

Implementação de reator de leito fixo na desinfecção de água contaminada  
utilizando nanopartículas de prata micológicas imobilizadas em alginato

Stella Daniels Kovacs

São Vicente - SP  
2024

Implementação de reator de leito fixo na desinfecção de água contaminada  
utilizando nanopartículas de prata micológicas imobilizadas em alginato

Stella Daniels Kovacs

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Angélica Ottoni

Coorientadora: Ma. Carolina Assis da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Instituto de Biociências - Campus do Litoral Paulista da  
Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", como  
parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas com habilitação em Biologia Marinha

K88i

Kovacs, Stella Daniels

Implementação de reator de leito fixo na desinfecção de água contaminada utilizando nanopartículas de prata micológicas imobilizadas em alginato / Stella Daniels Kovacs.

-- São Vicente, 2024

26 p. : fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, São Vicente

Orientadora: Cristiane Angélica Ottoni

Coorientadora: Carolina Assis da Silva

1. Bionanopartículas. 2. imobilização em alginato. 3. reator de leito fixo. 4. *Pseudomonas aeruginosa*. 5. tratamento de água. I. Título.

## Sumário

|                                                                                                                                                  |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Lista de Figuras .....</b>                                                                                                                    | <b>5</b>  |
| <b>Agradecimentos.....</b>                                                                                                                       | <b>6</b>  |
| <b>Resumo .....</b>                                                                                                                              | <b>7</b>  |
| <b>Abstract.....</b>                                                                                                                             | <b>8</b>  |
| <b>1.0 Introdução .....</b>                                                                                                                      | <b>9</b>  |
| <b>2.0 Objetivo .....</b>                                                                                                                        | <b>11</b> |
| <b>3.0 Materiais e métodos.....</b>                                                                                                              | <b>11</b> |
| <b>3.1. Microrganismos.....</b>                                                                                                                  | <b>11</b> |
| <b>3.1.1. Fungos.....</b>                                                                                                                        | <b>11</b> |
| <b>3.1.2. Bactéria.....</b>                                                                                                                      | <b>12</b> |
| <b>3.2. Biossíntese de AgNP .....</b>                                                                                                            | <b>12</b> |
| <b>3.3. Encapsulação em gel alginato.....</b>                                                                                                    | <b>13</b> |
| <b>3.4. Implementação do reator de leito fixo empacotado com AgNPs imobilizadas...</b>                                                           | <b>13</b> |
| <b>3.4.1. Aparato experimental .....</b>                                                                                                         | <b>13</b> |
| <b>3.4.2. Avaliação dos parâmetros operacionais.....</b>                                                                                         | <b>14</b> |
| <b>4.0 Resultados e Discussão .....</b>                                                                                                          | <b>14</b> |
| <b>4.1 Biossíntese e caracterização das AgNP na forma coloidal.....</b>                                                                          | <b>14</b> |
| <b>4.2 Encapsulação em gel alginato.....</b>                                                                                                     | <b>16</b> |
| <b>4.3 Implementação de um sistema de tratamento de água, por fluxo contínuo, usando reator de leito fixo recheado com NPs encapsuladas.....</b> | <b>17</b> |
| <b>5.0 Conclusões .....</b>                                                                                                                      | <b>22</b> |
| <b>Referências .....</b>                                                                                                                         | <b>23</b> |

## Lista de Figuras

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> - Estrutura do reator de leito fixo.....                                      | 14 |
| <b>Figura 2</b> - Fungo <i>Aspergillus niger</i> IBCLP20 .....                                | 15 |
| <b>Figura 3</b> - Biossíntese de AgNP .....                                                   | 16 |
| <b>Figura 4</b> - Micrografia de microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas..... | 16 |
| <b>Figura 5</b> - Encapsulação em gel alginato.....                                           | 17 |
| <b>Figura 6</b> - Efeito da concentração do afluente.....                                     | 18 |
| <b>Figura 7</b> - Efeito de altura do leito.....                                              | 20 |
| <b>Figura 8</b> - Efeito da vazão volumétrica de alimentação.....                             | 21 |

## **Agradecimentos**

Gostaria de oferecer meus sinceros agradecimentos:

À minha família, pelo apoio e incentivo;

À Professora Cristiane Angélica Ottoni pela oportunidade oferecida em seu laboratório;

Aos colegas de laboratório, especialmente à Carolina Assis da Silva pelo apoio;

À Universidade Estadual Júlio Mesquita Filho (UNESP) por proporcionar a infraestrutura para o experimento e oportunidade de aprendizado;

Ao IEAMar pela infraestrutura e oportunidade de aprendizado;

Ao Instituto de Pesquisa Tecnológica do Estado de São Paulo (IPT) pelo material biológico cedido;

Ao CNPQ e à reitoria da UNESP pelo apoio financeiro.

