima dos teores de Ag aplicados neste trabalho. O que sugere que com baixos teores de metal, a inibição do crescimento bacteriano para *Escherichia coli* já se torna efetiva.

Em outro trabalho semelhante, Paiva et al. (2014) efetuaram um estudo da eficiência bactericida de *Escherichia coli* e caracterização de CA impregnado com metais em filtros domésticos, utilizando a combinação dos metais prata e cobre (0,5% Cu / 0,5% Ag). O resultado foi de remoções superiores a 99%, onde os metais potencializaram o efeito oligodinâmico, apresentando um efeito de desinfecção sinérgico, conhecido pela ação de íons

prata e cobre sobre micro-organismos, onde íons cobre se ligam à parede da célula permitindo a entrada de íons prata.

Shih & Lin (2010) avaliaram íons de cobre e prata em um método de desinfecção contra biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* e outros, na distribuição de água hospitalar. O inóculo das suspensões bacterianas continham 6,48 Log<sub>10</sub> ufc.mL<sup>-1</sup>. As combinações dos metais Cu/Ag (mg.L<sup>-1</sup>) foram: 0,2%/0,02%; 0,4%/0,04%; 0,8%/0,08%. A amostra contendo 0,8%/0,08% mg.L<sup>-1</sup> apresentou uma inibição de 99,9% nas primeiras 24 horas. Os resultados mostraram que a ionização de cobre-prata foi eficaz no controle de biofilme.

Santos (2010) sintetizou biocidas inorgânicos em forma de pó a base de dióxido de titânio com prata (Ag/TiO<sub>2</sub>) e dióxido de titânio com dióxido de silício impregnado com prata (Ag/TiO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub>) e verificaram suas aplicações na sanitização de águas contaminadas com *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os testes foram feitos adicionando 1 mL da solução contendo as bactérias na concentração de 4,3 ufc.mL<sup>-1</sup> em placas contendo 0,1 mg dos biocidas inorgânicos e cobertos com ágar padrão (*Plate Count Agar* - PCA). A atividade microbiocida observada nos sistemas foi atribuída em maior parte à presença de Ag que ao suporte de TiO<sub>2</sub>, que contribuiu na inativação somente na presença de luz.

Estes mesmos efeitos podem ser observados nos resultados encontrados no presente trabalho que ao utilizar apenas a prata, conseguiu inibir a formação de biofilme tanto para *Escherichia coli* em todas as amostras testadas, quanto para *Pseudomonas aeruginosa* em CAI<sub>0,04</sub>. Sendo assim, a prata se apresenta como um metal completamente eficaz e que quando aplicada em menores concentrações como as aqui apresentadas (0,01%, 0,02% e 0,04%) se torna economicamente mais viável em vista das quantidades em massa de prata utilizada por Paiva et al. (0,5%) entre outros autores e empresas utilizadoras deste recurso.

Tendo em vista as possíveis interações sofridas por micro-organismos, também podemos inferir uma relação de sinergismo ou antagonismo entre as bactérias estudadas (DELEON et al., 2014). De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, sabemos que *Escherichia coli* sofreu considerável ação da Ag em relação à *Pseudomonas aeruginosa*, onde ainda poderia ser descrito um possível antagonismo sofrido por essas duas bactérias.

Em comunidades mistas que vivem em competição em águas subterrâneas organizadas na forma de biofilmes, sob certas condições, ocorre uma limitação do potencial

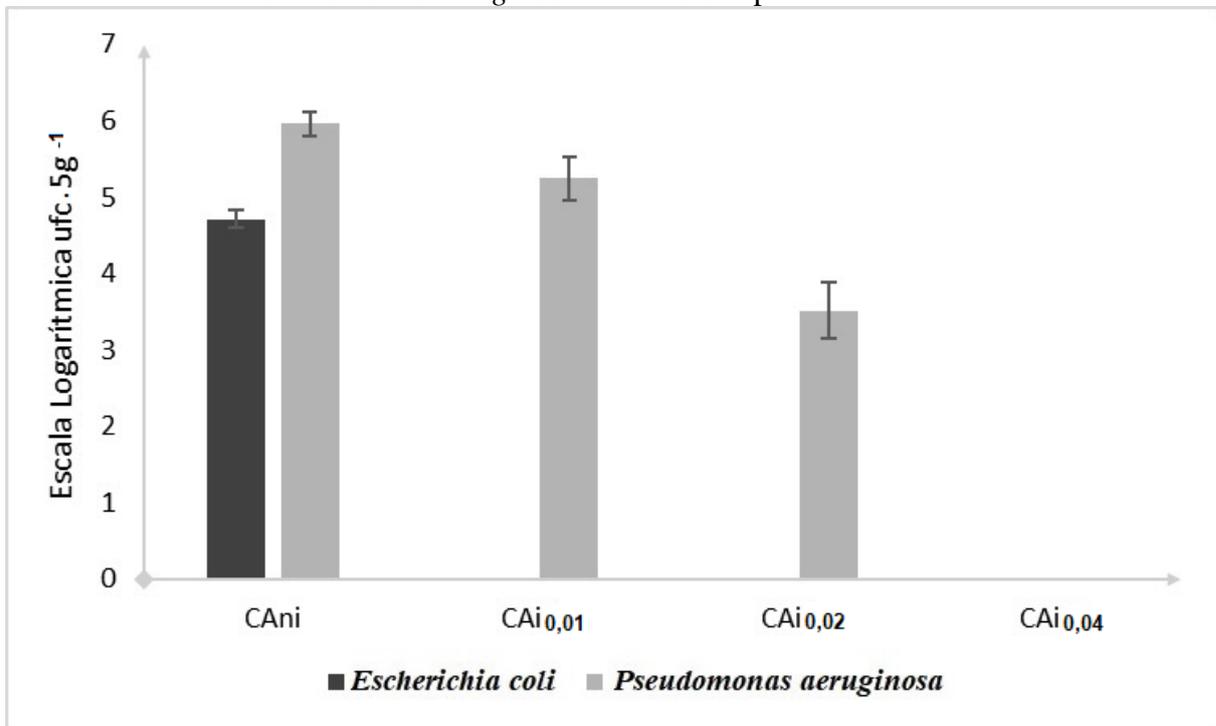
de sobrevivência de enterobactérias patógenas enquanto que, a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* leva vantagem sobre *Escherichia coli* pela sua grande versatilidade metabólica (BANNING et al., 2003).

