



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS



CÂMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS – HENRIQUE SANTILLO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MOLECULARES

SINARA PEREIRA BRASIL

**IMPREGNAÇÃO DE CARVÃO ATIVADO DE CASCA DE COCO DE DENDÊ *Elaeis guineensis* COM ZINCO E COBRE PARA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Escherichia coli* ATCC 8739**

ANÁPOLIS - GO

2017

SINARA PEREIRA BRASIL

**IMPREGNAÇÃO DE CARVÃO ATIVADO DE CASCA DE COCO DE DENDÊ *Elaeis guineensis* COM ZINCO E COBRE PARA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Escherichia coli* ATCC 8739**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares

Área de concentração: Físico-Química Molecular

Orientador: Prof. Dr. José Daniel Ribeiro de Campos

Coorientador: Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves

ANÁPOLIS – GO

2017

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

SI615i      Brasil, Sinara Pereira  
IMPREGNAÇÃO DE CARVÃO ATIVADO DE CASCA DE COCO DE DENDÊ *Elaeis guineensis* COM ZINCO E COBRE PARA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Escherichia coli* ATCC 8739 / Sinara Pereira Brasil; orientador José Daniel Ribeiro de Campos; co-orientador Plínio Lázaro Faleiro Naves. -- Anápolis, 2017.  
62 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação Mestrado Acadêmico em Ciências Moleculares) -- Câmpus-Anápolis CET, Universidade Estadual de Goiás, 2017.

1. Ação Antimicrobiana. 2. Metais. 3. Biofilme. 4. Micro-organismos. 5. Adsorção. I. de Campos, José Daniel Ribeiro, orient. II. Naves, Plínio Lázaro Faleiro, co-orient. III. Título.

IMPREGNAÇÃO DE CARVÃO ATIVADO DE CASCA DE COCO DE DENDÊ (*Elaeis guineensis*) COM ZINCO E COBRE PARA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Escherichia coli* ATCC 8739

**SINARA PEREIRA BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências Moleculares do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo, da Universidade Estadual de Goiás, apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Aprovada em 08/03/2017 por:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Daniel Ribeiro de Campos (UEG)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Renato Rosseto (UEG)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Alexandre Donizeti Martins Cavagis (UFSCAR)

ANÁPOLIS – GO

*“O sucesso é ir de fracasso em fracasso,  
sem perder o entusiasmo.”*

*Winston Churchill*

## **Agradecimentos**

Inicialmente, agradeço a Deus e à minha base de sustentação: minha família. Por todo apoio do meu pai, Vasco Teófilo Brasil, minha mãe Nilva Pereira Brasil, minha irmã Sindy Raquel Brasil Costa, meu cunhado Kesley Borges da Costa e ao Gustavo Henrique Fernandes por todo companheirismo, amor e incentivo.

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

Aos técnicos dos laboratórios de química e de microbiologia da UEG que me auxiliaram em todas as etapas: Cleiber Cintra Moraes, Amanda Mazali e Osvaldo Gomes Pinto.

Em especial à colega e companheira de mestrado Letícia Klein Sebastiany por todo auxílio, conhecimento compartilhado, pela paciência e apoio, você foi muito importante para a realização da minha pesquisa. E também às colegas Jéssica Pires Valle e Bárbara Lima Oliveira por toda ajuda, incentivo e companheirismo.

A CAPES 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. Obrigada!

## RESUMO

O carvão ativado é um material carbonáceo de elevada porosidade e área superficial, sendo um dos principais materiais empregados como adsorvente em filtros de água. Entretanto, micro-organismos e matéria orgânica podem se alojar na superfície e formar biofilmes que comprometem seu desempenho. Industrialmente, utiliza-se prata impregnada para dificultar o desenvolvimento de micro-organismos na superfície do carvão. Neste contexto, objetivou-se avaliar a impregnação de zinco e cobre, metais menos nobres, na superfície de carvão ativado de casca de coco de dendê *Elaeis guineensis* e o impacto na inibição da formação de biofilme por *Escherichia coli* ATCC 8739. A impregnação foi realizada por aquecimento com agitação, secagem e calcinação em mufla. As caracterizações seguiram os métodos preconizados pela Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM) como teor de cinzas, solúveis, granulometria e número de iodo. Os ensaios de lixiviação dos metais, formação de biofilme e inibição foram realizadas em meio filtrante de leito fixo. As análises do número de iodo mostraram que a superfície do carvão ativado não foi afetada pela impregnação dos metais. Foi verificado que o maior valor de metal lixiviado foi de 0,03% m/m para o zinco e para cobre os valores de lixiviação estavam abaixo do limite de detecção. A formação de biofilme por *E. coli* ocorreu na superfície do carvão ativado. Foram observadas inibições da formação de biofilme nas amostras impregnadas com zinco e cobre. Combinados, os metais propiciaram inibição de mais de 6 logs em 24 h. Portanto, no presente estudo demonstrou-se que a combinação dos metais zinco e cobre na superfície do carvão ativado potencializa a inibição da formação de biofilme por *Escherichia coli* ATCC 8739, propiciando uma alternativa no controle da colonização bacteriana para a indústria de meios filtrantes.

Palavras-chave: Adsorvente, meio filtrante, metais, micro-organismos, biofilme.

## ABSTRACT

Activated carbon is a carbonaceous material of high porosity and surface area, being one of the main materials used as adsorbent in water filters. However, microorganisms and organic matter can lodge on the surface and form biofilms that compromise their performance. Industrially, impregnated silver is used to hinder the development of microorganisms on the surface of the coal. In this context, the objective was to evaluate the impregnation of zinc and copper, less noble metals, on the activated carbon surface of *Elaeis guineensis* palm coconut shell and the impact on the inhibition of biofilm formation by *Escherichia coli* ATCC 8739. The impregnation was performed by heating with stirring, dryness and calcination in a muffle. The characterizations followed the methods recommended by the American Society of Testing and Materials (ASTM) as ash content, solubility, particle size and iodine number. The tests of metal leaching, biofilm formation and inhibition were carried out in fixed bed filter medium. Analyses of the number of iodine showed that the surface of the activated carbon was not affected by the impregnation of the metals. It was found that the highest value of leached metal was 0.03% w/w for zinc and for copper the leaching values were below the limit of detection. The formation of biofilm by *E. coli* occurred on the surface of the activated carbon. Inhibition of biofilm formation was observed in samples impregnated with zinc and copper. Combined, metals gave inhibition of more than 6 logs in 24 h. Wherefore, in the present study it was demonstrated that the combination of zinc and copper metals on the activated carbon surface enhances the inhibition of biofilm formation by *Escherichia coli* ATCC 8739, providing an alternative in the control of bacterial colonization for the filter media industry.

Key words: Adsorbent, filter medium, metals, microorganisms, biofilm.



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	15
2.1 O DESENVOLVIMENTO NO TRATAMENTO DE ÁGUA.....	15
2.2 O CARVÃO ATIVADO.....	15
2.2.1 A produção de carvão ativado.....	16
2.2.1.1 Ativação Física .....	17
2.2.1.2 Ativação Química .....	18
2.2.2 Adsorção .....	19
2.2.3 As aplicações do carvão ativado .....	21
2.2.3.1 Filtros domésticos .....	21
2.3 BIOFILMES MICROBIANOS.....	22
2.3.1 <i>Escherichia coli</i> .....	25
2.3.2 Zinco e cobre.....	25
2.3.2.1 Atividade antimicrobiana dos metais .....	26
3 OBJETIVOS .....	29
3.1 Objetivo Geral .....	29
3.2 Objetivos Específicos .....	29
4 METODOLOGIA.....	30
4.1 CARACTERIZAÇÕES DO CARVÃO ATIVADO.....	30
4.1.1 Determinação do teor de cinzas (ASTM D 2866-94).....	30
4.1.2 Quantificação de metais impregnados do carvão ativado .....	30
4.1.3 Determinação da granulometria (ASTM D 2862-97) .....	30
4.2 IMPREGNAÇÕES DE ZINCO E COBRE EM CARVÃO ATIVADO.....	30
4.2.1 Preparação do carvão ativado impregnado com zinco e cobre (0,05% e 0,1% m/m).....	30
4.2.2 Determinação do número de iodo (ASTM D 4607-94) .....	31
4.2.3 Quantificação de metais impregnados do carvão ativado .....	31
4.2.4 Determinação da estrutura e composição química das amostras de carvão ativado pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplada ao espectrofotômetro de energia dispersiva (EDS).....	32
4.3 AVALIAÇÃO DE METAIS LIXIVIADOS PÓS-FILTRAÇÃO .....	32
4.3.1 Filtros de leito fixo .....	32

4.3.2	Análise da lixiviação de zinco e cobre nas amostras de carvão ativado .....	33
4.4	ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS .....	33
4.4.1	Reativação de cepa.....	33
4.4.2	Preparo da água desafio com <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 .....	34
4.4.3	Ensaio microbiológico.....	34
4.4.3.1	Cinética de desenvolvimento.....	35
4.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS .....	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1	CARACTERIZAÇÕES DO CARVÃO ATIVADO .....	36
5.1.1	Determinação do teor de cinzas (ASTM D 2866-94).....	36
5.1.2	Determinação de solúveis em água (ASTM D 5029-98) .....	36
5.1.3	Determinação da granulometria (ASTM D 2862-97) .....	37
5.2	IMPREGNAÇÕES DE ZINCO E COBRE EM CARVÃO ATIVADO.....	37
5.2.1	Preparação do carvão ativado impregnado com zinco e cobre (0,05% e 0,1% m/m) .....	37
5.2.2	Determinação da concentração dos metais zinco e cobre impregnados em carvão ativado.....	37
5.2.3	Determinação do número de iodo (ASTM D 4607-94) .....	38
5.2.4	Análise estrutural e da composição elementar do carvão ativado pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplada ao espectrofotômetro de energia .....	39
5.3	AVALIAÇÃO DE METAIS LIXIVIADOS PÓS-FILTRAÇÃO .....	43
5.4	ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS .....	45
5.4.1	Água desafio com <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 .....	45
5.4.2	Formação de biofilme por <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 em meio filtrante de leito fixo.....	45
5.4.3	Cinética de desenvolvimento.....	50
6	CONCLUSÃO.....	53
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ASTM</b>	American Society for Testing and Materials
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>CAi</b>	Carvão Ativado impregnado
<b>CAni</b>	Carvão Ativado não impregnado
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>EED</b>	Espectrometria de Energia Dispersiva
<b>ufc mL<sup>-1</sup></b>	Unidades formadoras de colônias por mililitro

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de produção de carvão ativado (carbonização e ativação física) .. .....	17
Figura 2 – Processo de ativação química do carvão ativado e remoção do agente ativante.....	19
Figura 3 – Estrutura de grupos funcionais encontrados na superfície do carvão ativado .....	20
Figura 4 – Classificação dos poros do carvão ativado .....	21
Figura 5 - Representação das etapas de desenvolvimento de um biofilme microbiano .....	24
Figura 6 – Sistema de filtração em filtros de leito fixo de carvão ativado .....	32
Figura 7 – Microscopia Eletrônica de Varredura da amostra de carvão ativado não impregnado e das amostras impregnadas com zinco e cobre .....	40
Figura 8 – Espectros da análise da energia dispersiva (EED) do carvão ativado impregnado com 0,1% de Zn e 0,05% de Cu em dois pontos .....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagem dos metais zinco e cobre impregnados no carvão ativado.... .....	38
Tabela 2 - Superfície do carvão ativado detectada pela técnica da massa de iodo adsorvida.....	38
Tabela 3 – Porcentagem do teor de zinco e cobre lixiviados durante a filtração seriada de água destilada .....	43
Tabela 4 – Contagem de <i>E.coli</i> ATCC 8739 associadas aos biofilmes na superfície de carvão ativado .....	45
Tabela 5 - Contagem de células viáveis após 1, 8 e 24 horas das amostras em contato com a água desafio.....	51

## 1 INTRODUÇÃO

O carvão ativado é um adsorvente muito utilizado como meio filtrante para remover cloro e substâncias orgânicas contidas na água, causando sabor, odor e cor (ÇEÇEN; AKTAS, 2011).

Micro-organismos presentes na água podem se aderir à superfície do carvão ativado, consumir matéria orgânica adsorvida no meio e secretar polissacarídeos, formando biofilmes microbianos na superfície do carvão. Durante o processo de filtração, pode ocorrer o desprendimento de algumas bactérias do biofilme, contaminando a água filtrada (GIBERT et al., 2013).

*Escherichia coli* é uma espécie de bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa que habita o trato gastrointestinal de humanos e alguns animais. É responsável por patologias como pneumonias, meningites, infecções intestinais, diarreias moderadas, dentre outras. A *Escherichia coli* cresce sobre uma variedade de superfícies bióticas e abióticas, levando à formação do biofilme (BELOIN; ROUX; GHIGO, 2008).

Pequenas quantidades de metais ou traços de elementos metálicos atuam como agentes bactericidas no crescimento microbiano (LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013). A impregnação de metais à superfície do carvão ativado confere um efeito antimicrobiano. Além da prata, que é o metal empregado comercialmente, outros metais também possuem atividade antimicrobiana, como cobre, zinco, titânio, ouro, entre outros (DIZAJ et al., 2014).

Pela provável presença de micro-organismos e consequente formação de biofilme na superfície do carvão ativado, fatores que diminuem o desempenho do filtro e contaminam a água filtrada, sugere-se o estudo da inibição de formação de biofilme microbiano pela impregnação de zinco e cobre na superfície do carvão ativado.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O DESENVOLVIMENTO NO TRATAMENTO DE ÁGUA

A Portaria nº 2914, de 12 de Dezembro de 2011 do Ministério da Saúde do Brasil (2011), avalia os padrões de qualidades organolépticas, físico-químicas e biológicas da água para ela ser considerada potável, ou seja, para que não ofereça risco à saúde humana. São várias as formas de tratamento para se adquirir a potabilidade, sendo que a mais tradicional para água superficial (água de rios, lagos, etc.), inclui, basicamente, as etapas de coagulação, floculação, decantação, filtração, seguida de correção de pH, desinfecção e fluoretação (BINNIE; KIMBER, 2013).

A qualidade da água de consumo irá depender de todas as fases de tratamento, distribuição e armazenamento do produto (DREWES; FOX, 2000). O tratamento inadequado apresenta-se como um dos principais veículos de parasitas e micro-organismos causadores de doenças, tornando-se um importante elemento de risco à saúde da população que a consome. Dentre os patógenos mais comuns, incluem-se *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, dentre outros (ROMANÍ; GUASCH; BALAGUER, 2016).