## Resumo

O acesso à água potável e ao saneamento básico é um direito humano fundamental, essencial para manter uma saúde digna, habitação, nutrição e preservação ambiental. No entanto, o acesso desigual e o fornecimento inadequado de água potável expõem as populações a uma vulnerabilidade extrema, aumentando o risco de doenças transmitidas pela água. Neste sentido, o estudo teve como objetivo avaliar diferentes parâmetros operacionais de um reator de leito fixo (PBR), empacotado com nanopartículas de prata (AgNPs) fúngicas, encapsuladas em gel de alginato de cálcio, para o tratamento de água contaminada com as bactérias patogênicas *Escherichia coli* IPT245 e *Pseudomonas aeruginosa* IPT365. As AgNPs fúngicas foram inicialmente caracterizadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial zeta (Pζ), índice de polidispersão (PDI) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Após a caracterização, as AgNPs foram imobilizadas em alginato de cálcio (AgNPs<sub>SAC</sub>) e inseridas no reator PBR onde os parâmetros de concentração do contaminante (afluente), altura do leito (50% e 100%) e vazão volumétrica (1,0 ml/min, 4,0 ml/min e 7,0 ml/min) foram avaliados. As AgNPs<sub>SAC</sub> apresentaram forma esférica e tamanhos compreendidos entre 37,4-67,4 nm. Com relação aos parâmetros avaliados em reator PBR, as AgNPs<sub>SAC</sub> apresentaram efeito bactericida nas concentrações do afluente entre  $10^3$ - $10^4$  UFC·ml<sup>-1</sup> contra as duas bactérias IPT245 e IPT365 durante as 8 h do experimento. Nas duas alturas do leito estudadas, 100% e 50%, a eficácia do PBR foi mantida. As vazões volumétricas de alimentação de 1 ml/min e 4 ml/min apresentaram inibição de cerca de 100% do crescimento para ambas as bactérias. Diante dos resultados obtidos, o sistema proposto se apresenta para o tratamento de água contaminada com agentes patogênicos, contudo, mais estudos são necessários.

**Palavras-chave:** Bionanopartículas, imobilização em alginato, reator de leito fixo, *Pseudomonas aeruginosa*, tratamento de água.

## Abstract

Access to drinking water and basic sanitation is a basic human right, essential to maintain public health, housing, nutrition and environmental conservation. However, unequal access and inadequate drinking water supply expose populations to extreme vulnerability, increasing the risk of waterborne diseases. In this regard, the present study aimed to analyze different operational parameters of a packed-bed reactor (PBR), packed with mycological silver nanoparticles (AgNP), encapsulated in calcium alginate, to treat water contaminated by pathogenic bacteria *Escherichia coli* IPT245 and *Pseudomonas aeruginosa* IPT365. The fungal AgNP were initially characterized by dynamic light scattering (DLS), zeta potential ( $P\zeta$ ), polydispersity index (PDI) and transmission electron microscopy (TEM). After the characterization, the AgNP were immobilized in calcium alginate (AgNP<sub>AC</sub>) and filled into the PBR reactor where the parameters of contaminant concentration (influent), catalyst masses (50% and 100%) and volumetric flow rate (1,0 ml/min, 4,0 ml/min e 7,0 ml/min) were analysed. The AgNP<sub>AC</sub> presented a spherical shape and size comprehended between 37,4-67,4 nm. In relation to the aforementioned PBR reactor parameters, the AgNP<sub>AC</sub> presented bactericidal effect on the influent concentrations of  $10^3$ - $10^4$  CFU·ml<sup>-1</sup> against both bacteria IPT245 and IPT365 throughout the 8 h of experiment. On both catalyst masses studied, 100% and 50%, the PBR efficiency was maintained. The volumetric flow rates of 1 ml/min and 4 ml/min presented bacteria growth inhibition of almost 100% for both bacteria. In regards to the obtained results, the proposed system presents itself for water contaminated by pathogenic agents treatment, however, more studies are needed.

**Keywords:** Bionanoparticles, immobilization in alginate, packed-bed reactor, *Pseudomonas aeruginosa*, water treatment.

## 1.0 Introdução

Saneamento indevido é um problema, ainda nos dias de hoje, que acomete muitas populações de países em desenvolvimento (Mukherjee *et al.*, 2019; United Nations, 2020). Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), em 2017, 4,2 bilhões de pessoas globalmente não tinham acesso a saneamento adequado, destes sendo 2 bilhões sem saneamento básico (United Nations, 2020).

A Agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável, proposta pela ONU, conta com os objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS) que trata de alguns desafios de desenvolvimento enfrentados globalmente e almeja que sejam conquistados até 2030. Deste modo, o sexto ODS refere-se ao acesso à saneamento básico adequado (ONU, 2015).

Com isso, o Ministério da Saúde com a portaria nº 2.914/2011 (Ministério da Saúde, 2011), determina que na água disponível para consumo humano deve ser analisada a ausência de coliformes fecais totais e *Escherichia coli* em 100 ml de amostra. Já para bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, a Agência Nacional da Vigilância Sanitária divulgou a resolução RDC nº 275/2005 (Anvisa, 2005) que, ao analisar cinco unidades de amostras individualmente, determinou que só poderia haver um resultado positivo, não devendo exceder 2 UFC/ml de amostra. A espécie *E. coli* é uma bactéria patogênica muito utilizada como indicador de contaminação da água, por ser encontrada no trato intestinal de alguns mamíferos, como os humanos, e por existirem métodos de identificação robustos (Gomes *et al.*, 2016). A bactéria patogênica *P. aeruginosa*, conhecida por formar biofilme robusto e resistente a antibióticos, pode ser encontrada principalmente em água contaminada, onde se alimenta de dejetos orgânicos (Jurado-Martín *et al.*, 2021).

A bactéria *E. coli* é amplamente utilizada como indicador de contaminação fecal, como posto anteriormente, por ser uma bactéria conhecida e amplamente estudada. A *E. coli* também provê uma detecção mais específica de contaminação fecal quando comparada com outros coliformes fecais, e pode ser relacionada com efluentes domésticos (Lim *et al.*, 2022). A outra bactéria a ser utilizada, *P. aeruginosa*, é oportunista, sendo especialmente perigosa para pessoas imunocomprometidas, podendo causar pneumonia, ceratite e diversas infecções em outros órgãos. Ela pode

ser adquirida pelo ambiente, por contato com pessoas infectadas, por meio de lesões ou por via aérea. Esta bactéria pode sobreviver em ambientes que seriam hostis para outras bactérias, como locais com fontes de carbono limitada e úmidos (Planet, 2018).