Segundo Banning et al. (2003), vários fatores permitem caracterizar o fenômeno de antagonismo entre espécies em um ambiente aquático, tais como: temperatura, pH, níveis de nutrientes, presença de oxigênio, atividades predatórias e concentração de população.

Os estudos realizados em laboratórios por Vaconcelos et al. (2010), mostram que *Pseudomonas aeruginosa* teve o fenômeno de antagonismo, sendo este evidenciado quando a diferença entre as populações de *Pseudomonas aeruginosa* e a de coliformes foi de 6 Log<sub>10</sub> ufc.mL<sup>-1</sup>, a partir de uma concentração de inóculo de 2 Log<sub>10</sub> ufc.m<sup>-1</sup>.

O Gráfico 1, a seguir, demonstra a formação de biofilme mistos de *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 nas amostras CA<sub>ni</sub>, CA<sub>i,0,01</sub>, 0,02 e 0,04:

Gráfico 1 - Inibição na formação de biofilme misto de *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 para CA<sub>ni</sub> e CA<sub>i</sub>.



Legenda: AD – água desafio; CA<sub>i</sub> – carvão ativado impregnado; CA<sub>i,0,01</sub> – 0,01% de Ag; CA<sub>i,0,02</sub> – 0,02% de Ag; CA<sub>i,0,04</sub> – 0,04% de Ag; CA<sub>ni</sub> – carvão ativado não impregnado; ufc.5g<sup>-1</sup> – unidade formadora de colônia por 5 gramas de carvão ativado.

Na Gráfico 1, são comparados os resultados da formação de biofilme em carvão ativado impregnado com as amostras não impregnadas. Observa-se pelos resultados que houve a formação de biofilmes de *Escherichia coli* apenas em CAni, ao passo que *Pseudomonas aeruginosa* apresenta formação de biofilme concentração-dependente nas amostras estudadas, chegando à total inativação.

Pode-se notar uma redução referente à *Escherichia coli* logo quando se compara a contagem em ufc.mL<sup>-1</sup> da água de desafio (5,15 Log<sub>10</sub>) com a contagem em ufc.5g<sup>-1</sup> nas amostras CAni (4,66 Log<sub>10</sub>), enquanto que *Pseudomonas aeruginosa* se apresenta sobressalente. No mesmo momento em que para as amostras CAi, *Escherichia coli* foi completamente inativada em relação à *Pseudomonas aeruginosa*.

Esse fenômeno, pode ser atribuído à ação bactericida da prata, que atua como uma alternativa eficiente capaz de reduzir ou até mesmo inativar as bactérias estudadas, como também pode ser conferido ao fato de *Pseudomonas aeruginosa*, segundo a literatura, conseguir promover a inibição de grupos coliformes, apresentando uma versatilidade metabólica superior à de *Escherichia coli* (BANNING et al., 2003; GUILHERME et al., 2000).

## 6. CONCLUSÃO

- A impregnação do carvão ativado de endocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata*) com prata, inibiu a formação de biofilmes mistos de *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027;
- A capacidade adsortiva do carvão ativado não foi comprometida pelo processo de impregnação, como verificado pela determinação do número de iodo, pelo teor de cinzas e a quantidade de solúveis em água, que demonstraram resultados superiores ao mínimo preconizado pelas normas;
- As concentrações experimentais de prata impregnada nas amostras de carvão ativado se aproximaram das concentrações nominais, mostrando uma impregnação eficiente;
- Em todas as amostras produzidas de carvão ativado impregnado, a concentração em massa de prata lixiviada na água permaneceu dentro da faixa de aceitação para o consumo humano demonstrando que o processo de impregnação do carvão ativado com prata não alterou a qualidade da água filtrada;
- *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* foram capazes de formar biofilmes na superfície do carvão ativado não impregnado, apresentando médias de contagem de 4,66 e 6,26 Log<sub>10</sub> ufc.5g<sup>-1</sup>, respectivamente.
- Houve inibição completa da formação de biofilme por *Escherichia coli* nas amostras de CA impregnadas com prata e redução do biofilme formado por *Pseudomonas aeruginosa* dependente da concentração de prata até a inibição total na concentração mais alta testada (0,04% de Ag);
- Diante desses resultados, carvão ativado do endocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata*) impregnado com prata em quantidades inferiores às utilizadas comercialmente (0,08%), apresenta propriedades de inativação de biofilmes microbianos mistos, sem comprometimento da água potável, mostrando sua aplicação como meio filtrante em filtros de água domésticos e alternativa industrial visando possível economia de recursos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Aparelho para melhoria da qualidade da água para consumo humano - Requisitos e métodos de ensaio** – NBR – 16098, 2012.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Aparelho para melhoria da qualidade de água de uso doméstico – Aparelho por gravidade** – NBR – 15176, 2004.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Carvão Ativado Pulverizado Especificação** – EB – 2133, 1991.