A necessidade da remoção de micro-organismos resultou no emprego e desenvolvimento de outras técnicas de tratamento, como por membranas microporosas (LAPOLLI et al., 1997), zeólitas (ALVES, 2008), resinas de troca iônica (RIANI, 2008), filtração em carvão ativado (ARCHER, 2001), entre outras. São técnicas aprimoradas para quantificação de substâncias e organismos diversos que se mantêm em constante e rápida evolução, o que torna mais rigorosos os padrões de potabilidade (CEBALLOS et al., 2009).

Filtros de carvão ativado são utilizados no tratamento de água para remoção de poluentes orgânicos, pois possuem uma vasta área superficial e elevada porosidade (SRINIVSAN et al., 2013).

### 2.2 O CARVÃO ATIVADO

As características úteis do carvão ativado são conhecidas desde tempos antigos, por volta de 1500 A.C, quando egípcios usavam carvão vegetal como um adsorvente

para fins medicinais e como agente purificador (GU; YUSHIN, 2014). Por volta de 420 A.C, Hipócrates utilizava pó de carvão para remover o odor de suas feridas. Anciões da sociedade hindu purificavam sua água por filtração com carvão vegetal. Em 1773, o químico sueco Karl Wilhelm Scheele foi o primeiro a observar adsorção de gases sobre o carvão. Alguns anos mais tarde, carvões ativados começaram a ser utilizados na indústria de açúcar como um agente descorante para xarope (HENNING; VON, 2012).

O carvão ativado é definido como um material constituído principalmente de carbono (87% a 97%), com uma área superficial interna de 500 a 1200 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> e estrutura porosa altamente desenvolvida resultante da transformação de matérias-primas por reações em altas temperaturas (JANKOWSKA; SWIATKOWSKI; CHOMA, 1991).

A preparação de carvão ativado pode ser feita a partir de uma variedade de matérias-primas, tornando-o um produto extremamente versátil. Alguns desses materiais incluem cascas e sementes de frutas, materiais lenhosos, depósitos de resíduos agrícolas e ossos de animais (TAY; UCAR; KARAGÖZ, 2009). Vários subprodutos agrícolas têm sido utilizados para a produção de carvão ativado por serem renováveis e de baixo custo, como bagaços de soja, sementes de abóbora, sabugo de milho, cascas de coco (OKMAN et al., 2014).

Os carvões ativados produzidos a partir de cascas de coco apresentam um grande volume de microporos, tornando-os a matéria-prima mais utilizada para aplicações em que é necessária uma capacidade de adsorção elevada (GU; YUSHIN, 2014).

### **2.2.1 A produção de carvão ativado**

Preparado a partir de um material carbonáceo poroso o carvão ativado apresenta uma forma microcristalina, que passa por processamentos em função do aumento de sua porosidade interna. Carbonização ou pirólise é o primeiro processo a que a matéria-prima é submetida, por meio da qual é carbonizada a temperaturas elevadas, variando de 500 a 800°C. Nesta etapa um produto carbonizado intermediário é obtido e elementos não-carbonáceos são removidos na forma de gases leves e componentes voláteis (CO, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>), favorecendo a formação de uma estrutura



porosa primária que leva a uma subsequente ativação (NOWICKI; KAZMIERCZAK; PIETRZAK, 2015).

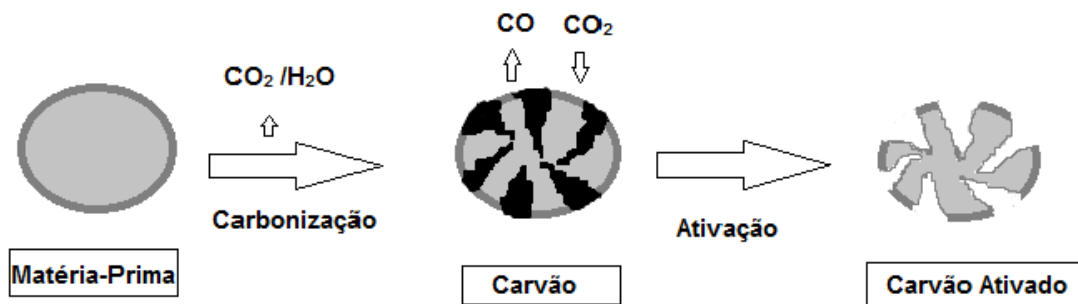
Posterior à pirólise, a ativação é o segundo passo para o aumento da área superficial. Etapa indispensável para o aumento de poros do carvão, pois consiste na retirada de componentes como naftas, alcatrão e resíduos orgânicos que possam obstruir os poros (OZDEMIR et al., 2014). São dois os tipos de processo de ativação: ativação física ou química (KATESA, 2013).

#### 2.2.1.1 Ativação física

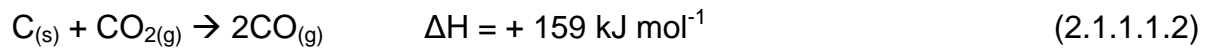
Na ativação física, a matéria-prima é primeiramente carbonizada entre 450-800°C, sob atmosfera inerte, e o carvão resultante é, em seguida, ativado a uma temperatura elevada (700 a 1000 °C) sob o fluxo de um gás contendo oxigênio como, vapor de água, CO<sub>2</sub> ou ar atmosférico, combinados ou separadamente (NIEDERSBERG, 2012).

O processo de ativação por CO<sub>2</sub> exige uma temperatura mais elevada que o vapor, pois o CO<sub>2</sub> 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 oporos, ocorrendo remoção de resíduos de decomposição e de material carbonáceo como representado na Figura 1 (COSTA, 2007).

Figura 1 - Processo de produção de carvão ativado (carbonização e ativação física).



As reações que envolvem a ativação física (térmica) são:



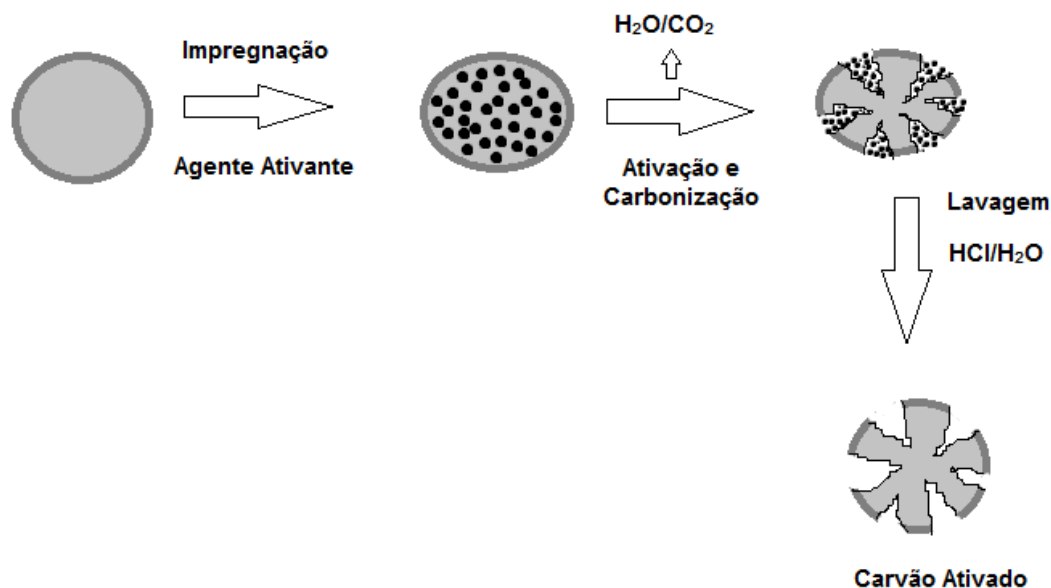
Os processos de ativação térmica com vapor de água e CO<sub>2</sub>, representados nas equações (2.1.1.1.1) e (2.1.1.1.2) respectivamente, são reações endotérmicas que tornam possível um controle sobre a estruturação dos poros (COSTA, 2007).

#### 2.2.1.2 Ativação química

Na ativação química a matéria-prima é impregnada com um reagente de ativação e aquecida numa atmosfera inerte. Os produtos químicos utilizados na ativação química podem ser alcalinos (KOH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaOH e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), alguns ácidos (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e sais de metais (AlCl<sub>3</sub> e ZnCl<sub>2</sub>) (OKMAN et al., 2014). Estes produtos são agentes de desidratação que influenciam na decomposição pirolítica e inibem a formação de alcatrão. A grande vantagem da ativação química se dá pelo baixo custo energético (temperaturas próximas a 600°C) e pela alta eficiência do processo (OZDEMIR et al., 2014).

O mecanismo para a ativação com agentes químicos tende a produzir uma porosidade bem desenvolvida (meso e microporos), além de um rendimento elevado de teor de carbono, pois atua como um agente desidratante mantendo o carbono fixo (FOO; HAMEED, 2011). Através da lavagem, os agentes ativantes são removidos do carvão ativado em seu processo final, por meio de solução ácida ou básica como é mostrado na Figura 2 (OKMAN et al., 2014).

Figura 2 – Processo de ativação química do carvão ativado e remoção do agente ativante.



### 2.2.2 Adsorção

A adsorção é o processo em que há retenção de moléculas ou íons nas superfícies de partículas sólidas. Essa retenção ocorre por interações entre os chamados adsorventes e adsorvatos. Algumas propriedades irão definir a capacidade do carvão ativado adsorver compostos, tais como: teor de cinzas, densidade, área superficial, dimensão, granulometria, tipo de ativação, presença de grupos funcionais e estrutura interna dos poros (EL-HENDAWY, 2003).

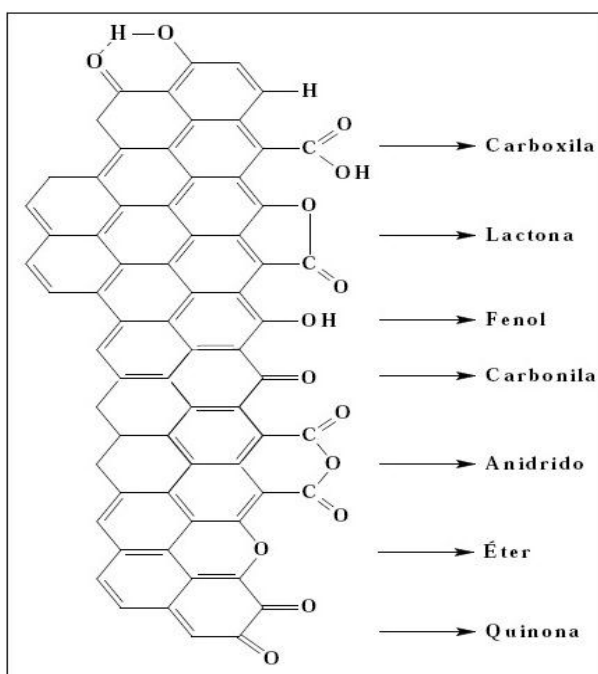
Quanto ao tipo de ativação, as interações que ocorrem em sua superfície são classificadas como fisissorção (adsorção física) e quimissorção (adsorção química). As forças envolvidas na fisissorção incluem as forças de van der Waals (interações de dispersão ou dipolo induzido e interações dipolo-dipolo). A interação adsorvato/adsorvente na adsorção física depende da polaridade da superfície do sólido, devido à adsorvidade e da dispersão de seus sítios ativos (MAURIN, 2014).

Já na quimissorção o adsorvato é fixado fortemente à superfície do adsorvato por meio de interações fortes (ligações químicas covalentes) e assim ocupam sítios que potencializam seu número de coordenação com o substrato (WANG et al., 2015).

Constituído basicamente por carbono, o carvão ativado possui em sua superfície certas quantidades de heteroátomos (oxigênio e hidrogênio, por exemplo) ligados

quimicamente a sua estrutura, além de componentes inorgânicos (cinzas). A presença de cinzas no adsorvente poderá levar à adsorção de água, devido a seu caráter hidrofílico, alterando assim o processo de adsorção, ou seja, reduzindo a adsorção do adsorvato (EL-HENDAWY, 2003). Os grupos funcionais oxigenados encontrados na superfície do carvão ativado irão depender do seu tipo de ativação. Dentre os mais encontrados estão os grupos carboxílicos, éteres, carbonilas, fenólicos, lactonas, dentre outros como é mostrado na Figura 3 (NOWICKI; KAZMIERCZAK; PIETRZAK, 2015).

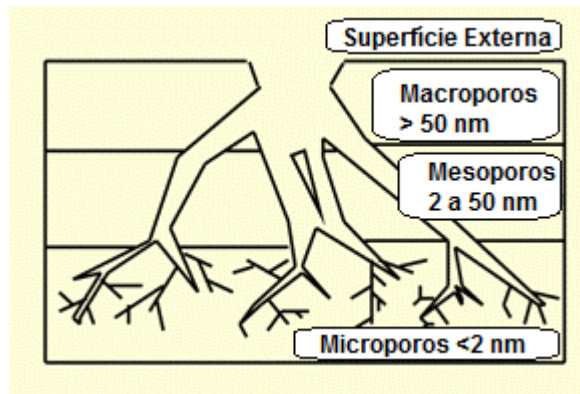
Figura 3 – Estrutura de grupos funcionais encontrados na superfície do carvão ativado.



Fonte: Adaptado de NUNEZ (2009).

O carvão ativado é constituído por poros de diferentes formas e tamanhos. Por definição da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), microporos são poros que apresentam diâmetros menores que 2 nm, mesoporos são definidos como aqueles que possuem um diâmetro entre 2 e 50 nm, e macroporos são os poros com diâmetros maiores que 50 nm. Outra classificação também inclui ultramicroporos, referindo-se a microporos menores que 0,7 nm. A Figura 4 ilustra os macro, meso e microporos em um carbono ativado (ÇEÇEN; AKTAS, 2011).

Figura 4 – Classificação dos poros do carvão ativado.



Fonte: Adaptado de ÇEÇEN; AKTAS ( 2011).

Primeiro são formados os macroporos pela oxidação dos grupos funcionais sobre a superfície do carvão. Em seguida os mesoporos são formados como canais secundários nas paredes da estrutura dos macroporos e finalmente, os microporos são formados dentro da estrutura da matéria-prima (ÇEÇEN; AKTAS, 2011).

### 2.2.3 As aplicações do carvão ativado

A alta aplicabilidade do carvão ativado está relacionada à sua alta porosidade, adsorção rápida e estabilidade térmica (HESAS et al., 2013). Como consequência, existem numerosas aplicações em campos diferentes, tais como na catálise (LIMA et al., 2013), na medicina (ALKHATIB; ZAILAEY, 2015), na proteção ambiental para o controle de tratamento de água (COBB et al., 2012) e efluentes (KUMAR, 2015).

O carvão ativado se tornou mais atraente por seus benefícios ambientais (COBB et al., 2012). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos reconhece que a adsorção por carvão ativado é uma das melhores tecnologias disponíveis de controle. O tratamento de água inclui água potável e de águas residuais, ou seja, utilizado na remoção de uma grande variedade de poluentes do meio aquático (JURADO-SÁNCHEZ et al., 2015).