Dentro desse contexto, as nanopartículas de prata (AgNPs) apresentam uma comprovada ação antimicrobiana, e propriedades que previnem a formação de biofilme, além de apresentarem baixa citotoxicidade em células de mamíferos (Agnihotri *et al.*, 2019). As AgNPs também apresentam capacidade de agir contra *E. coli* rapidamente, o que pode ser atribuído a sua grande capacidade antimicrobiana, assim como posto anteriormente, e por apresentar esta característica mesmo contra bactérias resistentes à antibióticos (Agnihotri *et al.*, 2019). Por isso, são consideradas agentes promissores para o tratamento de água contaminada.

A origem das AgNPs pode ser por meios sintéticos ou biológicos. O primeiro inclui meios físicos ou químicos; os físicos apresentam a vantagem de não liberar componentes tóxicos, porém exigem um custo de energia e produção muito alto, já os químicos são de baixo custo, porém liberam resíduos tóxicos (Sofi *et al.*, 2021). O segundo apresenta um menor impacto ambiental durante a síntese realizada por microrganismos e posteriormente, quando exposto ao meio ambiente e, também, um menor custo de energia e produção (Singh *et al.*, 2020). As AgNPs podem apresentar forma regular ou irregular, com dimensões entre 1-100 nm. Alguns dos mecanismos de toxicidade destas nanopartículas (NPs) estão associados com a liberação de íons de prata ( $\text{Ag}^+$ ) (Truu *et al.*, 2022) e a desativação/morte de microrganismos. Isto pode ocorrer de duas formas: A primeira é pela alta área de superfície, e a segunda é por encapsulamento com vários tipos de grupos químicos reativos que aumentam a afinidade com a superfície dos microrganismos alvo, que então rompem a membrana celular do organismo (Bhardwaj *et al.*, 2021).

Isto posto, os nanomateriais como as AgNPs de origem biológica vem sendo cada vez mais estudados por apresentarem um menor impacto ambiental quando comparados com NPs de origem sintética (Singh *et al.*, 2020). Podendo ser sintetizados a partir de extratos de plantas, algas, bactérias, e fungos filamentosos (Ffs) que são evidenciados por serem excelentes agentes redutores na síntese de NPs, devido à diversidade, alta capacidade de secreção de enzimas extracelulares,

fácil crescimento, cultivo e manutenção em laboratório, além de possuírem potencial de ampliação de escala em sua produção (Neethu *et al.*, 2019).

Contudo, as NPs metálicas em sua forma coloidal possuem propensão a aglomeração, diminuindo assim sua eficiência e propriedades antimicrobianas. Desta maneira, há a aplicação da imobilização desses nanomateriais em materiais não tóxicos como o alginato, muito utilizado como agente de encapsulação (Arroyo *et al.*, 2020) o que evita a aglomeração das NPs e mantém por um maior período suas propriedades, inclusive a reutilização desse nanomaterial em processos como o tratamento de água potável (Mazumder *et al.*, 2019). Por conta disso, quando encapsuladas possuem aplicações como empacotamento de reator em leito fixo (PBR), aumentando assim o contato entre o fluído e as NPs, além da possibilidade de aumentar o volume de afluente a ser tratado mediante uso de leitos fixos conectados em série (Fogler, 2012). Diante disso, este projeto busca o tratamento de água por meio de um PBR, com um processo de custo mais baixo e maior sustentabilidade ecológica, por utilizar NPs de origem biológica encapsuladas. Além de atender ao sexto objetivo de desenvolvimento sustentável da Agenda 2030, por possivelmente promover o acesso ao saneamento básico e a água potável de qualidade e de baixo custo.

## **2.0 Objetivo**

Implementar um reator de leito fixo empacotado com AgNPs biológicas imobilizadas em gel alginato de sódio para desinfecção de água contaminada por bactérias patogênicas.

## **3.0 Materiais e métodos**

### **3.1. Microrganismos**

#### **3.1.1. Fungos**

A linhagem *Aspergillus niger* IBCLP20 pertencente à Coleção de Cultura do Laboratório de Micologia e Aplicações Biotecnológicas e Nanotecnológicas (MICOBIONANOTEC) foi isolada de sedimento marinho proveniente da Baía do

Araçá, São Sebastião-SP. A manutenção da linhagem ocorreu utilizando meio de cultura batata dextrose ágar (BDA), sendo mantida a 4 °C e renovada mensalmente. O processo de biossíntese de AgNP foi realizado por via extracelular utilizando a linhagem *Aspergillus niger* IBCLP20, isolada de sedimento marinho. A caracterização foi contínua, através das técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), Potencial Zeta (Pζ) e Índice de Polidispersão (PDI), a fim de assegurar a sua eficiência em termos de atividade antimicrobiana e comportamento no ambiente aquático.

### 3.1.2. Bactéria

As bactérias gram-negativas potencialmente patogênicas *Escherichia coli* IPT245 e *Pseudomonas aeruginosa* IPT365 foram cedidas pelo Instituto de Pesquisa Tecnológica do Estado de São Paulo (IPT). Os microrganismos foram crescidos “overnight” em meio de cultura Trypticase Soy Broth (TSB), composição final (g·l<sup>-1</sup>): peptona bacteriológica (17,0), peptona de soja (3,0), glicose (2,0), cloreto de sódio (5,0), fosfato de dipotássio (2,0); e as culturas mantidas em -80 °C através do método de preservação em glicerol 60% estéril e renovados semanalmente. Para os ensaios em reator, a concentração celular foi ajustada a 10<sup>3</sup> UFC/ml; 10<sup>4</sup> UFC/ml; e 10<sup>5</sup> UFC/ml.