ANATOFEEET© Copyright 2017 - **Anatofeet - Todos os direitos reservados**. Rio Grande do Sul. Disponível em: <http://www.anatofeet.com.br/produtos/categorias/id/11>. Acesso em: 03 ago 2017.

ANNUNCIADO, T. R.; SYDENSTRICKER, T. H. D.; AMICO, S. C. Experimental investigation of various vegetable fibers as sorbent materials for oil spills. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, n. 11, p. 1340-46, 2005.

ARANTES, M. D. C.; TRUGILHO, P. F.; SILVA, J. R. M.; ANDRADE, C. R. Charcoal characteristics of an *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden x *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. **Revista Cerne**, Lavras, v. 19, n. 3, p. 423-31, 2013.

ASTM D 2862/1997; **Standart Test Method for Water Solubles in Activated Carbon**.

ASTM D 2866/1994: **Standart Test Method for Total Ash Content of Activated Carbon** (Reapproved 1999).

ASTM D 4607/1994; **Standard Test Method for Determination of Iodine Number of Activated Carbon** (Reapproved 1999).

ASTM D 5029/1998; **Standart Test Method for Water Solubles in Activated Carbon**.

AWWAD, M.; AL-RIMAWI, F.; DAJANI, K. J.; KHAMIS, M.; NIR, S.; KARAMAN, R. Removal of Amoxicillin and Cefuroxime Axetil by Advanced Membranes Technology, Activated Carbon and Micelle-Clay Complex. **Environmental Technology**, p. 1-34, 2015.

BACCAR, R.; BOUZID, J.; FEKI, M.; MONTIEL, A. Preparation of activated carbon from Tunisian olive-waste cakes and its application for adsorption of heavy metal ions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 162, p. 1522-29, 2009.

BANDARA, H. M.; YAU, J. Y.; WATT, R. M.; JIN, L. J.; SAMARANAYAKE, L. P. *Escherichia coli* and its lipopolysaccharide modulate *in vitro* *Candida* biofilm formation. **Journal of Medical Microbiology**, v.58, p.1623-31, 2009.

BANNING, N.; TOZE, S.; MEE, B. J. Persistence of biofilm-associated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in groundwater and treated effluent in a laboratory model system. **Microbiology**, v. 149, p. 47-55, 2003.

BANSAL, R. C. & GOYAL, M. Activated carbon adsorption. **Taylor & Francis Group, LLC**. United States of America, 2005.

BARBOSA, C. S.; SANTANA, S. A. A.; BEZERRA, C. W. B.; SILVA, H. A. S. Remoção de compostos fenólicos de soluções aquosas utilizando carvão ativado preparado a partir do aguapé (*Eichhornia crassipes*): estudo cinético e de equilíbrio termodinâmico. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 447-53, 2014.

BELLANTONE, M.; WILLIAMS, H. D.; HENCH, L. L. Broad-spectrum bactericidal activity of Ag<sub>2</sub>O-doped bioactive glass. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 46, p. 1940-45, 2002.

BHATNAGAR, A.; HOGLAND, W.; MARQUES, M.; SILLANPÄÄ, M. An overview of the modification methods of activated carbon for its water treatment applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 219, p. 499-511, 2013.

BOARI, C. A.; ALVES, M. P.; TEBALDI, V. M. R.; SAVIAN, T. V.; PICCOLI, R. H. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 886-95, 2008.

BRANDÃO, C. C. S. & SILVA, A. S. Remoção de cianotoxinas por adsorção em carvão ativado. In: PÁDUA, V.L. (Org.). **Contribuição ao estudo da remoção de cianobactérias e microcontaminantes orgânicos por meio de técnicas de tratamento de água para consumo humano**. Rio de Janeiro: ABES, p. 415-65, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n° 2914 - **Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade**. Diário Oficial da União. Brasil, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n° 394 - **Estabelece os requisitos que devem ser atendidos pelos Equipamentos para Consumo de Água**. INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, 2014.

BRITO, J. O. & BARRICHELO, L. E. G. Considerações sobre a produção de carvão vegetal com madeiras da Amazônia. **Boletim do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, Piracicaba**, v. 2, n. 5, p. 1-25, 1981.

CALGON CARBON® - **Granular Activated Carbon**, Calgon Carbon Corporation, 2017.