#### 2.2.3.1 Filtros domésticos

Filtros domésticos com carvão ativado são capazes de adsorver contaminantes (matéria orgânica) presentes na água de consumo e também removem cloro residual provindo da estação de tratamento (HENNING; VON, 2012). No entanto, o carvão

ativado, em meio úmido, se torna propício ao desenvolvimento de micro-organismos patogênicos (NANGMENYI et al., 2009).

Conforme descrito na Norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 16098:2012, para o uso de aparelho para melhoria da qualidade da água de uso doméstico, deve-se informar a capacidade de cessar, diminuir e até mesmo eliminar a taxa de contaminação por micro-organismos. Neste aparelho deve ser comprovada a ausência de contaminantes em seu interior, essencialmente em inatividade, tudo dentro dos padrões estabelecidos pela legislação (ABNT, 2012).

Um dos problemas que podem comprometer o desempenho do filtro de carvão ativado está na possível formação de biofilme, pela aglomeração de bactérias sobre a superfície do carvão. Partículas de carvão ativado possuem textura rugosa e porosa que proporcionam uma superfície favorável e protegida ao crescimento bacteriano. Como resultado, bactérias colonizam a superfície de carvão, diminuindo assim a superfície disponível ao contato com a água e permitindo que esses organismos cresçam e formem biofilmes. A colonização e proliferação bacteriana podem trazer danos como a diminuição de tempo de vida útil do filtro e a contaminação da água filtrada por micro-organismos (GIBERT et al., 2013).

A irregularidade, rugosidade e porosidade da superfície do carvão ativado fornece um ambiente oportuno ao desenvolvimento e crescimento de biofilmes (ISLAM et al., 2016).

### **2.3 BIOFILMES MICROBIANOS**

Biofilmes são sistemas biológicos formados por um agregado de células de micro-organismos sésseis, organizadas e funcionais embebidas em matriz extracelular composta por substâncias poliméricas, a qual possibilita a aderência irreversível a superfícies bióticas ou abióticas (WU; GUO; FU, 2014). A matriz exopolissacarídica consiste principalmente de água (até 95%), polissacarídeos, proteínas e DNA (ácido desoxirribonucléico). Acumula substâncias do meio ambiente, como sais minerais, proteínas e envolve as células bacterianas (PELGRIFT; FRIEDMAN, 2013).

Estudos sobre o revestimento da matriz exopolissacarídica indicam que os biofilmes possuem características elásticas que suportam esforços mecânicos. Os nutrientes estão presos pelas bactérias e a água presente na matriz também está presa

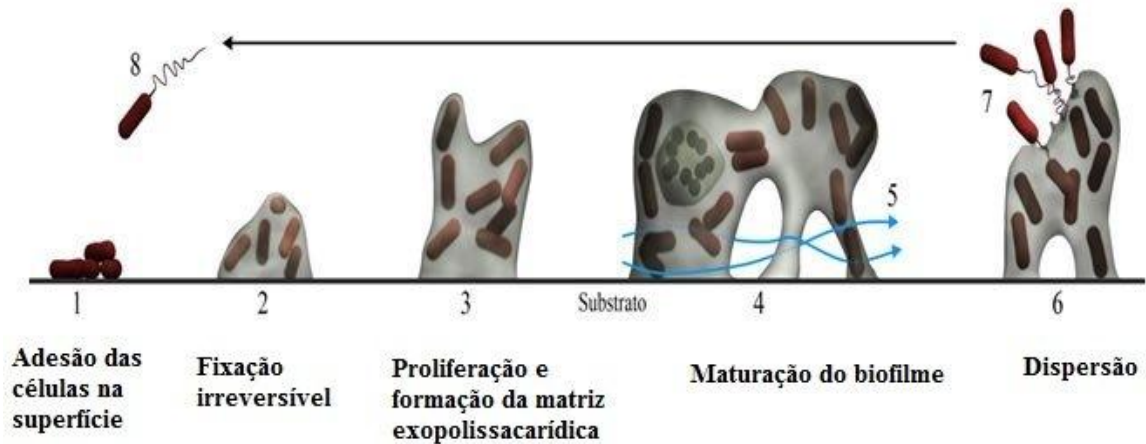
de forma eficiente pelas ligações de hidrogênio com os polissacarídeos hidrofílicos. Ambos os fatores genéticos e ambientais (temperatura, disponibilidade de nutrientes, variação de pH, oxigênio, características do substrato) contribuem para a formação de biofilme. As bactérias podem se adaptar a diferentes condições ambientais, modulando a estrutura do biofilme (GUPTA et al., 2015).

Biofilmes desempenham um papel essencial na sustentabilidade ambiental e na saúde humana. Em ambientes naturais, eles contribuem na biorremediação de compostos tóxicos liberados a partir de atividades humanas. Em tratamento de resíduos, biofilmes são usados para remover compostos orgânicos indesejáveis para fornecer água limpa para a sociedade (CHEW; YANG, 2016).

No entanto, os filmes formados por agentes patogênicos bacterianos também são encontrados no corpo humano e são a raiz de muitas infecções bacterianas persistentes e crônicas. Exemplos de infecções associadas ao biofilme incluem a periodontal, que é uma doença em que a placa bacteriana, um biofilme de múltiplas espécies, provoca cárie dentária, gengivite e periodontite, infecções pulmonares, em que o biofilme bacteriano resiste ao tratamento antimicrobiano e a fagocitose, infecções bacterianas em implantes médicos, em que muitas bactérias patogênicas são capazes de formar biofilmes sobre os materiais utilizados e outros dispositivos (CHEW; YANG, 2016).

O avanço e desenvolvimento de um biofilme microbiano envolvem etapas de adesão, fixação, crescimento e produção de sua matriz extracelular, como se verifica na Figura 5. Biofilmes são formados gradualmente ao longo do tempo (BJARNSHOLT, 2013).

Figura 5 - Representação das etapas de desenvolvimento de um biofilme microbiano.



**Fonte:** Adaptado de MENOITA et al. (2012)

Após a adesão, as células fracamente ligadas consolidam o processo de adesão, produzindo exopolissacarídeos que complexam os materiais da superfície e os receptores específicos localizados nos flagelos, pili ou fímbrias. Na ausência de interferência mecânica ou química, a adesão torna-se, nesta fase, irreversível. Durante este estágio de adesão, os micro-organismos individualizados unem-se uns aos outros, formando agregados na superfície a que aderem (GUPTA, 2015).

Com a adesão irreversível da bactéria à superfície e sua proliferação, inicia-se o processo de maturação do biofilme em que os agregados se desenvolvem em grandes microcolônias, sendo que a complexidade e densidade do biofilme aumentarão à medida que as células se dividem. Nesta etapa os biofilmes tornam-se altamente hidratados, formando-se estruturas abertas compostas por aproximadamente 90% de material não celular, incluindo exopolissacarídeo e canais por onde circulam os nutrientes. 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, podendo rapidamente se dispersar e multiplicar, colonizando novas superfícies e organizando novos biofilmes em novos locais (GUPTA, 2015).

Os biofilmes podem causar significativas infecções agudas, em particular na indústria alimentar e também na distribuição de água. Tais biofilmes são um problema para a saúde pública e indústria. Dentre os principais agentes patogênicos estão a



*Escherichia coli* (DEWANTI, 1995), *Salmonella sp* (VESTBY et al, 2009), *Staphylococcus aureus* (STEPANOVIC et al., 2000), *Shigella sp.*, *Vibrio sp.*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium sp.*, *E. Listeria monocytogenes* (CHEW; YANG, 2016), *Pseudomonas aeruginosa* (STEWART et al, 1993).

### **2.3.1 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* (*E. Coli*) é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, não formadora de esporos, assume a forma de bacilo e pertence à família das Enterobacteriaceae. Possui múltiplos flagelos dispostos em volta de suas células (ALLOCATI et al., 2013).

*E. coli* é comumente usada como indicador de contaminação fecal de abastecimento de água potável, pois trata-se de um habitante consistente, predominantemente facultativo do trato gastrointestinal humano. Além disso, a carga negativa da superfície e as baixas taxas de inativação de *E. coli* garantem que elas possam viajar longas distâncias no subsolo e essas características as tornam indicadoras da contaminação fecal de águas subterrâneas (LUTTERODT, 2012).

No trato digestivo, estão localizadas no intestino grosso, especialmente no ceco e cólon. Residem na camada de muco que abrange as células epiteliais por todo o trato e derramadas para o lúmen intestinal com o componente de muco degradado e excretado nas fezes. Podem ser transmitidas através de alimentos, água, pessoa a pessoa e animal a pessoa. Muitos casos envolvem o consumo de alimentos contaminados, constituindo uma das principais fontes de infecção humana (RIVAS et al., 2015).

Diferentes estirpes de *E. coli* podem causar doenças como, síndrome hemolítica urêmica, diarreia sanguinolenta e também têm sido associadas à septicemia, meningite, pneumonia e infecções em feridas (FEGAN; GOBIUS, 2014).

### **2.3.2 Zinco e cobre**

Zinco é um metal de transição essencial ao organismo humano em pequenas quantidades. É necessário para a atividade catalítica de cerca de 300 enzimas implicadas no metabolismo intermediário. Protege o organismo diminuindo a quantidade de radicais livres em nosso corpo, pois possui ação antioxidante (ATI-

HELLAL et al., 2016). Complexos de zinco possuem atividades biológicas, antibacterianas, anti-inflamatórias e antiproliferativas (TABASSUM et al., 2012).

O cobre, por sua vez, possui benefícios para saúde humana, como no crescimento adequado do corpo, em reações enzimáticas e também na produção de energia. Sendo é um importante cofator no metabolismo oxidativo de várias enzimas. Cu (II) é capaz de clivar o DNA eficientemente por processo oxidativo ou clivagem hidrolítica (TABASSUM et al., 2012). Íons de cobre podem ligar-se a resíduos de aminoácidos aromáticos nas moléculas de enzima e também causar dano oxidativo nas proteínas (JOMOVA; VALKO, 2011).

Íons de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  são transportados pelo sistema de captação de íons metálicos essenciais para a célula, onde podem se acumular e exercer efeitos tóxicos em determinadas concentrações. Cobre e zinco apresentam propriedades antibacterianas (SEIL; WEBSTER, 2012).

A PORTARIA 2914/2011 do Ministério da saúde que estabelece o padrão de potabilidade determina que o teor de cobre em água potável não deve ultrapassar  $2 \text{ mg L}^{-1}$  e o teor de zinco deve ser de  $5 \text{ mg L}^{-1}$ .

#### 2.3.2.1 Atividade antimicrobiana de metais

Metais de transição são utilizados como agentes antimicrobianos, pois apresentam toxicidade para micro-organismos. Compostos de metais antimicrobianos são aplicados na indústria, agricultura e saúde. Essas inovações foram possíveis pela descoberta de metais que desestabilizam biofilmes resistentes a antibióticos, exercem atividade bactericida sinérgica com outros biocidas, inibem as vias metabólicas de um modo seletivo e matam bactérias multirresistentes (LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013).

Metais como a prata (Ag), cobre (Cu), ouro (Au), titânio (Ti) e zinco (Zn) possuem ação antimicrobiana. Estudos *in vitro* revelaram que nanopartículas metálicas inibem várias espécies microbianas (DIZAJ et al., 2014).

Dentre os agentes antimicrobianos, os de maior potencial são aqueles contendo sais de prata, capazes de liberar íons do metal. A atividade antimicrobiana da prata vem sendo estudada de diferentes formas, incluindo íons, metais, e materiais

nanoestruturados. Tem sido utilizada na imobilização de diferentes materiais de suporte, na indústria farmacêutica e no tratamento de água (AKHIGBE, 2016).

Seil e Webster (2012) realizaram um estudo comparando as características morfológicas entre as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* expostas a uma mesma concentração de íons de prata. Ambas as espécies de bactéria exibiram condensação de DNA, separação de membrana celular e danos à parede celular, provocando desnaturação do DNA e assim sua morte celular. Íons de prata foram detectados no citoplasma de cada tipo de bactéria.

Nanopartículas de prata inibem o crescimento bacteriano por inativação das proteínas. Os átomos de prata se ligam a grupos tiol (SH) e desativam enzimas. A prata catalisa a formação de ligações dissulfeto (R-S-S-R) responsáveis pela alteração da forma e estrutura de enzimas celulares, o que afeta sua função. Os íons de prata se ligam ao ribossoma subunidade 30S e desativam o complexo ribossômico, bloqueando a tradução da proteína. Assim, as proteínas, que desempenham papel importante na célula, são afetadas pelas nanopartículas de prata, levando a morte da célula bacteriana. (RAI et al., 2012).

Além da prata, outros metais apresentam atividade antimicrobiana e são utilizados no controle microbiológico. Grande parte na forma de óxidos. Apresentam baixo custo, boa estabilidade química e física e também atividade potencial antimicrobiana (KUMAR; ANTHONY, 2016).

Ahamed et al. (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana de nanopartículas de CuO e verificaram um excelente resultado contra oito estirpes bacterianas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris* e *Staphylococcus aureus*). Nanopartículas de CuO apresentam potencial para utilização como agentes antibacterianos em revestimentos de superfície em vários substratos para evitar a adesão dos micro-organismos e a consequente colonização e formação de biofilmes.

No estudo contra bactérias transmitidas por alimentos, Castro-Mayorga et al. (2016) empregaram nanopartículas de ZnO em embalagens alimentares. O trabalho demonstra o grande potencial de partículas nanoestruturadas de ZnO como material antimicrobiano contra *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*, frequentemente envolvidas em surtos de origem alimentar.

Chohan et al. (2005) realizaram um estudo com ciprofloxacina ligada a metais, dentre eles, cobre (II) e zinco (II) para análise da atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e Gram-negativas, tais como *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 5836) e *Bacillary dysenteriae* (ATCC 7306). Os complexos de metais exibiram uma melhoria acentuada da atividade da ciprofloxacina contra todas as estirpes bacterianas de teste, em comparação com o antibiótico progenitor, ciprofloxacina.

No tratamento de água, Yuen (1998), Heskett e Mich (1999) propuseram em tratamento de fluidos o uso de ligas metálicas por possuírem um sistema de potencial redox. Dentre esses metais, ligas com zinco e cobre (Zn-Cu) foram utilizadas na remoção de cloro e também na eliminação de bactérias.

Ligas redox de cobre/zinco (KDF 55) em conjunto com fibras de carvão ativado foram utilizadas por Zhang et al. (2011) como meios de filtração. Além de beneficiarem a remoção de cloro residual, inibiram o crescimento de micro-organismos e, assim, prolongaram substancialmente a vida útil do filtro.