### 3.2. Biossíntese de AgNP

O extrato fúngico foi preparado a partir da inserção de 5 discos de 6 mm da colônia de crescida em Batata Dextrose Ágar (BDA) em um frasco Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultura Malte glicose extrato de levedura Peptona (MGLP) líquido, composição final (g·l<sup>-1</sup>): extrato de malte (3,0), glicose (10,0), extrato de levedura (3,0), peptona bacteriológica (17,0). Após 72 horas em condição padrão de agitação de 150 rpm a biomassa crescida foi filtrada e lavada com 300 ml de água deionizada estéril. Cerca de 5 g de biomassa úmida foi transferida a um novo Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de água deionizada estéril e mantida à agitação de 150 rpm até sua filtração, após 72 horas, realizada em papel filtro Millipore (3 µm). Por fim, o extrato resultante foi transferido a um novo frasco Erlenmeyer de 250 ml para a adição de solução de 1 ml de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) na concentração 100

mM para a realização da biossíntese. Essa solução foi mantida em ambiente isento de luz à agitação de 150 rpm, por um período de 72 horas. Para o controle, o mesmo procedimento foi adotado, contudo, com a biomassa autoclavada após o crescimento em MGLP.

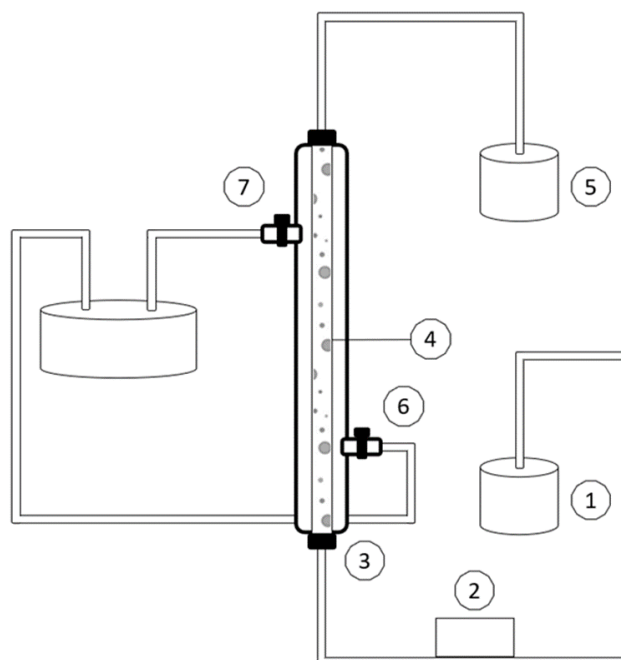
### **3.3. Encapsulação em gel alginato**

As microcápsulas foram obtidas por gelificação ionotrópica com alginato de sódio de baixa viscosidade de acordo com Pereira *et al.* (2019) e Pereira *et al.* (2018). A solução do biopolímero foi preparada solubilizando 4 % (p/v) de alginato de sódio em 12 ml de AgNP biológica. Posteriormente, a solução de biopolímero (100 ml) foi gotejada em 100 ml de uma solução aquosa de cloreto de cálcio (0,14 M). O sistema foi mantido sob agitação magnética (200 rpm) por 1 min. Após o processo de gelificação, as microcápsulas foram filtradas utilizando uma bomba à vácuo 5005 (NEVONI).

### **3.4. Implementação do reator de leito fixo empacotado com AgNPs imobilizadas**

#### **3.4.1. Aparato experimental**

O aparato experimental foi constituído por uma bomba peristáltica, com controle de vazão volumétrica utilizada para alimentar o afluente (água contaminada com bactérias patogênicas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) em fluxo ascendente, por meio de uma tubulação de silicone (0,5 cm de diâmetro) até a entrada do reator PBR. O afluente foi mantido em banho maria com circulação interna de água na temperatura do processo. O reator foi construído em vidro de borossilicato com diâmetro e comprimento nominais de 1,2 e 20 cm, respectivamente, cujas AgNP biológicas, com diâmetros previamente definidos, constituíram o seu leito. A temperatura do processo foi controlada no reator por uma jaqueta térmica mediante circulação de água oriunda de um banho termostatizado, à 37°C. As extremidades (entrada e saída) do reator foram equipadas por bandejas de distribuição usinadas em material antiaderente visando homogeneizar a dispersão radial do afluente através do leito do reator. A coleta das amostras foi realizada na saída superior do reator e foram analisadas por meio da contagem de UFC após 24hrs.



**Figura 1:** Estrutura do reator de leito fixo (PBR): (1) Afluente; (2) bomba peristáltica; (3) entrada do afluente; (4) Leito fixo preenchido com encapsulados (Alginato, AgNP, AgNO<sub>3</sub>); (5) retirada da amostra; (6) entrada de água do banho maria; (7) saída de água do banho maria.

### 3.4.2. Avaliação dos parâmetros operacionais

Para a implementação do processo contínuo para desinfecção de água contaminada, foram avaliados os seguintes parâmetros do reator PBR: altura do leito fixo (50 % e 100 % da altura total do leito), vazão volumétrica de alimentação (1,0 ml/min, 4,0 ml/min e 7,0 ml/min), concentração do afluente (água contaminada nas concentrações de 10<sup>3</sup> UFC/ml; 10<sup>4</sup> UFC/ml e 10<sup>5</sup> UFC/ml) e a temperatura do processo foi mantida em 37 °C.