CASAGRANDE, J. J. C.; Antimicrobial effect of silver, gold, copper and nickel nanoparticles against *Streptococcus mutans*. **Indian Journal of Dental Research**, v. 8, p. 123-35, 2010.

CHARACKLIS, W. G. Bioengineering Report: Fouling Biofilm Development: A Process Analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, p. 1923-60, 1981.

CHEN, F.; HU, Y.; DOU, X.; CHEN, D.; DAI, X. Chemical forms of heavy metals in pyrolytic char of heavymetal-implanted sewage sludge and their impacts on leaching behaviors. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 116, p. 152-60, 2015.

CHEW, S. C. & YANG, L. Biofilms. In: CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M.; TOLDRÁ, F. (Eds.) **Encyclopedia of Food and Health**, Singapore: Elsevier Ltd., p. 407-15, 2016.

CLARK, H. L. M. **Remoção de fenilalanina por adsorvente produzido a partir da torta prensada de grãos defeituosos de café**. Dissertação (Mestrado). 2010. 115 p. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia da UFMG. Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia, 2010.

CLEMO, B. Ultra-Fresh Silpure, A nova geração antimicrobiana baseada na nanotecnologia da prata. **Química Têxtil**, n.80, p. 14-18, 2005.

COOKSON JR., J.T. Adsorption mechanisms: the chemistry of organic adsorption on activated carbon, in: P.N. Cheremisinoff, F. Ellerbusch (Eds.), **Carbon Adsorption Handbook**, Ann Arbor Sci, Ann Arbor, p. 241-79, 1980.

COSTA, L. C. M. **Produção e Modificação de Carvões Ativados para Aplicações Ambientais**. Tese (Doutorado). 2007. 179 p. Ciências – Química. Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

COSTERTON, J. W. Introduction to biofilm. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 11, p. 217-21, 1999.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-45, 1995.

DAVEY, M. & O'TOOLE, G. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 847-67, 2000.

DELEON, S.; CLINTON, A.; FOWLER, H.; EVERETT, J.; HORSWILL, A. R.; RUMBAUGH, K. P. Synergistic interactions of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* wound model. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 11, p. 4718-28, 2014.

DI BERNARDO, L. & DANTAS, A. D. B. Métodos e técnicas de tratamento de água. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 11, n. 2, 2006.

DONATI, C.; DRIKAS, M.; HAYES, R. E.; NEWCOMBE, G. Microcystin-LR adsorption by powdered activated carbon. **Water Research**, v. 28, n. 8, p. 1735-42, 1994.

DONLAN, R. M. & COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 167-93, 2002.

DUNNE JÚNIOR, W. M. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 155-66, 2002.

FENG, Q. I.; WU, J.; CHEN, G. Q.; CUI, F. Z.; KIM, T. N. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical Material Research**, v. 52, p. 662-68, 2002.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R.; SILVA, F. de C. Potentiality and opportunity in the chemistry of sucrose and other sugars. **Química Nova**, São Paulo. v. 32, n. 3, 2009.

FONG, J. & WOOD, F. Nanocrystalline silver dressings in wound management: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 4, p. 441-49, 2006.

GERMANO, P. M. L. & GERMANO, M. I. S. Higiene e vigilância sanitária de alimentos. São Paulo: **Varela**, p. 629, 2001.

GIBERT, O.; LEFÈVRE, B.; FERNÁNDEZ, M.; BERNAT, X.; PARAIRA, M.; CALDERER, M.; MARTÍNEZ-LLADO, X. Characterizing biofilm development on granular activated carbon used for drinking water production. **Water research**, v. 47, p. 1101-10, 2013.

GU, H. **Patterned biofilm formation to investigate bacteria-surface interactions** Dissertations - ALL. Paper 91. Syracuse University: Surface, 2014.

GUILHERME, E. F. M.; SILVA, J. A. M.; OTTO, S. S. *Pseudomonas aeruginosa*, como indicador de contaminação hídrica. **Revista Higiene Alimentar**, v. 14, n. 76, p. 43-47, 2000.

GUIMARÃES, I. S. **Oxidação de carvão ativado de endocarpo de coco da baía com soluções de HNO<sub>3</sub> e uma investigação sobre o método de Boehm**. Dissertação (Mestrado). 2006. 81 p. Universidade Federal da Paraíba: João Pessoa, 2006.

GUO, Y. & ROCKSTRAW, A. D. Physicochemical properties of carbons prepared from pecan shell by phosphoric acid activation. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1513-21, 2007.

GUPTA, P.; SARKAR, S.; DAS, B.; BHATTACHARJEE, S.; TRIBEDI, P. Biofilm, pathogenesis and prevention – a journey to break the wall: a review. **Archives of Microbiology**, v. 198, n. 1, p. 1-15, 2016.

HAFTKA, S.; EHLERS, J.; BARTH, C.; WANG, L. Activated carbon filter. **US Patent**, v. 6, p. 736-770, 2004.

HENNING, K. D. & VON. K. H. Activated Carbon. Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. **Carbon**, v. 6, n. 5, p. 788-91, 2012.