Além do uso de ligas metálicas associadas ao carvão ativado no processo de filtração de água, a impregnação de metais à superfície do carvão favorece uma importante ação antimicrobiana. Dave, Mukherjee e Srivastava (2011) propuseram a impregnação de metais para prevenir e/ou reduzir a ocorrência de colonização bacteriana na superfície do bloco de carbono. Tais blocos são geralmente impregnados com um metal, tal como prata, cobre ou zinco, separados ou misturados, com variação de concentração de 0,01 a 10% em massa e com uma taxa de lixiviação de metal relativamente baixa.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar o impacto da impregnação de zinco e cobre na superfície de carvão ativado de casca de coco de dendê (*Elaeis guineensis*) na formação de biofilme por *Escherichia coli* ATCC 8739 em meio filtrante de leite fixo.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Determinar as características do carvão ativado não impregnado, como área superficial e porosidade, teor de cinzas, teor de solúveis, granulometria e número de iodo.
- Impregnar zinco e cobre ao carvão ativado em diferentes concentrações e determinar suas respectivas concentrações por meio da técnica de absorção atômica.
- Verificar a estrutura e composição elementar da amostra de carvão ativado não impregnado e das amostras impregnadas com zinco e cobre, utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), acoplada ao espectrofotômetro de energia dispersiva (EDS).
- Avaliar a lixiviação dos metais impregnados no carvão ativado em meio filtrante de leite fixo.
- Analisar a formação de biofilme por *Escherichia coli* ATCC 8739 na superfície das amostras de carvão ativado, impregnadas e não impregnada, em meio filtrante de leite fixo.
- Verificar a atividade inibitória em diferentes concentrações de metais impregnados no carvão ativado separados e em conjunto, na formação de biofilme por *Escherichia coli* após 24 horas.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 CARACTERIZAÇÕES DO CARVÃO ATIVADO

#### 4.1.1 Determinação do teor de cinzas (ASTM D 2866-94)

Amostras de 2,551 g, 2,6041 g e 2,5684 g do carvão ativado de casca de coco de dendê *Elaeis guineensis* (Bahiacarbon Agroindustrial Ltda, Bahia, Brasil) foram lavadas, secadas, pesadas e aquecidas em mufla por 24 h a uma temperatura de 550°C. Posteriormente, as amostras foram resfriadas e pesadas.

#### 4.1.2 Determinação de solúveis em água (ASTM D 5029-98)

Dez gramas de carvão ativado de casca de coco de dendê (*Elaeis guineensis*) foram inseridos em balão de fundo redondo contendo 100 mL de água destilada e assim aquecidos por 15 minutos sob-refluxo. Posteriormente, uma alíquota do balão foi colocada em aquecimento (150°C) em cápsula de porcelana até a secura. Após o resfriamento da cápsula, esta foi pesada.

#### 4.1.3 Determinação da granulometria (ASTM D 2862-97)

Cem gramas de carvão ativado de casca de coco de dendê (*Elaeis guineensis*) foram pesados e passados por peneiras de 20, 36, 40 e 50 mesh. O carvão ativado retido nas peneiras foi pesado.

### 4.2 IMPREGNAÇÕES DE ZINCO E COBRE EM CARVÃO ATIVADO

#### 4.2.1 Preparação do carvão ativado impregnado com zinco e cobre (0,05% e 0,1% m/m)

Foram preparadas soluções estoques de nitrato de zinco  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $5,0 \times 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$ ) e nitrato de cobre  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ( $5,0 \times 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$ ) para obtenção de teores em massa de 0,1% e 0,05% de zinco e cobre em relação à massa de 25 g de carvão ativado de casca de coco de dendê (*Elaeis guineensis*).

Foram adicionados 25 g de carvão ativado em cinco cápsulas de porcelana e posteriormente, adicionaram-se 25 mL das soluções de nitrato de zinco (0,05% ou

0,1%) e/ou nitrato de cobre (0,05% ou 0,1%) para obtenção das seguintes concentrações: 0,1% de Zinco; 0,1% de Cobre; 0,1% Zinco / 0,05% Cobre; 0,05% Zinco / 0,1% Cobre; 0,1% Zinco / 0,1% Cobre. Em seguida, foram aquecidas à temperatura aproximada de 150°C, com agitação até total secagem. As amostras secas foram transferidas para cadinhos e levados à mufla, por 2h e 30 min, a uma temperatura de 250°C.

#### **4.2.2 Determinação do número de iodo (ASTM D 4607-94)**

Soluções de iodato de potássio 0,1 N, tiosulfato de sódio 0,1 N e iodo padrão, foram padronizadas. Em seguida, foram adicionados 20 mL da solução de iodo padrão em um Erlenmeyer contendo 1,000 g de cada amostra impregnada e não impregnada de carvão ativado. As soluções foram mantidas sob agitação e, em seguida tituladas com a solução de tiosulfato de sódio, em triplicata.

#### **4.2.3 Quantificação de metais impregnados do carvão ativado**

Após a impregnação, 0,1 g das amostras de carvão ativado foram aquecidas até a fervura, com 10 mL de ácido nítrico. Em seguida, passaram pelo processo de filtração. Os filtrados recolhidos foram diluídos para 100 mL de água destilada em balão volumétrico. O mesmo procedimento foi realizado para amostra de carvão ativado não impregnado.

Para a quantificação de metais presentes nos filtrados, foram preparadas curvas de calibração (0,04, 0,06, 0,08, 0,1 e 0,12 mg L<sup>-1</sup>) com as soluções padrão de zinco e cobre (1000 mg L<sup>-1</sup>). O equipamento utilizado para a determinação dos metais foi o espectrofotômetro de absorção atômica AAnalyst 400, da Perkin Elmer, na Universidade Estadual de Goiás. Foram construídas curvas de calibração a partir da solução padrão de zinco ( $R^2 = 0,9985$ ) e da solução padrão de cobre ( $R^2 = 0,9991$ ). As quantificações dos metais foram realizadas em triplicata.

#### 4.2.4 Determinação da estrutura e composição química das amostras de carvão ativado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplada ao espectrofotômetro de energia dispersiva (EED)

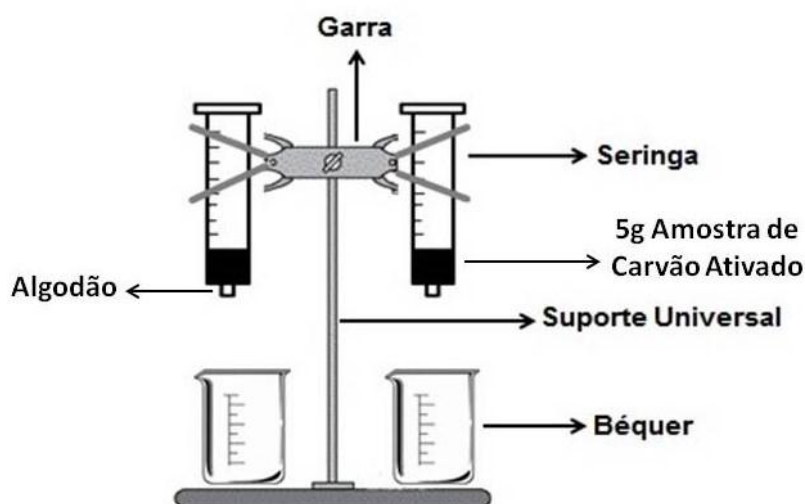
As amostras de carvão ativado impregnadas com zinco e cobre e a amostra não impregnada foram dispostas em disco de alumínio e fixadas em fita dupla face de carbono (superfície condutora) e assim analisadas no microscópio eletrônico de varredura acoplado ao espectrofotômetro de energia dispersiva, Hitachi TM3030 Plus, da Universidade Estadual de Goiás.

### 4.3 AVALIAÇÃO DE METAIS LIXIVIADOS PÓS-FILTRAÇÃO

#### 4.3.1 Filtros de leito fixo

Seringas de 60 mL foram adaptadas como filtros de leito fixo. Foram adicionados 5,00 g de cada amostra de carvão ativado em filtros independentes. Estes foram presos em suportes universais por garras de fixação e para o recolhimento do filtrado, foram utilizados béqueres (Figura 6).

Figura 6 – Sistema de filtração em filtros de leito fixo de carvão ativado.





### 4.3.2 Análise da lixiviação de zinco e cobre nas amostras de carvão ativado

Utilizando o sistema de filtração em leito fixo, foram realizadas cinco passagens de 100 mL de água destilada nas em 5 g das amostras de carvão ativado impregnadas e não impregnada a fim de verificar quantidades dos metais zinco e cobre desprendidos do carvão ativado pelo processo de filtração. Os primeiros 200 mL filtrados foram descartados e os 300 mL recolhidos e armazenados em balão volumétrico de 100 mL para análise.

Foram preparadas curvas de calibração (0,004; 0,006; 0,008; 0,01 e 0,012 mg L<sup>-1</sup>) com as soluções padrão de zinco e cobre (1000 mg L<sup>-1</sup>). O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro de absorção atômica *Aanalyt* 400 da Perkin Elmer da Universidade Estadual de Goiás. A análise da lixiviação dos metais foi realizada em triplicata.

## 4.4 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

### 4.4.1 Reativação de cepa

As cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 (*American Type Culture Collection*) da coleção mantida no Laboratório de Microbiologia do CCET/UEG, em Anápolis-GO, foram utilizadas para realização dos ensaios microbiológicos.

Pela técnica de esgotamento por estriação, as cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 foram repicadas em meio sólido ágar Eosin Methylene Blue Agar (EMB) e incubadas em estufa a 35°C. Após 24 horas o repique foi retirado da estufa e 5 colônias foram transferidas para um tubo contendo 15 mL de caldo nutriente com 20% v/v de glicerol. O tubo foi homogeneizado em vortex e posteriormente incubado em estufa a 35°C. Após 12 horas retirou-se o tubo da estufa e transferiu-se alíquotas de 1 mL para microtubos (Eppendorf). Esses microtubos foram armazenados por sete dias, a uma temperatura de 8°C, posteriormente congelados a -20°C.

#### **4.4.2 Preparo da água desafio com *Escherichia coli* ATCC 8739**

Após o processo de reativação, as cepas foram crescidas em ágar EMB a 35°C por 24 horas, 5 colônias foram transferidas para tubos com 10 mL de água peptonada e ajustada à turvação de 0.5 McFarland ( $1,5 \times 10^8$  ufc mL<sup>-1</sup>).

Alíquotas de 0,6 mL do ajuste foram transferidas para seis Erlenmeyers contendo 59,4 mL de água destilada. De cinco dos seis Erlenmeyers, foram retirados 0,2 mL perfazendo o total de 1 mL para a diluição em série ( $10^{-5}$ ), em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução fisiológica. 0,2 mL da suspensão do sexto Erlenmeyer foram descartados.

Após a diluição da água desafio, as suspensões foram semeadas em ágar EMB por 24 h, em estufa, com temperatura de 35°C. Posteriormente, realizou-se a contagem de colônias de *E. coli*.

#### **4.4.3 Ensaio microbiológico**

Utilizando o mesmo sistema de filtração em leito fixo, foram adicionados 5,00 g de cada amostra de carvão ativado em filtros independentes. 60 mL de água desafio foram adicionadas a cada filtro e passadas pelo processo de filtração, durante 50 minutos. Posteriormente os filtros foram incubados em câmara úmida, em ausência de luz, por 24 horas, à temperatura ambiente de aproximadamente 25°C.

Em seguida, as amostras de carvão ativado contidas nas seringas foram transferidas para Erlenmeyers contendo 100 mL de solução fisiológica estéril e assim submetidas ao desprendimento do biofilme microbiano em banho ultrassônico (25 KHz) por 5 minutos em Ultrassom UNIQUE modelo USC 1450. Alíquotas de 1mL de cada suspensão das amostras sonicadas foram diluídas em série até  $10^{-5}$  e posteriormente, semeadas em ágar EMB para seguinte contagem de células viáveis.

O ensaio foi realizado em triplicata em capela de fluxo laminar, com a amostras impregnadas sem tratamento de pré-lavagem e amostras impregnadas com tratamento de pré-lavagem. O tratamento de pré-lavagem consiste na passagem de 500 mL de água destilada em amostras impregnadas antes da realização do ensaio

microbiológico, a fim de verificar uma possível interferência na eficiência de inibição de biofilme pela lixiviação de metais.

#### 4.4.3.1 Cinética de desenvolvimento

Para a análise de cinética de desenvolvimento, as amostras com tratamento de pré-lavagem foram submetidas ao mesmo teste microbiológico, mas foi realizada a contagem de células viáveis das amostras em contato com a água desafio após 1, 8 e 24 horas. O teste foi realizado em triplicata.

### 4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS

Foi utilizado o programa *Graphpad Prism 6* para determinar a significância dos valores de formação do biofilme da amostra de carvão ativado não impregnado e das amostras de carvão ativado impregnados nos ensaios microbiológicos. Aplicou-se o teste *t Student* pareado bicaudal e não pareado, comparando duas amostras pareadas e duas amostras independentes.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÕES DO CARVÃO ATIVADO

#### 5.1.1 Determinação do teor de cinzas (ASTM D 2866-94)

O teor de cinzas da amostra de carvão ativado de casca de coco de dendê (*Elaeis guineensis*) obtido foi de 8,3% (m/m). Zago (2010) determinou valores de teores de cinza entre amostras de carvão ativado de casca de coco de 6,79% e 8,78% (m/m). Oliveira (2014) 2% e 1,24% (m/m) em amostras de carvão ativado de casca de coco verde (*cocos nucifera*) e Reis et al. (2015) 3,61% (m/m) em amostra de carvão ativado de casca de coco de babaçu (*Orbignya phalerata* Martius). O teor de cinzas encontrado em cada material está relacionado à natureza do material precursor ou ao processo de fabricação e lavagem do carvão após a ativação (PEREIRA, 2010).

As cinzas são resíduos de minerais que permanecem na superfície do carvão ativado após sua queima. Segundo Vale et al. (2004) valores de cinzas para o carvão produzido a partir do mesocarpo do coco estão relacionados a sua composição química, apresentando substâncias minerais, como cálcio, potássio, fósforo, magnésio, ferro, sódio, entre outros. De acordo com Jaguaribe et al. (2005), a porcentagem do teor de cinzas de carvão ativado comercial é de até 15% (m/m). Um valor menor que 15% é desejável para a eficiência da adsorção, sendo o valor de 8,3% (m/m) determinado no presente trabalho, um valor abaixo do citado por Jaguaribe et al. (2005).

#### 5.1.2 Determinação de solúveis em água (ASTM D 5029-98)

A média em massa de substâncias presentes na amostra de carvão ativado, solúveis em água, foi de 0,24% (m/m). Os materiais solúveis em água são aqueles presentes nos poros do carvão ativado, sendo geralmente sais, açúcares simples, polissacarídeos e outros compostos (GUIMARÃES, 2006). A baixa porcentagem encontrada de solúveis indica que os componentes do carvão ativado, em sua maioria, são insolúveis em água, o que não compromete a eficácia e funcionalidade do carvão em filtros de água. Comparando com o valor encontrado por Oliveira (2014), de 0,19% e por Sebastiany (2015) de 0,33% (m/m), em amostra de carvão ativado de casca de coco de dendê, entende-se que a quantidade de solúveis irá variar de acordo com a

forma de preparo e ativação e também pode ser influenciada pela matéria-prima utilizada.