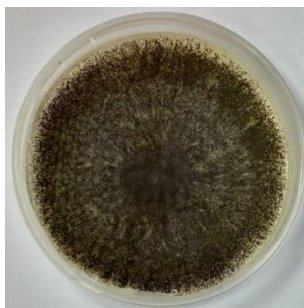
## 4.0 Resultados e Discussão

### 4.1 Biossíntese e caracterização das AgNP na forma coloidal

A biossíntese de NPs apresenta um menor impacto ambiental durante o processo e quando exposto ao meio ambiente e, também, um menor custo de energia e produção quando comparados com os métodos sintéticos de produção de NPs

(Singh *et al.*, 2020). A utilização da síntese biológica de NPs pode ser considerada mais econômica e ecologicamente sustentável, pela alta disponibilidade de microrganismos e menor liberação de resíduos tóxicos no ambiente. Este método está associado com a habilidade de absorver e acumular íons metálicos pelos microrganismos e a presença de agentes de nivelamento que estabilizam a NP e diminuem a aglomeração (Ndaba, *et al.* 2022).

As características físico-químicas das NPs podem influenciar sua ação, portanto a caracterização é de grande importância, já que permite melhor compreensão das suas propriedades e mecanismos de ação. A sua toxicidade pode ser afetada pelo tamanho, aglomeração, carga e morfologia; são fatores que influenciam a área de superfície da NP e bioacumulação do material (Assis da Silva, *et al.* 2022).

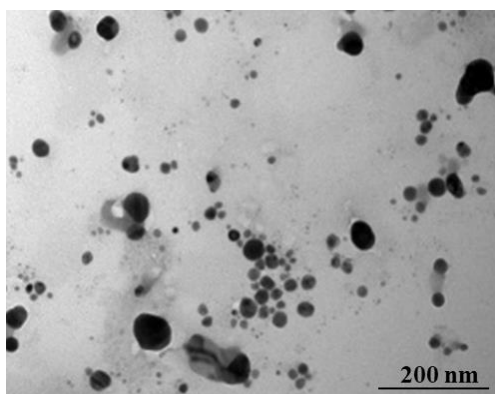


**Figura 2:** Fungo *Aspergillus niger* IBCLP20 crescido em meio BDA.

O fungo *Aspergillus niger* (IBCLP20) foi inoculado em placas contendo meio BDA, mantidos na estufa a 30 °C por um período de sete dias e então armazenado na geladeira. A formação de AgNP pelo IBCLP20 foi inicialmente confirmada por detecção visual de uma cor amarronzada típica (Figura 3) e por outros parâmetros. Por imagem obtida por MET (Figura 4) a AgNP do IBCLP20 tem uma forma esférica e tamanho ao redor de 37.4–67.4 nm. Em dispersão na água, AgNP de IBCLP20 de tamanho hidrodinâmico, determinado por DLS, foi 80.5 nm, o P $\zeta$  foi 38.56 e o PDI foi 0.215. Considerando que estas medidas ocorreram mensalmente por um período de 6 meses, AgNPs IBCLP20 foram considerados estáveis com um valor constante para todos os parâmetros analisados.



**Figura 3:** Biossíntese de AgNP. 5 discos de 6 mm da colônia de crescida em BDA em frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultura MGLP líquido para a biossíntese de AgNPs.



**Figura 4:** Micrografia de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de NP metálicas em suspensão, com AgNP micogênicas sintetizadas pelo *Aspergillus niger* IBCLP20. Escala: 200 nm.

#### 4.2 Encapsulação em gel alginato

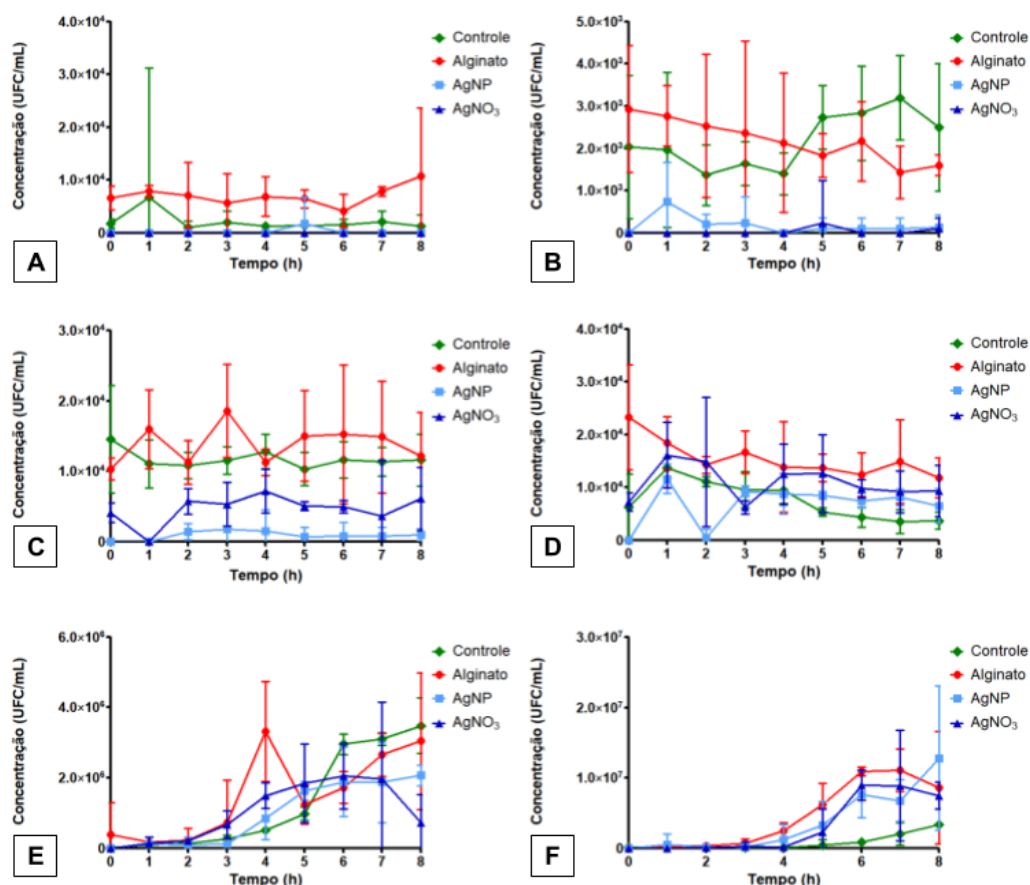
A encapsulação em gel alginato evita a aglomeração das NPs e mantém por um maior período suas propriedades, inclusive a reutilização desse nanomaterial em processos como o tratamento de água potável (Mazumder *et al.*, 2019; Agnihotri *et al.*, 2019). O alginato como agente imobilizante é um polímero que pode ser obtido de algas marrons que apresenta alta biocompatibilidade com as AgNPs. Por ser um composto abundante na natureza, a sua obtenção não apresenta alto custo econômico (Alavi *et al.*, 2019). A encapsulação, além de aumentar a eficiência do sistema, também diminui os riscos ambientais provenientes da liberação de material tóxico (Barthi *et al.*, 2019).