HENRIQUES, A.; VASCONCELOS, C.; CERCA, N. A importância dos biofilmes nas infecções nosocomiais – o estado da arte. **Arquivos de Medicina**, v. 27, n. 1, p. 27-36, 2013.

HESAS, R. H.; DAUD, W. M. A. W.; SAHU, J. N; ARAMINIYA, A. The effects of a microwave heating method on the production of activated carbon from agricultural waste: a review. **Journal of Analytical and Applied pyrolysis**, v. 100, p. 1-11, 2013.

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

ISLAM M. S.; ZHANG, Y.; MCPHEDRAN, K. N.; LIU, Y.; EL-DIN, M. G. Mechanistic investigation of industrial wastewater naphthenic acids removal using granular activated carbon (GAC) biofilm based processes. **Science of the Total Environment**, v. 541, p. 238-46, 2016.

JACOBSEN, S. M. & SHIRTLIFF, M. E. *Proteus mirabilis* biofilms and catheter-associated urinary tract infections. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 460-65, 2011.

JANKOWSKA, H.; SWIATKOWSKI, A.; CHOMA, J. *Active Carbon*. Chichester: Ed. Ellis Horwood, 1991, 280p.

JONES, C. M. & HOEK, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **Journal of Nanoparticle Research**, p. 1531-51, 2010.

KATESA, J.; JUNPIROMAND, S.; TANGSATHITKULCHAI, C. Effect of carbonization temperature on properties of char and activated carbon from properties of coconut shell. **Suranaree Journal of Science and Technology**, v. 20, p. 269, 2013.

KIRAN, M. D.; ADIKESAVAN, N. V.; CIRIONI, O. GIACOMETTI, A.; SILVESTRI, C.; SCALISE, G.; GHISELLI, R.; SABA, V.; ORLANDO, F.; SHOHAM, M.; BALABAN, N. Discovery of a quorum-sensing inhibitor of drug-resistant staphylococcal infections by structure-based virtual screening. **Molecular pharmacology**, v. 73, n. 5, p. 1578-86, 2008.

KLUEH, U.; WAGNER, V.; KELLY, S.; JOHNSON A.; BRYERS, J. D. Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 53, p. 621-31, 2000.

KOLENBRANDER, P. E. Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque. **Annual Review Microbiology**, v. 42, p. 627-56, 1988.

LALLEY, J.; DIONYSIOU, D. D.; VARMA, R. S.; SHANKARA, S.; YANG, D.; NADAGOUDA, M. N. Silver-based antibacterial surfaces for drinking water disinfection an overview. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 3, p. 25-29, 2014.

LEVESQUE, C.; LAMOTHE, J.; FRENETTE, M. Coaggregation of *Streptococcus salivarius* with periodontopathogens: evidence for involvement of fimbriae in the interactions with *Prevotella intermedia*. **Oral Microbiology Immunology**, v. 18, n. 5, p. 333-37, 2003.

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

LI, X.; YANGA, F.; LI, P.; YANGA, X.; HEA, J.; WANGA, H.; LV, P. Optimization of preparation process of activated carbon from chestnut burs assisted by microwave and pore structural characterization analysis. **Journal of the Air & Waste Management Association**, v. 65, p. 1297-1305, 2015.

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

LIMA, S. B.; BORGES, S. M. S.; RANGEL, M. D.; MARCHETTI, S. G. Effect of iron content on the catalytic properties of activated carbon-supported magnetite derived from biomass. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 2, p. 344-54, 2013.

LIU, X. L.; GUO, J. X.; CHU, W. H.; LUO, D. M.; YIN, H. Q.; SUN, M. C.; YAVUZ, R. Desulfurization performance of iron supported on activated carbon. **Fuel**, v. 123, p. 93-100, 2014.

LYUBCHIK, S. I.; LYUBCHIK, A. I.; GALUSHKO, O. L.; TIKHONOVA, L. P.; VITAL, J.; FONSECA, I. M.; LYUBCHIK, S. B. Kinetics and thermodynamics of the Cr (III) adsorption on the activated carbon from co-mingled wastes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 242, n. 1-3, p. 151-58, 2004.

MANES, Milton. Pittsburgh. **Silver impregnated carbon**. C01B31/12. PA. US3374608 A. 30 ago. 1966. 26 mar. 1968. United States Patent Office, n. 575,989.

MARTINEZ, M. S.; PIZA, A. V. T.; DANTAS, A. D. B.; PASCHOALATO, C. F. P. R.; BERNARDO, L. D. Remoção dos herbicidas diuron e hexazinona de água por adsorção em carvão ativado. **Revista DAE**, v. 59, p. 35-39, 2011.

MENDES, E.; PILETTI, R.; BARICHELLO, T.; OLIVEIRA, C. M.; KNISS, C. T.; ANGIOLETTO, E.; RIELLA, H. G.; FIORI, M. A. The influence of particle size and AgNO<sub>3</sub> concentration in the ionic exchange process on the fungicidal action of antimicrobial glass. **Materials Science and Engineering: C Materials for Biological Applications**, v. 32, n. 6, p. 1518-23, 2012.

MIE, R.; M.W. SAMSUDIN; L.B. DIN; A. AHMAD; N. IBRAHIM; S.N.A. ADNAN. Synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity using the lichen *Parmotrema praesorediosum*, **International Journal Nanomedicine**, v. 9, p. 121-27, 2014.