### **5.1.3 Determinação da granulometria (ASTM D 2862-97)**

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. A 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. Além de apresentar elevada área superficial, a granulometria 20 x 40 mesh cumpre com as necessidades para uso em filtragem de água, como a distribuição de grãos homogêneos (REIS et al., 2015).

## **5.2 IMPREGNAÇÕES DE ZINCO E COBRE EM CARVÃO ATIVADO**

### **5.2.1 Preparação do carvão ativado impregnado com zinco e cobre (0,05% e 0,1% m/m)**

As concentrações de 0,05% e 0,1% (m/m) dos metais impregnados foram escolhidas baseadas na literatura, como Dizaj et al. (2014) que citam a eficiência antimicrobiana de nanopartículas de Ag, ZnO e CuO. Todas apresentam eficiente atividade antimicrobiana, mas nanopartículas de Ag apresentam resultados satisfatórios em menores concentrações quando comparadas às concentrações das nanopartículas de ZnO e CuO. Sendo a prata utilizada comercialmente (0,08% m/m) foram utilizadas concentrações de zinco e cobre abaixo e acima deste valor, para verificar a eficiência antimicrobiana destes metais juntos e separados.

### **5.2.2 Determinação da concentração dos metais zinco e cobre impregnados em carvão ativado**

Na Tabela 1, verificam-se os resultados das porcentagens em massa dos metais zinco e cobre.

Tabela 1 – Porcentagem dos metais zinco e cobre impregnados no carvão ativado.

Amostras	% Metais Impregnados	EP
	MED ± DP	
<b>CA<sub>ni</sub></b>	<LD	-
<b>CA<sub>i1</sub> (Zn)</b>	<b>0,101 ± 0,003</b>	0,0015
<b>CA<sub>i2</sub> (Cu)</b>	<b>0,102 ± 0,001</b>	0,0006
<b>CA<sub>i3</sub> (Zn / Cu)</b>	<b>0,0994 ± 0,0006 / 0,0597 ± 0,001</b>	0,0003 / 0,0006
<b>CA<sub>i4</sub> (Zn / Cu)</b>	<b>0,060 ± 0,0006 / 0,102 ± 0,0012</b>	0,0003 / 0,0007
<b>CA<sub>i5</sub> (Zn / Cu)</b>	<b>0,108 ± 0,0006 / 0,110 ± 0,0006</b>	0,0003 / 0,0003

Legenda: CA<sub>ni</sub> – carvão ativado não impregnado; CA<sub>i</sub> - carvão ativado impregnado; Zn – zinco; Cobre – cobre; <LD – menor que o limite de detecção; DP - desvio padrão; EP – erro padrão.

Nota-se na Tabela 1 que a amostra CA<sub>ni</sub> apresentou valores abaixo dos limites de detecção para zinco e cobre, que ( os limites de detecção devem ser >0,04 µg L<sup>-1</sup> para zinco e >0,05µg L<sup>-1</sup> para cobre). As amostras impregnadas CA<sub>i</sub> apresentaram porcentagens de concentrações de zinco e cobre esperadas.

### 5.2.3 Determinação do número de iodo (ASTM D 4607-94)

Valores das massas de iodo adsorvidas pelo carvão ativado estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Superfície do carvão ativado detectada pela técnica da massa de iodo adsorvida.

Amostras	Massa de iodo adsorvida	p
	em CA (mg g <sup>-1</sup> )	
	MED ± DP	
<b>CA<sub>ni</sub></b>	<b>1279,00 ± 4,58</b>	
<b>CA<sub>i1</sub> (0,101% Zn)</b>	<b>1263,33 ± 4,93</b>	0,0157
<b>CA<sub>i2</sub> (0,102% Cu)</b>	<b>1260,67 ± 2,08</b>	0,0032
<b>CA<sub>i3</sub> (0,0994% Zn / 0,0597% Cu)</b>	<b>1247,00 ± 2,00</b>	0,0004
<b>CA<sub>i4</sub> (0,060% Zn / 0,102% Cu)</b>	<b>1244,33 ± 1,53</b>	0,0002
<b>CA<sub>i5</sub> (0,108% Zn / 0,110% Cu)</b>	<b>1231,67 ± 2,52</b>	0,0001

Legenda: CA - carvão ativado; MED - média; DP - desvio padrão; CA<sub>ni</sub> – carvão ativado não impregnado; CA<sub>i</sub> - carvão ativado impregnado; p – nível descritivo do teste t da diferença das amostras CA<sub>i</sub> versus amostra CA<sub>ni</sub>;

O número de iodo expressa a quantidade de iodo adsorvida pelo carvão ativado e se relaciona com a adsorção de moléculas de pequena massa molecular (DI BERNARDO; DANTAS, 2005). Segundo a ABNT NBR 11834:1991 o número de iodo adsorvido deve, ser no mínimo, de 600 mg g<sup>-1</sup>. Estima-se que a adsorção de 1 mg de iodo seja correspondente a 1 m<sup>2</sup> de superfície interna dos carvões ativados, o que seria uma maneira de estimar sua área superficial (EL-HENDAWY et al., 2001).

Na Tabela 2, constata-se que o CAni apresentou uma massa de 1279 mg g<sup>-1</sup> de iodo adsorvido, ou seja, uma massa bem acima do mínimo estabelecido pela ABNT NBR 11834:1991, indicando que o carvão ativado de casca de coco de dendê (*Elaeis guineensis*) possui uma grande área superficial, pois quanto maior a quantidade de iodo adsorvido pelo carvão, maior será sua área superficial.

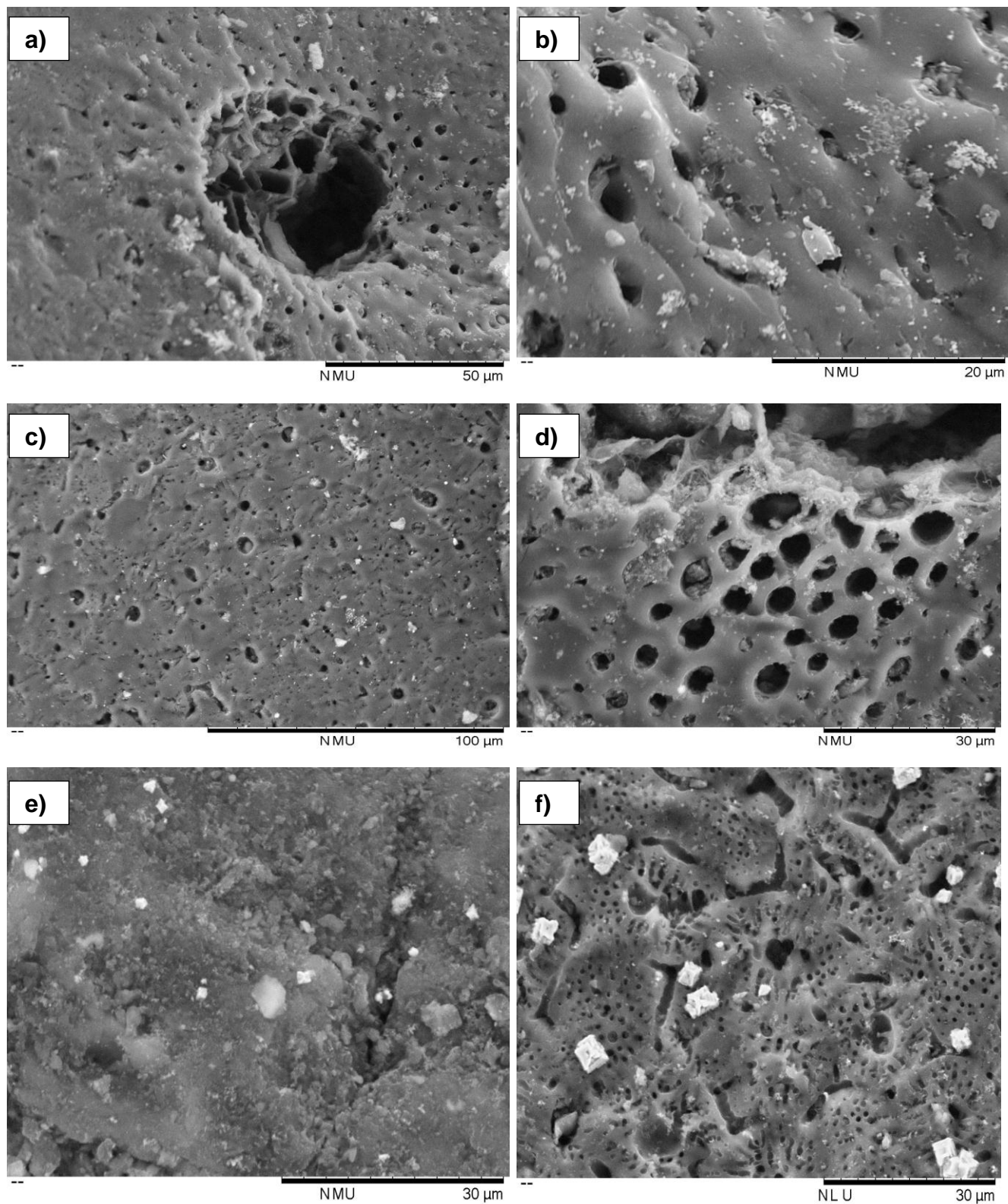
A impregnação de metais à superfície do carvão ativado ocasiona uma obstrução de poros, diminuindo assim sua área superficial (YANG et al., 2012). Comparando os valores das amostras impregnadas CAi com a amostra CAni na Tabela 2, verificam-se diferenças estatisticamente significativas com valores de p<0,05. No entanto, apesar de a impregnação de metais ocasionarem uma diminuição da área superficial, essa diminuição é desprezível quando comparada ao tamanho da superfície restante. As áreas superficiais sofreram redução durante o processo de impregnação, mas os metais impregnados não alteraram, de forma significativa a área superficial do carvão, permanecendo sua atividade adsortiva.

#### **5.2.4 Análise estrutural e da composição elementar do carvão ativado pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplada ao espectrofotômetro de energia dispersiva (EED)**

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para observar a morfologia das amostras de carvão ativado granular de casca de coco de dendê (*Elaeis guineensis*). Para análise da composição elementar das amostras utilizou-se acoplado ao MEV o espectrofotômetro de energia dispersiva (EDD).

A Figura 7 reúne as fotomicrografias da amostra não impregnada (CAni) e das amostras impregnadas com zinco e cobre (CAi).

Figura 7 – Microscopia Eletrônica de Varredura da amostra de carvão ativado não impregnado e das amostras impregnadas com zinco e cobre.



Legenda: a) MEV da amostra CAi0 1200x; b) MEV da amostra CAi1 4000x; c) MEV da amostra CAi2 1000x; d) MEV da amostra CAi3 2000x; e) MEV da amostra CAi4 2500x; f) MEV da amostra CAi5 2000x.



Pelas fotomicrografias da Figura 7, observam-se estruturas irregulares em todas as amostras de carvão ativado de casca de coco de dendê, além da presença de poros superficiais, com ampla variação em seus tamanhos.

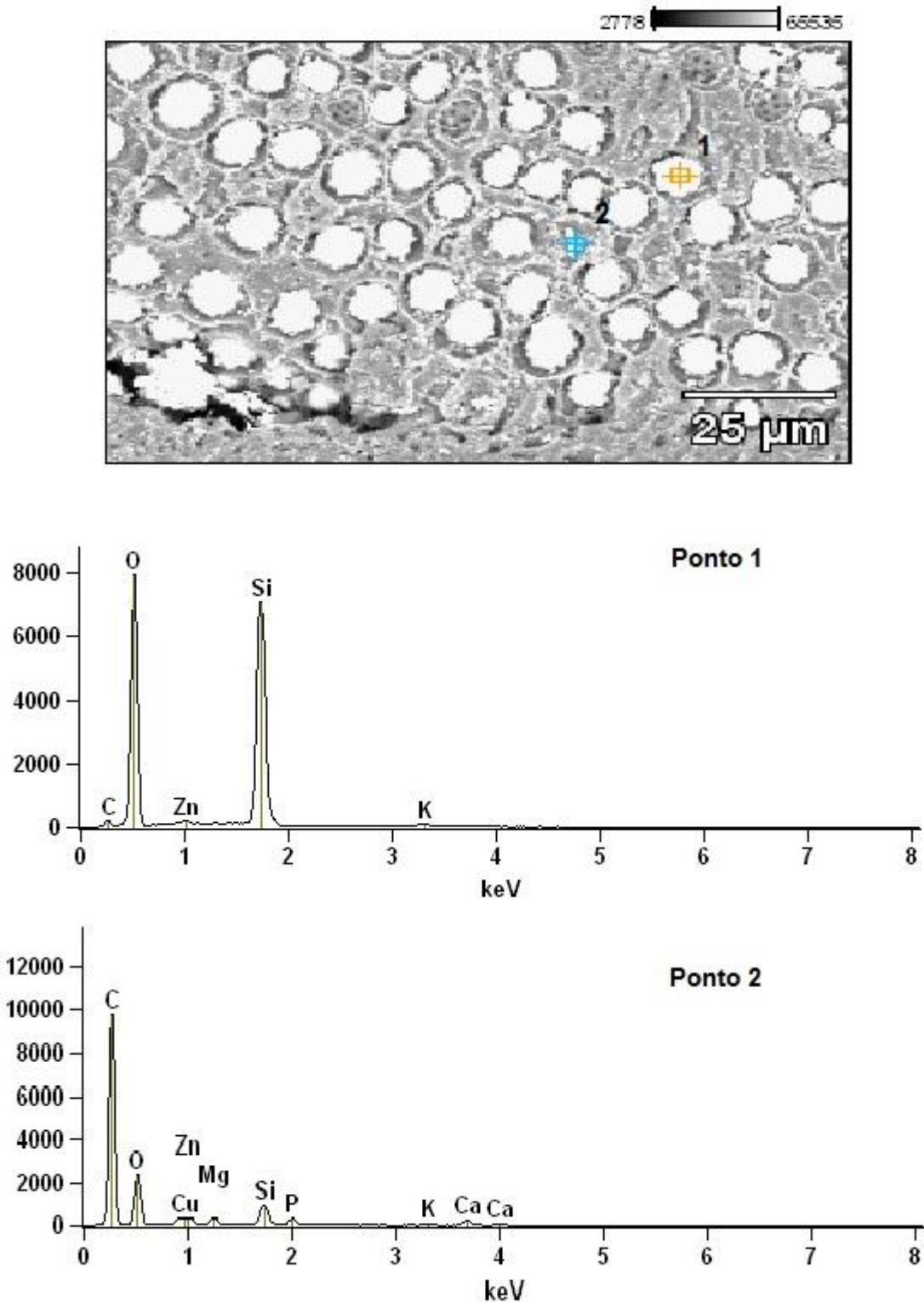
Na análise realizada por EED, verificou-se que a matéria-prima apresenta cerca de 80%, em massa, de constituição carbônica. Essa constituição baseia-se num arranjo carbônico, agregado a elementos presentes na matéria orgânica precursora do carvão ativado (casca de coco de dendê) ou ainda do processo de tratamento ao qual foi submetido (HARO et al., 2012).