**Figura 5:** Encapsulação em gel alginato. A solução com  $\text{AgNO}_3$  a 1mM foi gotejada, com o uso de uma bomba peristáltica, em 100 ml de uma solução aquosa de cloreto de cálcio (0,14 M) usando uma seringa de infusão intravenosa. O sistema foi mantido sob agitação magnética para otimizar a encapsulação em gel alginato.

#### **4.3 Implementação de um sistema de tratamento de água, por fluxo contínuo, usando reator de leito fixo recheado com NPs encapsuladas**

Foram realizados ensaios de concentração de afluente contaminado com *E. coli* IPT245 e *P. aeruginosa* IPT365 nas concentrações de  $10^3$  UFC/ml à  $10^5$  UFC/ml em reator de leito fixo (PBR) utilizando as  $\text{AgNPs}_{\text{AC}}$ , seu precursor ( $\text{AgNO}_3$ ), o agente imobilizante, alginato de cálcio (AC), e controle negativo com pérolas de vidro (Fig. 6) visando o tratamento de água.



**Figura 6:** Efeito da concentração do afluente *Escherichia coli* IPT245 (A,C,E) e *Pseudomonas aeruginosa* IPT365, (B,D,F) em um reator PBR preenchido a 100% com AgNPs<sub>AC</sub> para a descontaminação de água. Alginate de cálcio (AC) (●), AgNO<sub>3</sub>AC (▲), AgNPs<sub>AC</sub> (■) e controle (◆).

Conforme apresentado nas Figuras 6A e 6B, o reator PBR 100% empacotado com AgNPs<sub>AC</sub> e operado em fluxo contínuo de 4,0 ml/min do afluente (*E. coli* IPT245) nas concentrações de 10<sup>3</sup> e 10<sup>4</sup> UFC/ml, apresentou 100% de inibição no crescimento microbiano nas 8 h de ensaio. Resultados similares foram obtidos com o reator operado nas mesmas condições utilizando o afluente constituído por *P. aeruginosa* IPT365 (Fig. 6B e 6D). Em contrapartida, o metal precursor encapsulado em nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>AC) não apresentou a mesma toxicidade quanto as AgNPs<sub>AC</sub> nas concentrações 10<sup>4</sup> e 10<sup>5</sup> UFC/ml (Fig. 6C, 6D, 6E e 6F). Muito embora ambos os compostos sejam tóxicos, a toxicidade das AgNPs<sub>AC</sub> foi mais pronunciada.

Quando o reator foi operado com os afluentes constituídos por ambas as bactérias na concentração de 10<sup>5</sup> UFC/ml a eficiência de 100% do reator ocorreu