MITSUMORI, N.; TAKEDA, C.; MIYASAKO, H. Kyoto. **Method of treating silver impregnated activated carbon**. B01J23/96. JPN. US4045553 A. 26 fev. 1975. 30 ago. 1977. United States Patent, n. 553,244.

MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMIREZ, J. T.; YACAMAN, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Institute of Physics Publishing, **Journal of Nanotechnology**, v. 16, p. 2346-53, 2005.

NA, L.; JIAN, Z.; QING-FANG, C. Activated carbon surface groups qualitative and quantitative analysis. **Chemical Journal of Chinese Universities**, v. 23, n. 3 p. 548-54, 2012.

NANGMENYI, G.; XAO, W.; MEHRABI, S.; MINTZ, E.; ECONOMY, J. Bactericidal activity of Ag nanoparticle impregnated fiberglass for water disinfection. **Journal Water Health**, v. 7, p. 657-63, 2009.

NAVES, P.; PRADO, G.; HUELVES, L.; GRACIA, M.; RUIZ, V.; BLANCO, J.; DAHBI, G.; BLANCO, M.; PONTE, M. C.; SORIANO, F. Correlacion between virulence factors and *in vitro* biofilm formation by *Escherichia coli* strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 45, p. 86-91, 2008.

NIEDERSBERG, C.; WERLANG, E. B.; LAZZARI, A. R.; SCHNEIDER, R. C. S.; RODRIGUEZ, A. L. Adsorption with activated carbon produced from tung fruit (*Aleurites fordii*) husks. **International Journal of Engineering and Technology**, v. 7, n. 3, 2015.

NOWICKI, P.; KAZMIERCZAK, J.; PIETRZAK, R. Comparison of physicochemical and sorption properties of activated carbons prepared by physical and chemical activation of cherry. **Stones Powder Technology**, v. 269, p. 312-19, 2015.

O'GARA, J. P. Ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters Journal**, v. 270, n. 1, p. 79-88, 2007.

OKMAN, I.; KARAGÖZ, S.; TAY, T.; ERDEM, M. Activated carbons from grape seeds by chemical activation with potassium carbonate and potassium hydroxide. **Applied Surface Science**, v. 293, p. 138-42, 2014.

OLIVEIRA, C. C. N. **Estudos de equilíbrio e modelagem cinética da adsorção de corante têxtil e Remazol Black B sobre bagaço de cana-de-açúcar in natura e carvão ativado**. Dissertação (Mestrado). 2003. 100 p. Universidade Federal de Pernambuco: Recife, 2003.

OLIVEIRA, J. B.; GOMES, P. A.; ALMEIDA, M. R. Estudos preliminares de normalização de testes de controle de qualidade de carvão vegetal. In: **Carvão vegetal: destilação, propriedades e controle de qualidade**. Belo Horizonte: Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, 1982.

OLIVEIRA, L. F. D. **Estudo da formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* em carvão ativado impregnado com prata**. Dissertação (Mestrado). 2014. 67 p. Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2014.

OZDEMIR, I.; SAHIN, M.; ORHAN, R.; ERDEM, M. Preparation and characterization of active carbon from grape stalk by zinc chloride activation. **Fuel Processing Technology**, v.125, p. 200-06, 2014.

PAIVA, G. R. R.; ALVES, C. L.; FRANCO, J. M.; YAMAGUCHI, N. U. **Eficiência bactericida e caracterização de carvão ativado impregnado com metais em filtros domésticos**. Anais da VII Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica do Centro Universitário de Maringá, 2014.

PALADE, G. E. A study of fixation for electron microscopy. **Journal of Experimental Medicine**, v. 95, n. 3, p. 285-98, 1952.

PARK, S. & JANG, Y. Preparation and characterization of activated carbon fibers supported with silver metal for antibacterial behavior. **Journal of Colloid Interface Science**, v. 261, p. 238-43, 2003.

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

PINHEIRO, C. U. B. & FRAZÃO, J. M. F. F. Integral Processing Babassu palm (*Orbignya phareolata*, *arecaceae*) Fruits: Village Level Production in Maranhão, Brazil. **Economic Botany**, v. 49, p. 31-39, 1995.

PINO, G. A. H.; MESQUITA, L. S.; TOREM, M.; PINTO, G. S. Biosorption of heavy metals by powder of green coconut shell. **Separation Science and Technology**, v. 41, p. 3141-53, 2006.

PINTO, M. V. de S.; SILVA, D. L. da; SARAIVA, A. C. F. Obtenção e caracterização de carvão ativado de caroço de buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) para a avaliação do processo de adsorção do cobre (III). **Acta Amazonica**, v. 42 n. 4, p. 541-48, 2013.

PIS, J. J.; CENTENO, T. A.; MAHAMUD, M.; FUERTES, A. B.; PARRA, J. B.; PAJARES, J. A.; BANSAL, R. C. Preparation of activated carbons from coal. Part I. Oxidation of coal. **Fuel Process Technology**, v. 47, p. 119-38, 1996.