Além de carbono, observam-se também, oxigênio, silício, alumínio e potássio. Todos os elementos são comuns em carvões ativados produzidos a partir de material vegetal, como é o caso da matéria-prima utilizada neste trabalho que é originada da casca de coco de dendê. Cálcio, sódio e magnésio também foram detectados com pequena porcentagem em massa, oriundos da matéria-prima original.

Nas amostras impregnadas, além dos elementos provenientes da matéria-prima, foi observada, também a presença dos metais zinco e cobre, impregnados nas amostras.

Em pesquisa análoga ao presente estudo, Sebastiany (2015) empregou a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), acoplada ao espectrofotômetro de energia dispersiva (EED) em suas amostras. Na amostra de carvão ativado de casca de coco de dendê impregnado com 0,1% de Zn e 0,05% de Cu, espectros de EDS foram analisados em pontos específicos. Na Figura 8 verificam-se dois pontos analisados pelos espectros da análise da energia dispersiva da amostra.

Figura 8 – Espectros da análise da energia dispersiva (EED) do carvão ativado impregnado com 0,1% de Zn e 0,05% de Cu em dois pontos.



Fonte: Adaptado de Sebastiany (2015)

Sebastiany (2015) relata que, no ponto 1, sinais intensos de silício e oxigênio indicam a presença de silicatos e pouco sinal de zinco, que pode estar depositado sobre o silicato neste ponto. Já no ponto 2, verifica-se um sinal intenso de carbono e pequenos sinais de zinco e cobre, depositados sobre a estrutura carbonácea do carvão ativado.

No presente trabalho não foi realizada análise da composição elementar em pontos específicos, mas ao observar as análises de Sebastiany (2015) consegue-se identificar que os metais impregnados, zinco e cobre, ficam depositados não apenas na estrutura carbonácea, como também na superfície dos silicatos.

### 5.3 AVALIAÇÃO DE METAIS LIXIVIADOS PÓS-FILTRAÇÃO

A quantidade em massa e a porcentagem de lixiviação dos metais nas amostras de carvões ativados impregnados com zinco e cobre e na amostra não impregnada estão organizados na Tabela 3.

Tabela 3 – Porcentagens de zinco e cobre lixiviados durante a filtração seriada de água destilada.

	Teor de metais lixiviados (%)					
	Terceira Filtração		Quarta Filtração		Quinta Filtração	
	Zn	Cu	Zn	Cu	Zn	Cu
<b>CAni</b>	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
<b>CAi1 (0,01% Zn)</b>	0,018	< LD	0,009	< LD	0,004	< LD
<b>CAi2 (0,102% Cu)</b>	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
<b>CAi3 (0,0994% Zn / 0,0597% Cu)</b>	0,016	< LD	0,012	< LD	0,008	< LD
<b>CAi4 (0,060% Zn / 0,102% Cu)</b>	0,030	< LD	0,023	< LD	0,013	< LD
<b>CAi5 (0,108% Zn / 0,110% Cu)</b>	0,012	< LD	0,005	< LD	< LD	< LD

Legenda: CAni – carvão ativado não impregnado; CAi – carvão ativado impregnado; Zn – Zinco; Cu – Cobre; < LD – menor que o limite de detecção.

A lixiviação é o processo de remoção de espécies químicas que não estão presas à estrutura da amostra (CHEN et al., 2015). No presente trabalho, o carvão ativado passa pelo processo de impregnação de metais à sua superfície. Partes desses

metais impregnados não se fixam totalmente à estrutura do carvão, sendo desprendidos e liberados durante as primeiras filtrações de água. Portanto, certo volume de água filtrada deverá ser descartado na primeira utilização, pois quantidades de metais estarão presentes no filtrado inicial. Pelos padrões de potabilidade estabelecidos pela Portaria do Ministério da Saúde 2914/2011, os valores máximos de cobre e zinco em água potável devem ser, respectivamente, de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  e  $5 \text{ mg L}^{-1}$ .

Os primeiros 200 mL do filtrado recolhido foram descartados, uma vez que a maior parte dos metais são liberados nesta etapa. Analisando os teores de lixiviação dos metais zinco e cobre, na Tabela 3, na terceira, quarta e quinta filtrações, verifica-se que, na amostra CA<sub>ni</sub>, não houve desprendimento de zinco e cobre e como observado na determinação de concentração das amostras na Tabela 1, a matéria-prima (carvão ativado de casca de coco de dendê) não apresenta traços de tais metais. Apresentou valores abaixo dos limites de detecção para zinco e cobre (limites devem ser  $>0,04 \mu\text{g L}^{-1}$  para zinco e  $>0,05 \mu\text{g L}^{-1}$  para cobre).

Nas amostras impregnadas observam-se valores de lixiviação de zinco bem abaixo do valor padrão de potabilidade estabelecido pela PORTARIA 2914/2011. Verifica-se, ainda, que a cada passagem de 100 mL de água destilada, a lixiviação em cada amostra CA<sub>i</sub> diminui, sendo esse desprendimento considerado irrelevante em relação aos níveis de toxicidade. Já na lixiviação de cobre, não foi verificado nenhum desprendimento na terceira, quarta e quinta filtrações. Dessa forma, é possível inferir que os metais cobre e zinco se encontram impregnados apropriadamente à superfície do carvão ativado.

Com a perda de metal, a superfície do carvão ativado se torna desprotegida, susceptível à formação de biofilme microbiano. Como foi verificado, apenas uma pequena parcela de zinco se desprenderá durante as filtrações, beneficiando um amplo tempo de vida útil ao filtro impregnado com zinco e cobre.

## 5.4 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

### 5.4.1 Água desafio com *Escherichia coli* ATCC 8739

A portaria INMETRO 394/2014 determina que a concentração de *Escherichia coli* varie de 5 a 6,954 Log<sub>10</sub> ufc para 100 mL de água, nos ensaios de controle microbiológico.

No presente estudo, a contagem de *Escherichia coli* nas amostras de água desafio variou de 5,66 a 5,93 Log<sub>10</sub> ufc 100 mL<sup>-1</sup>. As contagens se apresentaram dentro dos valores preconizados pela portaria.

### 5.4.2 Formação de biofilme por *Escherichia coli* ATCC 8739 em meio filtrante de leite fixo

As contagens de células viáveis associadas à formação de biofilme por *E. coli* na superfície das amostras de carvão ativado sem tratamento de enxágue e amostras com tratamento de enxágue estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Contagem de *E.coli* ATCC 8739 associadas aos biofilmes na superfície de carvão ativado.

Amostras	Sem pré-lavagem		Com pré-lavagem	
	Log 10 ufc 5g <sup>-1</sup>		Log 10 ufc 5g <sup>-1</sup>	
	Contagem	P	Contagem	P
	MED ± DP		MED ± DP	
<b>CA<sub>ni</sub></b>	<b>6,745 ± 0,132</b>		<b>6,707 ± 0,064</b>	
<b>CA<sub>i1</sub> (0,101% Zn)</b>	<b>2,526 ± 0,370</b>	0,0001	<b>3,199 ± 0,169</b>	0,0001
<b>CA<sub>i2</sub> (0,102% Cu)</b>	<b>1,143 ± 1,018</b>	0,0007	<b>2,916 ± 0,074</b>	0,0001
<b>CA<sub>i3</sub> (0,0994% Zn / 0,0597% Cu)</b>	NHC	-	NHC	-
<b>CA<sub>i4</sub> (0,060% Zn / 0,102% Cu)</b>	NHC	-	NHC	-
<b>CA<sub>i5</sub> (0,108% Zn / 0,110% Cu)</b>	NHC	-	NHC	-

Legenda: ufc – unidade formadora de colônia; MED - média; DP - desvio padrão; CA<sub>ni</sub> - carvão ativado não impregnado; CA<sub>i</sub> - carvão ativado impregnado; p - nível descritivo do teste t da diferença das amostras CA<sub>i</sub> versus amostra CA<sub>ni</sub>; NHC – não houve crescimento.

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). Na tabela 4 verifica-se que as amostras de carvão ativado não impregnado (CA<sub>ni</sub>) com e sem tratamento de pré-lavagem formaram biofilmes por *Escherichia coli* ATCC 8739 após a passagem da água desafio e incubação por 24 horas. A média de contagem de células viáveis de *E. coli* associada à formação de biofilme na superfície do CA<sub>ni</sub> aumentou aproximadamente 1 log em relação à média de contagem de *E. coli* na água desafio.

A formação de biofilme na superfície do carvão ativado pode resultar em prejuízos, como a diminuição de sua eficiência de adsorção, e também diminuir a qualidade da água pelo desprendimento indesejável de micro-organismos do filtro (GIBERT et al., 2013). Gabr et al. (2009) verificaram que a formação de biofilme em carvão ativado granular por *Escherichia coli* ASU 7 diminuiu acentuadamente o diâmetro médio dos poros do carvão, com uma consequente diminuição significativa da superfície específica, com bloqueio de microporos.

Todas as amostras impregnadas (CA<sub>i</sub>), com e sem tratamento de pré-lavagem, apresentaram significativas inibições de biofilme por *Escherichia coli* ATCC 8739. CA<sub>i1</sub> e CA<sub>i2</sub> exibiram um crescimento bacteriano abaixo do valor encontrado na amostra não impregnada (CA<sub>ni</sub>). Já as amostras impregnadas com os metais zinco e cobre em conjunto, tiveram inibições extremamente significativas de aproximadamente 6 logs.

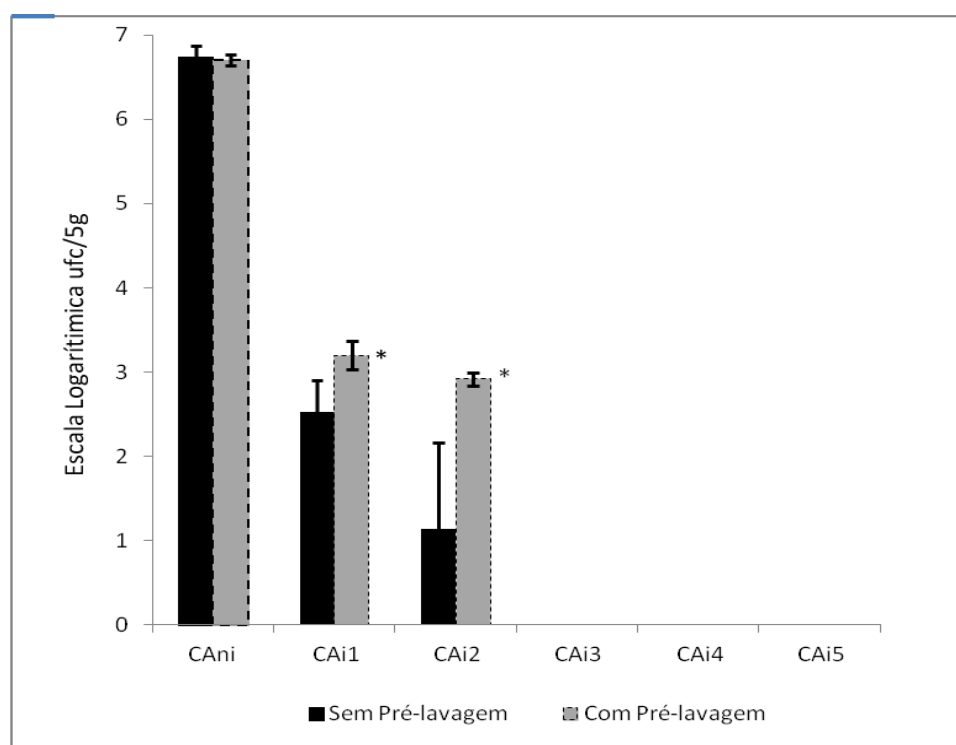
A normativa brasileira ABNT NBR 16098/2012 estabelece requisitos e métodos de ensaios para avaliação da eficiência bacteriológica. Para ensaios com *Escherichia coli* se estabelece uma concentração inicial com no mínimo de  $1 \times 10^5$  e máximo de  $9 \times 10^6$  ufc 100 mL<sup>-1</sup> (5 a 6,954 logs) de *Escherichia coli* e apresente um resultado de redução mínima de 2 logs (ABNT, 2012). Analisando os dados da Tabela 4, verifica-se que os ensaios realizados se adequaram aos critérios estabelecidos pela norma, com resultados de até 6 logs de diminuição.

Os valores encontrados nos ensaios com amostras sem e com tratamento de pré-lavagem demonstraram que os metais impregnados em conjunto tornam a superfície do carvão ativado um material com maior ação antibacteriana, do que quando impregnados separadamente. Portanto, a combinação dos metais é eficaz contra a formação de biofilmes por *E. coli*.

O tratamento de pré-lavagem do meio filtrante antes do ensaio microbiológico remove os metais zinco e cobre não fixados à superfície do carvão ativado após a etapa de impregnação. Pela análise de lixiviação na Tabela 3, pode-se observar pequena liberação de zinco e valores de limites não detectáveis de desprendimento de cobre já na terceira filtração.

No gráfico 1, a seguir, verifica-se como ocorreu a formação de biofilme nas amostras sem e com tratamento de pré-lavagem.

Gráfico 1 - Inibição da formação de biofilme por *E. coli* nas amostras com e sem tratamento de pré-lavagem.



Legenda: ufc – unidade formadora de colônia; CAni - carvão ativado não impregnado; CAi - carvão ativado impregnado; CAi1 - 0,101% de Zn; CAi2 - 0,102% de Cu; CAi3 - 0,0994% Zn / 0,0597% Cu; CAi4 - 0,060% Zn / 0,102% Cu; CAi5 - 0,108% Zn / 0,110% Cu. \* Diferenças significativas entre os tratamentos de pré-lavagem.

No gráfico 1, nota-se que no ensaio microbiológico das amostras com tratamento de pré-lavagem, a formação de biofilme foi mais intensa. A passagem de água e posterior desprendimento dos metais não fixos à superfície resultaram em um efeito antimicrobiano minimizado, se comparado com os resultados das amostras sem

tratamento de pré-lavagem. Já nas amostras impregnadas com zinco e cobre em conjunto (CAi3, CAi4 e CAi5), a lixiviação não afetou este efeito, não ocorrendo o crescimento microbiano.