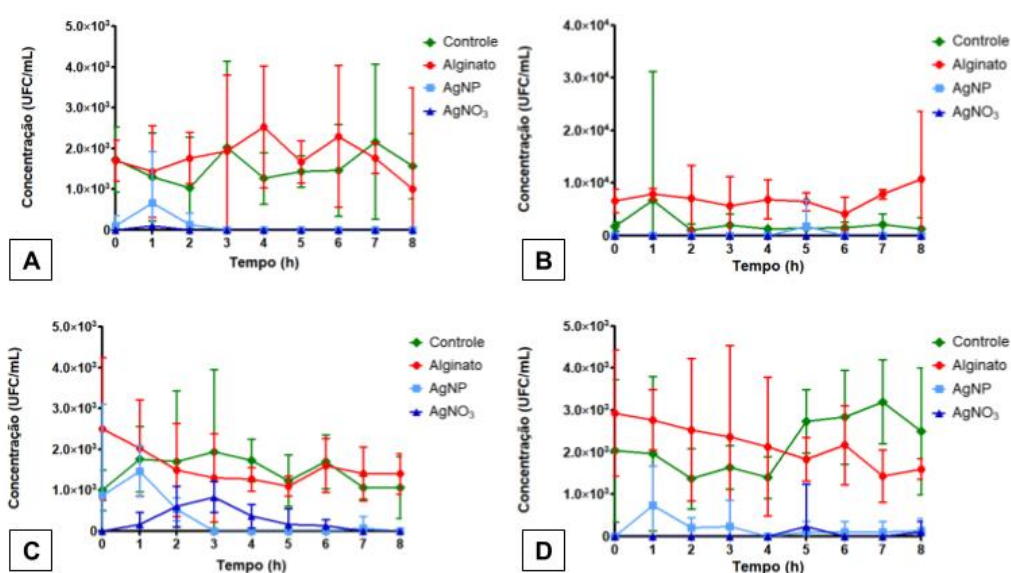
apenas nas 3 primeiras horas de operação (Fig. 6E e 6F). Ambas apresentando aumento gradual do crescimento celular após este período. Isto pode ocorrer já que a eficácia da AgNPs<sub>SAC</sub> depende, dentre outros fatores, da concentração do microrganismo (Bahcelioglu *et al.*, 2021). De acordo com alguns estudos (Tan *et al.*, 2018; Hong *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016), a eficiência de AgNPs sintéticas na faixa de concentração microbiana superior a 10<sup>4</sup> UFC/ml apresentam menor efeito antimicrobiano. Na pesquisa de Tan *et al.* (2018) a nanopartícula metálica foi eficiente na inativação da bactéria a depender da concentração. Em concentrações maiores, como de 10<sup>5</sup> UFC/ml, a inativação da bactéria foi menos de 50% e na menor concentração de 10<sup>3</sup> UFC, nas mesmas condições, a inativação aumentou em 10%. Isto está de acordo com os resultados obtidos com a implementação do reator no presente estudo, no entanto o sistema perdeu eficiência ao longo do tempo, porém com a capacidade de inativar as bactérias nas primeiras horas.

De acordo com Karimi *et al.* (2017), a toxicidade das AgNPs está relacionada com a liberação de íons de prata. Conforme Khan *et al.* (2022) as AgNPs liberam íons Ag<sup>+</sup> de forma lenta e eles causam danos celulares tanto no DNA quanto na membrana celular da bactéria, contudo, não causam danos às células de mamíferos. Segundo Bhardwaj *et al.* (2021), o encapsulamento aumenta a afinidade com a superfície do microrganismo alvo. Em acréscimo, o encapsulamento das AgNPs em AC potencializou o funcionamento das AgNPs<sub>SAC</sub>, possivelmente por diminuir a aglomeração, prolongando a atividade das AgNPs atividade (Gonçalves *et al.*, 2016; Mazumder *et al.*, 2019).

Para ambas as bactérias, o AC não apresentou efeito tóxico. Diversos autores (Ching *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2014), descrevem que o AC como um excelente agente encapsulante devido a sua baixa toxicidade, estabilidade e reconhecida biodegradabilidade.

A altura do leito pode influenciar na atividade da AgNPs<sub>SAC</sub>. Deste modo, foram realizados ensaios com o reator PBR empacotado com AgNPs<sub>SAC</sub>, AgNO<sub>3</sub>AC, AC (controle positivo) e esferas de vidro nas alturas do leito de 50% (8,75 g) e 100% (17,5g). O reator foi operado em fluxo contínuo de 4,0 ml/min do afluente constituído por *E. coli* IPT245 ou *P. aeruginosa* IPT365 na concentração de 10<sup>3</sup> UFC/ml.

Conforme apresentado nas Figuras 7A e 7B, foi determinada uma taxa de inibição no crescimento de *E. coli* IPT245 de 100% em ambas as alturas de empacotamento do reator. Resultados similares foram obtidos com o reator operado nas mesmas condições utilizando o afluente constituído por *P. aeruginosa* IPT365 (Fig. 7C e 7D). No entanto, como representado na Figura 7C, o reator empacotado a 50% de AgNPs<sub>SAC</sub> não apresentou inibição do crescimento celular do organismo nas 3 primeiras horas de operação, após esse período, a inibição de crescimento foi de 100%.