PIZZOLITTO, E. L.; PIZZOLITTO, A. C.; POZETTI, G. L. Chemical and microbiological evaluation of the internal surfaces of aluminum tubes both unlined and lined with epoxy resin by means of the stereoscope and scanning electron microscope. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 340-44, 2001.

RAMOS, P. H.; GUERREIRO, M. C.; RESENDE, E. C.; GONÇALVES, M. Produção e caracterização do carvão ativado produzido a partir do defeito preto, verde, ardido (PVA) do café. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1139-43, 2009.

REIS, A. R. S.; REIS, J. S. F.; SILVA, J. R.; CARVALHO, J. C.; SOUZA, D. V.; REIS, L. P. Comparação entre carvão de coco babaçu e carvão de resíduos madeireiros comercializados em Altamira – PA. **Brazilian Journal of Wood Science**, v. 6, n. 2, p. 100-06, 2015.

RODRIGUEZ, N. S.; SICAIROS-RUELAS, E. E.; GERBA, C. P.; BRIGHT, K. R. Silver as a disinfectant. In: WARE, G. W. (Ed.) **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. New York: Springer, 2007. p. 23-45.

RODRÍGUEZ, R.; F. & MOLINA, S. M. El carbón activado como adsorbente en descontaminación ambiental. In: RODRÍGUEZ-REINOSO, F. (Ed.) **Adsorbentes en la solución de algunos problemas ambientales**. Madrid: Ediciones CYTED, 2004. p. 37-52.

ROUQUEROL, F.; ROUQUEROL, J.; LLEWELLYN, P.; MAURIN, G.; SING, K. S. W. **Adsorption by Powders and Porous Solids – Principles, Methodology and Applications**. Academic Press, London Boston. 2<sup>3</sup> ed, p. 646, 2013.

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

SANTOS, J. M. **Desenvolvimento de biocidas inorgânicos a base de óxidos de titânio e silício com prata para desinfecção de águas contaminadas com microrganismo.** Tese (Doutorado), 2010, 141 p. Universidade Estadual Paulista: Botucatu, 2010.

SCHMIDT, C. G. **Desenvolvimento de filtros de carvão ativado para remoção do cloro da água potável.** Dissertação (Mestrado). 2011. 90 p. Universidade Federal do rio Grande do Sul: Porto Alegre, 2011.

SEBASTIANY, L. K. **Estudo da inibição da formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 na superfície de carvão ativado impregnado com zinco e cobre em meio filtrante de leito fixo.** Dissertação (Mestrado), 2015, 68 p. Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2015.

SHIH, H. Y. & LIN, Y. E. Efficacy of Copper-Silver Ionization in Controlling Biofilm- and Plankton-Associated Waterborne Pathogens. **Applied Environmental Microbiology**, v. 76, n. 6, p. 2032-35, 2010.

SHOAIB, M. & AL-SWAIDAN, H.; Optimization and characterization of sliced activated carbono prepared from date palm tree fronds by physical activation. **Biomass and Bioenergy**, v. 73, p. 124-34, 2015.

SILVA, C. H. P. M.; LINS, A. P.; CRUZ, C. S. O.; GREENBERG, W.; STEWART, T.; Caracterização dos biofilmes formados em filtros de carvão ativado de sistemas de purificação de água em laboratórios. **RBAC Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, p. 243-53, 2006.

SILVA, J. O.; COSTA, P. P.; RECHE, S. H. C. Manutenção de leveduras por congelamento a – 200°C. **RBAC Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 1, p. 73-74, 2008.

SMÍSEK, M. & CERNÝ, S. **Active carbon: manufacture, properties and applications.** New York: Elsevier, 1970.

SMITH, E. G. & SPATAFORA, G. A. Gene regulation in *S. mutans*: complex control in a complex environment. **Journal of Dental Research**, v. 91 n. 2, p. 133-41, 2012.

SOARES, A. G. **Adsorção de Gases em Carvão Ativado de Celulignina.** Tese (Doutorado). 2001. 126 p. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Física Gleb Wataghin. Programa de Pós-Graduação em Física. UNICAMP, 2001.

SOCRANSKY, S. S. & HAFFAJEE, A. D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontology** 2000, v. 28, p. 12-55, 2002.

SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 223-29, 2013.

SOUSA, J. C.; PANA, J. B.; PAJARES, J. A.; PIS, J. J. Activated carbons from semianthracite by steam activation. Effect of coal preoxidation and burn-off. **Studies in Surface Science and Catalysis**, v. 87, p. 603-12, 1994.

SRINIVASAN, N. R.; SHANKAR, P. A.; BANDYOPADHYAYA, R. Plasma treated activated carbon impregnated with silver nanoparticles for improved antibacterial effect in water disinfection. **Carbon**, v. 57, p. 1-10, 2013.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 41-46, 1998.

TANG, H. Q.; FENG, H. J.; ZHENG, J. H.; ZHAO, J. A study on antibacterial properties of Ag<sup>+</sup>-implanted pyrolytic carbon. **Surface & Coatings Technology**, v. 201, p. 5633-36, 2007.

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

TORTORA, G. J.; FUNKE, R. B.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VACONCELOS, U.; LIMA, M. A. G. A.; CALAZANS, G. L. T. *Pseudomonas aeruginosa* associated with negative interactions on coliform bacteria growth. **Canadian Journal of Pure & Applied Sciences**, v. 4, p. 1133-39, 2010.