Pelo exposto, fica claro que amostras impregnadas concomitantemente com zinco e cobre (CAi3, CAi4 e CAi5) apresentaram total inibição de biofilme nos dois ensaios. Assim, o efeito sinérgico potencializa com a associação desses metais, ou seja, o efeito oligodinâmico, que é caracterizado pelos efeitos letais que íons metálicos exercem sobre micro-organismos, mesmo em pequenas quantidades, foi intensificado com a impregnação em conjunto de zinco e cobre à superfície do carvão ativado (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 2005).

Metais, como o zinco e o cobre, são tóxicos à maioria das bactérias e possuem atividade microbicida. Exercem atividade bactericida sinérgica com outros biocidas, inibem vias metabólicas de forma seletiva e matam bactérias multirresistentes. As doses tóxicas desses metais interrompem seletivamente os processos necessários ao crescimento celular, participam de reações que inibem atividades enzimáticas, interrompem a função da membrana ou danificam o DNA. A investigação nesta área tem sido lenta devido à diversidade metabólica dos micro-organismos, o que dificulta o estudo da toxicidade do metal (LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013).

Uma análise da atividade antimicrobiana de nanopartículas de ZnO contra *Escherichia coli* foi realizado por Liu et al. (2009). 12 mmol L<sup>-1</sup> de nanopartículas de ZnO inibiram completamente o crescimento de *E. coli*. Distorceram e danificaram a membrana celular, resultando em um vazamento do conteúdo citoplasmático.

Shih e Lin (2010) avaliaram íons de cobre e prata em um método de desinfecção contra biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Acinetobacter baumannii* na distribuição de água hospitalar. O inóculo das suspensões bacterianas continham 3 x 10<sup>6</sup> 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. Há formação de ligações eletrostáticas nos grupos carregados negativamente localizados na parede celular bacteriana. A combinação de íons cobre e prata gera um efeito sinérgico que controla a formação do biofilme bacteriano. Este mesmo efeito pode ser observado nos



resultados encontrados no presente trabalho, que combina zinco e cobre, mas em concentrações menores e com uma inibição de 100%.

Estudos mostram que doses tóxicas de certos íons metálicos (especialmente Fe (II) e Cu (II)), aumentam as espécies reativas de oxigênio ROS intracelulares. Em *E. coli*, a desregulação do metabolismo do Fe leva ao dano do DNA e à exposição ao Cu (II) bloqueia atividades enzimáticas. As toxicidades associadas a esses metais podem ser devidas a danos celulares mediados por ROS e diferentes reações de oxidação catalisadas por metal podem estar subjacentes a tipos específicos de danos à proteína, membrana ou DNA (LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013).

Sebastiany (2015) realizou uma pesquisa análoga ao presente estudo. Amostras de carvão ativado de casca de coco de dendê foram impregnadas com zinco e cobre em concentrações semelhantes. Estas foram submetidas a ensaio microbiológico para inibição de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Os resultados demonstraram que amostras contendo metais impregnados em conjunto apresentaram inibições maiores (até 3 logs) que amostras impregnadas com metais separados, corroborando o efeito sinérgico contra *Pseudomonas aeruginosa*.

Comparando os resultados de inibição de Sebastiany (2015) com os do presente trabalho, verifica-se que o segundo apresentou maiores inibições. Os dois estudos diferem no tipo de micro-organismo estudado e também no preparo das amostras, no tempo e temperatura de calcinação, que podem interferir na forma em que o metal se acopla à superfície do carvão ativado. Uma análise do ambiente químico dos metais impregnados faz-se necessária para o aprofundamento deste estudo.

Acredita-se que, em algumas circunstâncias, a inibição do crescimento e a morte celular são resultado de uma combinação de diferentes mecanismos. Dependendo da química do metal (sua espécie particular) os mecanismos de toxicidade podem diferir (LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013).

Durante o processo de calcinação, ocorre remoção de água e de gases ligados quimicamente à substância, tipicamente hidratos e carbonatos. É um processo vigorosamente endotérmico que decompõe hidratos em minerais, usado principalmente na produção de óxidos (CHOUILLET et al., 2003).

Estudos que utilizaram a impregnação de zinco e cobre em determinadas superfícies, após análises de termogravimetria / termogravimetria derivada, difração de

raios X, espectroscopia na região do infravermelho e espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X, constataram a formação de óxidos de zinco e óxidos de cobre após a calcinação das amostras, em temperaturas que variaram de 120 a 800°C, de 2 a 5 h. A presença de ZnO e CuO aumentava com aumento da temperatura, embora a 120°C já se notasse a formação de óxidos (CHOUILLET et al., 2003; DA SILVA et al., 2008; MORENO-PIRAJÁN et al., 2010; MUNIK et al., 2011; BILKOVA et al., 2016).

Como já citado, os óxidos possuem potente ação antimicrobiana na inibição de formação de biofilmes (KUMAR; ANTHONY, 2016). No presente trabalho, não foi realizada análise das espécies químicas das amostras impregnadas com zinco e cobre, portanto, baseado na literatura, sugere-se que pelo processo de calcinação, a formação de óxidos de zinco e óxido cobre tenha ocorrido.

### 5.4.3 Cinética de desenvolvimento

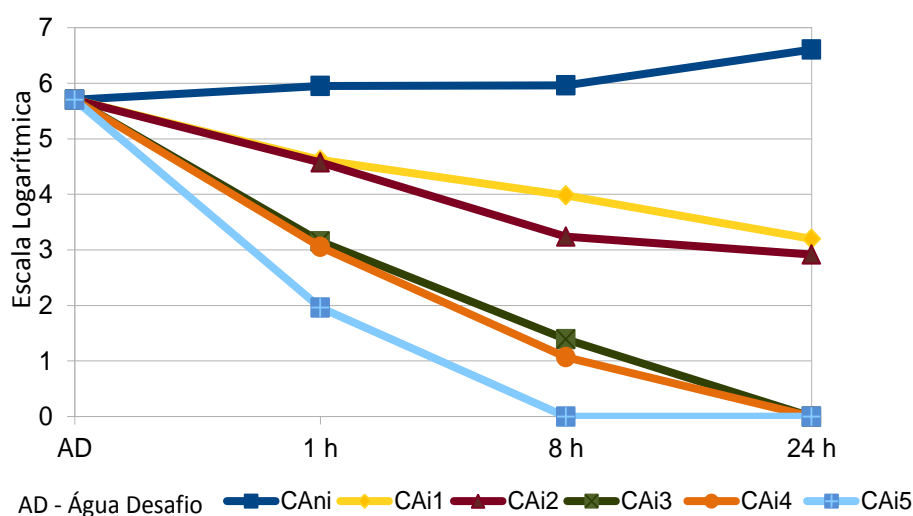
As médias dos valores da cinética de desenvolvimento do crescimento microbiano das amostras em contato com a água desafio entre 1, 8 e 24 horas estão evidenciadas na Tabela 5 e no Gráfico 2.

Tabela 5 - Contagem de células viáveis após 1, 8 e 24 horas das amostras em contato com a água desafio.

<b>Água Desafio: 5,705±0,105 Log<sub>10</sub> ufc 100 mL<sup>-1</sup></b>			
<b>Desenvolvimento por Tempo de Contato Log<sub>10</sub> ufc 5g<sup>-1</sup></b>			
<b>Amostras</b>	<b>1 h</b>	<b>8 h</b>	<b>24 h</b>
	<b>MED ± DP</b>	<b>MED ± DP</b>	<b>MED ± DP</b>
<b>CAni</b>	<b>5,950 ± 0,826</b>	<b>5,961 ± 0,048</b>	<b>6,607 ± 0,162</b>
<b>CAi1 (0,101% Zn)</b>	<b>4,623 ± 0,311<sup>#</sup></b>	<b>3,982 ± 0,039</b>	<b>3,199 ± 0,169<sup>#</sup></b>
<b>CAi2 (0,102% Cu)</b>	<b>4,578 ± 0,253<sup>#</sup></b>	<b>3,237 ± 0,114<sup>#</sup></b>	<b>2,916 ± 0,074<sup>#</sup></b>
<b>CAi3 (0,0994% Zn/0,0597% Cu)</b>	<b>3,154 ± 0,160<sup>#</sup></b>	<b>1,392 ± 0,209<sup>#</sup></b>	<b>NHC<sup>#</sup></b>
<b>CAi4 (0,060% Zn /0,102% Cu)</b>	<b>3,054 ± 0,144<sup>#</sup></b>	<b>1,069 ± 0,044<sup>#</sup></b>	<b>NHC<sup>#</sup></b>
<b>CAi5 (0,108% Zn/0,110% Cu)</b>	<b>1,959 ± 0,050<sup>#</sup></b>	<b>NHC<sup>#</sup></b>	<b>NHC<sup>#</sup></b>

Legenda: ufc – unidade formadora de colônia; MED – média; DP – desvio padrão; CAni - carvão ativado não impregnado; CAi - carvão ativado impregnado; NHC – não houve crescimento; # Diferenças significativas entre água desafio *versus* CAi (p< 0,05).

Gráfico 2 – Cinética de desenvolvimento microbiano



Legenda: ufc – unidade formadora de colônia; CAni - carvão ativado não impregnado; CAi - carvão ativado impregnado; CAi1 - 0,101%; de Zn; CAi2 - 0,102% de Cu; CAi3 - 0,0994% Zn / 0,0597% Cu; CAi4 - 0,060% Zn / 0,102% Cu; CAi5 - 0,108% Zn / 0,110% Cu.

Os perfis das curvas apresentadas no gráfico 2 demonstram que na amostra de carvão ativado não impregnado houve desenvolvimento microbiano em todos os intervalos de incubação, como consequência do favorecimento do meio.

Nas amostras impregnadas (CAi), o processo de desenvolvimento da formação de biofilme por *Escherichia coli* ATCC 8739 se reduziu ao longo dos intervalos de incubação. As diferenças na contagem de células viáveis das amostras impregnadas, nos três intervalos, foram estatisticamente significativas em relação à contagem de células viáveis da água desafio ( $5,705 \pm 0,105 \text{ Log}_{10} \text{ ufc } 100 \text{ mL}^{-1}$ ).

Nas amostras CAi3 e CAi4, o desenvolvimento microbiano foi reduzido em grande parte no intervalo de 8 horas e, na amostra CAi5, o desenvolvimento do biofilme foi bem menor, logo na primeira hora de contato, evidenciando o potencial antimicrobiano da combinação dos metais em maior concentração, como se verifica nos valores de desenvolvimento microbiano após 8 e 24 horas.

Ao analisar a quantidade de micro-organismos presentes na água desafio na Tabela 5, verifica-se que o desenvolvimento do biofilme por *E. coli* foi crescente na amostra não impregnada CAni e decrescente nas amostras impregnadas CAi. O

desenvolvimento microbiano na amostra não impregnada foi favorecido, principalmente pela existência de fatores presentes no meio, como a matéria orgânica que é consumida pelos micro-organismos, que secretam polissacarídeos e se reproduzem. Já a presença dos metais zinco e cobre nas amostras, impregnados sozinhos e combinados, reduziram significativamente a formação de biofilme nas primeiras 24 horas.

O desenvolvimento microbiano nas amostras impregnadas foi afetado pela ação oligodinâmica dos metais zinco e cobre já na primeira hora de contato com a água desafio. O contato das amostras impregnadas com a água desafio por 24 horas evidencia um efeito antimicrobiano satisfatório e eficiente no processo de inibição da formação de biofilme por *Escherichia coli* ATCC 8739.

## 6 CONCLUSÃO

- O teor de cinzas e a quantidade de solúveis em água da amostra de carvão ativado de casca de coco de dendê (*Elaeis guineensis*) demonstraram o não comprometimento da capacidade adsortiva do carvão.
- O número de iodo determinado em todas as amostras de carvão ativado (impregnados e não impregnado) se apresentou acima de 600 mg g<sup>-1</sup>. Os resultados demonstraram que a impregnação de metais na superfície do carvão ativado não interferiu em sua capacidade adsortiva.
- Na avaliação de metais lixiviados, o cobre e o zinco apresentaram valores de desprendimento abaixo e próximos do limite de detecção. A metodologia de impregnação foi eficaz na fixação dos metais à superfície do carvão ativado.
- Pela análise microbiológica, verifica-se que a superfície do carvão ativado propicia a formação de biofilme microbiano por *Escherichia coli*, apresentando médias de contagem de 6,745 e 6,707 log 10 ufc 5g<sup>-1</sup>.
- A combinação dos metais zinco e cobre na superfície do carvão ativado potencializou o efeito oligodinâmico na inibição de biofilme por *Escherichia coli* ATCC 8739, apresentando um maior sinergismo em relação às amostras com metais impregnados separadamente. Amostras CAi3, CAi4 e CAi5 apresentaram inibição total, sendo resultados bastante significativos.
- O presente estudo apresentou resultados que propiciam uma boa alternativa no controle da colonização bacteriana para as indústrias de meios filtrantes a partir da impregnação de zinco e cobre combinados, na superfície do carvão ativado.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHAMED, M.; ALHADLAQ, H. A.; KHAN, N. A. M.; KARUPPIAH, P.; AL-DHABI, N. A. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of copper oxide nanoparticles. **Journal of Nanomaterials**, p. 1-4, 2014.

AKHIGBE, L.; OUKI, S.; SAROJ, D. Disinfection and removal performance for *Escherichia coli* and heavy metals by silver-modified zeolite in a fixed bed column. **Chemical Engineering Journal**, v. 295, p. 92-98, 2016.

ALKHATIB, A. J.; ZAILAEY, K. A. Medical and environmental applications of activated charcoal: review article. **European Scientific Journal**, v.11, p. 50-56, 2015.

ALLOCATI, N.; MASULLI, M.; ALEXEYEV, M. F.; ILIO, C. D. *Escherichia coli* in Europe: An Overview. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, p. 6236, 2013.

ALVES, D. N. B. **Remoção de ferro em água de irrigação através de filtração em areia e zeólita**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Aparelho para melhoria da qualidade da água para consumo humano — Requisitos e métodos de ensaio**. NBR 16098: Rio de Janeiro, 2012.

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Carvão Ativado Pulverizado – Especificação**. NBR 11834: Rio de Janeiro, 1991.

ARCHER, V. L. **Drinking water filter**. US 6,197,193, 2001.

ASTM D 2866 – 94: **Standart Test Method for Total Ash Content of Activated Carbon**; (Reapproved 1999).

ASTM D 4607 – 94; **Standart Test Method for Determination of Iodine Number of Activated Carbon**; (Reapproved 1999).

ASTM D 5029 – 98; **Standart Test Method for Water Solubles in Activated Carbon**.

ATI-HELLAL, M. E.; DOGGUIB, R.; HEDHILI, A.; TRAISSAC, P.; ATI, J. E. Zinc and copper status in childbearing age Tunisian women: Relation to age, residential area, socioeconomic situation and physiologic characteristics. **Chemosphere**, v.149, p. 231-237, 2016.