VELÁZQUEZ-TRUJILLO, A.; BOLAÑOS-REYNOSO, E.; PLIEGO-BRAVO, Y. S. Optimization of activated carbon production from bamboo. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 9, n. 3, p. 359-66, 2010.

WANG, Z. M.; KANO, H.; KANEKO, K.; LU, G. Q.; DO, D. Structural and surface property changes of macadamia nut-shell char upon activation and high temperature treatment. **Carbon**, v. 40, p. 1231-39, 2001.

WATNICK, P. & KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 2675-79, 2000.

WILSON, J. Active carbons from coals. **Fuel**, v. 60, p. 823, 1981.

WRIGHT, C. J.; BURNS, L. H.; JACK, A. A.; BACK, C. R.; DUTTON, L. C.; NOBBS, A. H.; LAMONT, R. J.; JENKINSON, H. F. Microbial interactions in building of communities. **Molecular Oral Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 83-101, 2013.

XAVIER, R. N.; TRAGHETTA, D. G.; OLIVEIRA, C. M. R. Avaliação da eficiência de um reator de carvão ativado impregnado com prata no tratamento de águas residuárias geradas em laboratórios de análises clínicas. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, n. 15, p. 29-38, 2010.

YANG, F. C.; WU, K. H.; HUANG, J. W.; HORNG, D. N.; LIANG, C. F.; HU, M. K. Preparation and characterization of functional fabrics from bamboo charcoal/silver and titanium dioxide/silver composite powders and evaluation of their antibacterial efficacy. **Materials Science and Engineering: C**, p. 1062-67, 2012.

YORGUN, S. & YILDIZ, D. Preparation and characterization of activated carbons from Paulownia wood by chemical activation with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 53, p. 122-31, 2015.

ZHANG, D. Y.; LI, W. G.; ZHANG, S. M.; LIU, M.; ZHAO, X. Y.; ZHANG, X. C. Bacterial community and function of biological activated carbon filter in Drinking Water Treatment. **Biomedical Environmental Science**, v. 24, p. 122-31, 2011.

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

## 8. ANEXOS

Anexo 1 : Descrição e especificações técnicas do carvão ativado pela Calgon carbon®.

CalgonCarbon

PRODUCT BULLETIN

### 1184

0.5% Silver Impregnated Activated Carbon

#### Description

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

#### Applications

Type 1184 can be used in a variety of applications and is recommended when microorganism growth presents a problem. Used commonly in point-of-entry (POE) and point-of-use (POU) applications, the antimicrobial properties of silver impregnated on the carbon make type 1184 especially valuable in most water purification applications where bacterial growth on filter media can become an issue.

Some typical applications for type 1184 silverized carbon include:

- Pitcher and dispenser home water filters (POU).
- Whole-home water filtration (POE).
- Pharmaceutical stream purification.

#### Features / Benefits

- Provides bacteriostatic properties to stop the reproduction of bacteria on filter media.
- Improves taste and odor of water.
- High quality substrate for the removal of trace organic compounds such as THMs and pesticides, as well as disinfection by-products.
- Registered with the US EPA (# 58295-3).

Typical Properties	1184
Ball Pan Hardness [ASTM D-3802]	98
Ash Content [ASTM D-2866]	4% w/w
Bulk Density [ASTM D-2854]	0.48g/cc
Moisture Content [ASTM D-2867]	< 5% w/w
US Mesh Size [ASZM D-2862]	20x50*

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

#### Typical Pressure Drop

Based on Backwashed and Segregated Bed

Liquid Phase Pressure Drop Estimate  
Dense Packed 1184 20x50

#### Packing

50 lb. poly bag  
200 lb. fiber drum  
1,000 lb. (454 kg) super sack  
Bulk truck

**Safety Message**  
Wet activated carbon preferentially removes oxygen from air. In closed or partially closed containers and vessels, oxygen depletion may reach hazardous levels. If workers are to enter a vessel containing carbon, appropriate sampling and work procedures for potentially low oxygen spaces should be followed, including all applicable federal and state requirements. Please refer to the MSDS for all up to date product safety information.

Making Water and Air Safer and Cleaner

[www.calgoncarbon.com](http://www.calgoncarbon.com)

**Corporate Headquarters**  
Calgon Carbon Corporation  
500 Calgon Carbon Drive  
Pittsburgh, PA USA 15205  
800.422.7266  
412.787.6700  
412.787.6713 Fax  
[www.calgoncarbon.com](http://www.calgoncarbon.com)

**European Operations**  
Chermiron Carbon Corporation  
Zoning Industriel C de Feluy  
B-7181 Feluy, Belgium  
+ 32 (0) 64 51 18 11  
+ 32 (0) 64 54 15 91 Fax

**Asia Operations**  
Calgon Carbon Asia Pte Ltd.  
9 Temasek Boulevard  
#26-02 Suntec Tower Two  
Singapore 038989  
+65 6221 3500  
+65 6221 3554 Fax

Your local representative

Copyright© 2013 Calgon Carbon Corporation, all rights reserved.

00/00