BELOIN, C.; ROUX, A.; GHIGO, J. M. *Escherichia coli* Biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322, p. 248-264, 2008.

BILKOVA, I.; SOBCZAK, I.; DECYK, P.; ZIOLEK, M.; WHITTEN, J. E. The effect of zinc and copper in gold catalysts supported on MCF cellular foams on surface properties and catalytic activity in methanol oxidation. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 232, p. 97-108, 2016.

BINNIE, C.; KIMBER, M. Basic water treatment Fifth edition. **Ice Publishing**, v.5, p. 21-44, 2013.

BJARNSHOLT, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. **APMIS: Acta pathologica, microbiologica et immunologica Scandinavica**, v.121, p. 1–58, 2013.

BRASIL. Portaria n.º 394, de 25 de agosto de 2014. **Estabelece os requisitos que devem ser atendidos pelos Equipamentos para Consumo de Água**. INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, 2014.

BRASIL. Portaria n.º 2914 de 12 de Setembro de 2011. **Dispõe Sobre os Procedimentos de Controle e de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano e seu Padrão de Potabilidade**. Ministério da Saúde, 2011.

CASTRO-MAYORGA, J. L.; FABRA, M. J.; POURRAHIMI, A. M.; OLSSON, R. T.; LAGARON, J. M. The impact of zinc oxide particle morphology as antimicrobial and when incorporated in Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) films for food packaging and food contact surfaces applications. **Food and Bioprocess Processing**, v. 101, p.32–44, 2016.

CEBALLOS, B. S. O.; DANIEL, L. A.; BASTOS, R. K. X. “**Tratamento de Água para Consumo Humano: panorama Mundial e Ações do prosab**”. In: Pádua V. L. (coord) **Remoção de microrganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano**. ABES/PROSAB, ed. 5, p. 25-26, 2009.

ÇEÇEN, F.; AKTAS, O. Activated carbon for water and wastewater treatment: integration of adsorption and biological treatment. **John Wiley & Sons**, p. 7, 2011.

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.152–160, 2015

CHEW, S. C.; YANG, L. **Encyclopedia of Food and Health: Biofilms**. Nanyang Technological University, Singapore, Elsevier Ltd. All rights reserved, v.1, p. 407, 2016.

CHOHAN, Z.H.; SUPURAN, C.T.; SCOZZAFAVA, A. Metal binding and antibacterial activity of ciprofloxacin complexes. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 303, 2005.

CHOUILLET, C.; VILLAIN, F.; KERMAREC, M.; LAURION-PERNOT, H.; LOUIS, C. Relevance of the drying step in the preparation by impregnation of Zn/SiO<sub>2</sub> supported catalysts. **Journal Physical Chemistry**. v. 107, p. 3565-3575, 2003.

CLARK, H. L. M. **Remoção de fenilalanina por adsorvente produzido a partir da torta prensada de grãos defeituosos de café**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, p. 115, 2010.

COBB, A.; WARMS, M.; MAURER, E. P.; CHIESA, S. Low-Tech coconut shell activated charcoal production. **International Journal for Service Learning in Engineering**, v. 7, p. 93-104, 2012.

COSTA, L. C. M. **Produção e Modificação de Carvões Ativados para Aplicações Ambientais**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Mato Grosso, 2007

DA SILVA, MOHALLEM, N. D. S.; SOUZA, T. G.; FRANCO, V. A. S. **Síntese e caracterização de óxido de zinco nanoparticulado para produção e análise das propriedades de cerâmicas varistoras**. 32<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008.

DAVE, P. R.; MUKHERJEE, D.; SRIVASTAVA, M. **Carbon block filter**. US Patent 0,203,991, 2011.

DEWANTI, R.; WONG, A. C. L. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**., v. 26, p. 147-164, 1995.

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A. DI B. **Métodos e Técnicas de Tratamento de Água: Precipitação e adsorção**. São Carlos, v.2, p. 1495-1535, 2005.

DIZAJ, S. M.; LOTFIPOUR, F.; BARZEGAR-JALALI, M.; ZARRINTAN, M. H.; ADIBKIA, K. Antimicrobial activity of the metals and metal oxides nanoparticles. **Materials Science & Engineering C**, v. 44, p. 278-284, 2014.

DREWES, J. E.; FOX, P. Effect of drinking water sources on reclaimed water quality in water reuse systems. **Water and Environment Journal**, v. 3, p. 353-362, 2000.

EL-HENDAWY, A.A. Influence of HNO<sub>3</sub> oxidation on the structure and adsorptive properties of corncob-based activated carbon. *Carbon*, v. 41, p. 713-722, 2003.

EL-HENDAWY, A. A., SAMRA, S. E., GIRGIS, B. S. Adsorption characteristics of activated carbons obtained from corncobs. **Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 180, p. 209-221, 2001.

FEGAN, N.; GOBIUS, K. S. Pathogenic *Escherichia coli*. **Encyclopedia of Meat Sciences**, v.2, p. 357, 2014.



FOO, K. I.; HAMEED, B. H. Preparation and characterization of activated carbon from sunflower seed oil residue via microwave assisted  $K_2CO_3$  activation. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9794–9799, 2011.

GABR, R. M.; GAD-ELRAB, S. M. F.; ABSKHARON, R. N. N.; HASSAN, S. H. A.; SHOREIT, A. A. M. Biosorption of hexavalent chromium using biofilm of *E. coli* supported on granulated activated carbon. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v 25, p. 1695–1703, 2009.

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. 1101-1110, 2013.

GU. W.; YUSHIN, G. Review of nanostructured carbon materials for electrochemical capacitor applications: advantages and limitations of activated carbon, carbide-derived carbon, zeolite-templated carbon, carbon aerogels, carbon nanotubes, onion-like carbon, and graphene. **Wires Energy and Environment**, v. 3, p. 424, 2014.

GUIMARÃES, I. S. **Oxidações de carvão ativado de endocarpo de coco da baía com soluções de  $HNO_3$  e uma investigação sobre o método de Boehm.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2006.

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 Rev**, v. 198, p. 1-15, 2015.

HARO, M.; RUIZ, B.; ANDRADE, M.; MESTRE, A.S.; PARRA, J.B.; CARVALHO, A.P.; ANIA, C.O. Dual role of copper on the reactivity of activated carbons from coal and lignocellulosic precursors. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 154, p. 68-73, 2012.

HENNING, K.D.; VON. K. H. Activated Carbon. Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. **Carbon**, v. 5, Vol.6, p. 788-791, 2012.

HESAS, R. H., DAUD, W. M. A. W., SAHU, J. N. AND 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.

HESKETT, D. E.; MICH, C. **Method for treating fluids.** US Patent 5,951,869, 1999.

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. 238–246, 2016.

JAGUARIBE, E.F.; MEDEIROS, L. L.; BARRETO, M. C. S.; ARAUJO, L. P. The performance of activated carbons from sugarcane bagasse, babassu, and coconut shells in removing residual chlorine. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, p. 41-47, 2005.

JANKOWSKA, H.; SWIATKOWSKI, A.; CHOMA, J. Active Carbon. **Ellis Horwood Limited**, v. 280, p. 9, 1991.

JOMOVA, A.; VALKO, M. M Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283, p.65-87, 2011.

JURADO-SÁNCHEZ, B., SATTAYASAMITSATHIT, S.; GAO, W.; SANTOS, L.; FEDORAK, Y.; SINGH, V. V.; OROZCO, J.; GALARNYK, M.; WANG, J. Self-propelled activated carbon janus micromotors for efficient water purification. **Small**, v. 11, p. 499-506, 2015.

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.

KUMAR, B. Treatment of distillery effluent using activated charcoal, fly ash, wood ash for irrigation purpose. **International Journal of Novel Research in Life Sciences**, v. 2, p. 27-30, 2015.

KUMAR, V. V.; ANTHONY, S. P. Antimicrobial studies of metal and metal oxide nanoparticles. **Surface Chemistry of Nanobiomaterials**, v. 3, p. 265-289, 2016.

LAPOLLI, F. R.; LEON, A.C.; TAVARES, C. R. G.; CAMPOS, J. R. **Municipal wastewater treatment: an application of membrane**. In international symposium euromembrane. Book of abstracts, p.142, 1997.

LEMIRE, J. A.; HARRISON, J. J.; TURNER, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 371-384, 2013.

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 p. 344-354, 2013.

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. 66, p. 1297-1305, 2015.

LIU, Y.; HE, L.; MUSTAPHA, A.; LI, H.; HU, Z. Q.; LIN, M. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 1365-2672, 2009.

LUTTERODT, G. **Transport of multiple *Escherichia coli* strains in saturated porous media**. Doctoral dissertation, University of Technology and of the Academic Board of the UNESCO-IHE Institute for Water Education, Netherlands, 2012.

MAURIN, G. **Modelling of Physisorption in Porous Solids**. Adsorption by Powders and Porous Solids, 2° ed., p. 191-235, 2014.

MENOITA, E.; SANTOS, V.; TESTAS, C.; GOMES, C.; SANTOS, A. S. Biofilms: knowing the entity. **Journal of Aging and Innovation**, v.1, p. 22-23, 2012.

MORENO-PIRAJÁN, J. C.; GÓMEZ-CRUZ, R.; GARCÍA-CUELLO, V. S.; GIRALDO, L. Binary system Cu (II) / Pb (II) adsorption on activated carbon obtained by pyrolysis of cow bone study. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 89, p. 122–128, 2010.

MULCAHY, H.; CHARRON-MAZENOD, L.; LEWENZA, S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **PLoS Pathogens**, v.5, 2008.

MUNNIK, P.; GABRIELSSON, A.; POLLINGTON, S. D.; HEADDOCK, G.; BITTER, J. H.; JONGH, P. E.; JONG, K. P. Copper nitrate redispersion to arrive at highly active silica-supported copper catalysts. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, p. 14698–14706, 2011.

NANGMENYI, G.; XAO, W.; MEHRABI, S.; MINTZ, E.; ECONOMY, J. Bactericidal activity of Ag nanoparticle impregnated fibreglass for water disinfection. **Journal Water Health**, v. 7, p.657-663, 2009.

NIEDERSBERG, C. **Ensaio de adsorção com carvão ativado produzido a partir da casca do tungue (*Aleurites fordii*), resíduo do processo de produção de óleo**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Catarina, 2012.

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. 312-319, 2015.

NUNEZ, D. L. **Preparação de carvão ativado a partir de torta prensada *Raphanus Sativos L.* e utilizado para clarificação de soluções**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

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. 293,138-142, 2014.

OLIVEIRA, L. F. D. **Estudo da formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* em carvão ativado impregnado com prata**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Goiás - UEG, 2014.

OLIVEIRA, M. S. C. **Utilização de carvão ativado na adsorção de lactose e proteínas do soro do leite**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, 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. 200-206, 2014.

PELCZAR, M; CHAN, E. C. S; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. Makron Books, São Paulo, v. 1, 2.ed., p. 56-61, 2005.

PELGRIFT, R.Y.; FRIEDMAN, A.J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 1803-1815, 2013.

PEREIRA, E. I. **Produção de carvão ativado a partir de diferentes precursores utilizando FeCl<sub>3</sub> como agente ativante**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Lavras, 2010.

RAI, M. K.; DESHMUKH, S. D.; INGLE, A. P.; GADE, A. K. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, p. 848, 2012.

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 madeiros comercializados em Altamira – PA. **Brazilian Journal of Wood Science**, v. 6, p. 100-106, 2015.

RIANI, J. C. **Utilização de resinas de troca-iônica em efluentes de galvanoplastia**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

RIVAS, L.; MELLOR, G. E.; GOBIUS, K.; FEGAN, N. Detection and Typing Strategies for Pathogenic *Escherichia coli*. **Springer**, v. 1, p. 17, 2015.

ROMANÍ, A. M.; GUASCH, H.; BALAGUER, M. D. Aquatic biofilms: ecology, water quality and wastewater treatment. **Caister Academic Press**, v. 1, p. 3-9, 2016.

SEBASTIANY, L. K. **Estudo da inibição da formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* na superfície de carvão ativado impregnado zinco e cobre em meio filtrante de leito fixo**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Goiás, 2015.

SILVA, F. V. **Desenvolvimento de materiais filtrantes a partir da modificação de meios porosos para a melhoria da qualidade da água destinada ao consumo humano**. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012

SEIL, J. T.; WEBSTER, T. J. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. **Journal of International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 2767-2781, 2012.

SHIH, H-Y.; LIN, Y. E. Efficacy of Copper-Silver Ionization in Controlling Biofilm- and Plankton-Associated Waterborne Pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 2032-2035, 2010.

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.

STEPANOVIC, S.; VUKO VIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of *staphylococcal* biofilm formation. **Journal of Microbiology Methods**, v.40, p.175–179, 2000.

STEWART, P. S.; PEYTON, B. M.; DRURY, W. J.; MURGA, R. Quantitative observations of heterogeneities in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 59, p. 327–329, 1993.

TABASSUM, S.; ASIM, A.; ARJMAND,F.; AFZAL, M.; BAGCHI, V. Synthesis and characterization of copper(II) and zinc(II)-based potential chemotherapeutic compounds: Their biological evaluation viz. DNA binding profile, cleavage and antimicrobial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 308-316, 2012.

TAY, T.; UCAR, S.; KARAGÖZ, S. Preparation and characterization of activated carbon from waste biomass. **Journal of Hazardous Materials**, v. 165 p. 481-485, 2009.

VALE, A. T., BARROSO, R. A.; QUIRINO, W.F. Caracterização da biomassa e do carvão vegetal do coco-da-Baía (*Cocos nucifera L.*) para uso energético. **Biomassa & Energia**, v. 1, p. 365-370, 2004.

VESTBY, L. K.; MORETRO, T.; LANGSRUD, S., HEIR, E.; NESSE, L. L. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal-and feed factories. **BMC Veterinary Research**, v. 5, p.1-6, 2009.

WANG, X.; GAO, Y.; WANG, J.; WANG, Z.; CHEN, L. Functionalizes grapheme as chemical adsorbers of polysulfides. **Nano Energy**, v.12, p.910-815, 2015.

WU, M.; GUO, Q.; FU, G.; Preparation and characteristics of medicinal activated carbon powders by CO<sub>2</sub> activation of peanut shells. **Powder Technology**, v.247, p.188-196, 2014.

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. **Elsevier, Materials Science and Engineering C**, v. 32, p. 1062–1067, 2012.

YUEN, P. S. **Method of treating fluids**. US Patent 5,744,045, 1998.

ZAGO, J. F. **Influência das características físico-químicas de carvões ativados na adsorção de saxitoxinas**. Tese de doutorado. Universidade de Brasília – UNB, 2010.

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. 122-131, 2011.