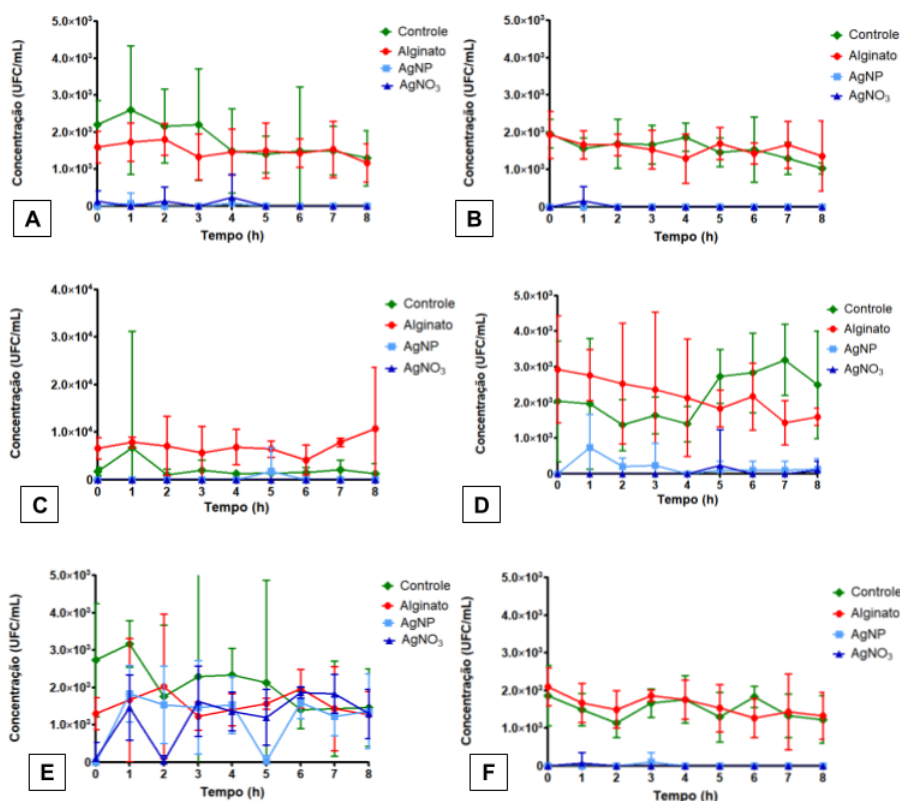


**Figura 7:** Efeito da altura do leito em um reator PBR preenchido a 100% (B,D) e 50% (A,C) com AgNPs<sub>SAC</sub> para a descontaminação de água. Alginato de cálcio (AC) (●), AgNO<sub>3</sub>AC (▲), AgNPs<sub>SAC</sub> (■) e controle (◆).

Outro fator que pode influenciar a atividade da AgNPs<sub>SAC</sub> é a vazão volumétrica de alimentação do reator PBR. Portanto, foram realizados ensaios com o reator PBR empacotado com AgNPs<sub>SAC</sub>, AgNO<sub>3</sub>AC, AC (controle positivo) e esferas de vidro na altura do leito 100% (17,5g) e operado em fluxo contínuo de 1,0 ml/min, 4,0 ml/min e 7,0 ml/min do afluente constituído por *E. coli* IPT245 ou *P. aeruginosa* IPT365 na concentração de 10<sup>3</sup> UFC/ml.

Segundo indicado nas Figuras 8A e 8C, o reator PBR 100% empacotado com AgNPs<sub>SAC</sub>, em fluxo contínuo de 1 ml/min e 4 ml/min, do afluente (*E. coli* IPT245), apresentou 100% de eficiência operacional durante todo o período de ensaio. Resultados similares foram obtidos com o reator operado nas mesmas condições

utilizando o afluente constituído por *P. aeruginosa* IPT365 (Fig. 8B e 8D) e, também, em fluxo contínuo de 7ml/min do mesmo afluente conforme Figura 8F. Resultados similares foram obtidos com o reator empacotado com o precursor ( $\text{AgNO}_3$ ) operado nas mesmas condições utilizando o afluente constituído por *P. aeruginosa* IPT365 ou *E. coli* IPT245 (Fig. 8A, 8B, 8C, 8D e 8F).



**Figura 8:** Efeito da vazão volumétrica de alimentação de 1ml/min (A,B), 4ml/min (C,D) e 7ml/min (E,F) em um reator PBR preenchido a 100% com  $\text{AgNPs}_{\text{AC}}$  para a descontaminação de água. Alginato de cálcio (AC) (●),  $\text{AgNO}_3$  (▲),  $\text{AgNPs}_{\text{AC}}$  (■) e controle (◆).

Entretanto, o reator PBR 100% empacotado com  $\text{AgNPs}_{\text{AC}}$ , em fluxo contínuo de 7 ml/min do afluente (*E. coli* IPT245) não exibiu inibição do crescimento celular (Fig. 8E). Resultados similares foram obtidos reator empacotado com o precursor ( $\text{AgNO}_3$ ) operado nas mesmas condições (Fig. 8E). Conforme Khan *et al.* (2022) as  $\text{AgNPs}$  liberam íons  $\text{Ag}^+$  de forma lenta, portanto, o crescimento celular pode ocorrer pelo pouco tempo de contato do afluente com o encapsulado o que diminui a interação com os íons  $\text{Ag}^+$ .

## **5.0 Conclusões**

É possível inferir que as AgNPs apresentam eficiência contra ambas as bactérias patogênicas estudadas onde os melhores resultados foram obtidos na concentração do afluente até  $10^4$  UFC/ml, em ambas as alturas do leito, na maioria das vazões volumétricas analisadas. No entanto, mais estudos devem ser realizados.

## Referências

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). RDC no. 275, de 22 de setembro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Características Microbiológicas para Água Mineral Natural e Água Natural [resolução RDC na internet]. Diário Oficial da União 23 set 2005; seção 1.
2. AGNIHOTRI, Shekhar; MUKHERJI, Soumyo; MUKHERJI, Suparna. Impact of background water quality on disinfection performance and silver release of immobilized silver nanoparticles: Modeling disinfection kinetics, bactericidal mechanism and aggregation behavior. *Chemical Engineering Journal*, 372, 684-696, 2019.
3. ALAVI, Mehran & RAI, Mahendra. Recent progress in nanoformulations of silver nanoparticles with cellulose, chitosan, and alginic acid biopolymers for antibacterial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 8669–8676, 2019.
4. ARROYO, Betty Jarma; BEZERRA, Anderson Campos; OLIVEIRA, Lara Lins; *et al.* Antimicrobial active edible coating of alginate and chitosan add ZnO nanoparticles applied in guavas (*Psidium guajava* L.). *Food Chem.*, 309, 125566, 2020.
5. ASSIS da SILVA, Carolina; RIBEIRO, Bruna Marques; do VALLE TROTTA, Catarina; PERINA, Fernando Cesar; MARTINS, Roberto; de SOUZA ABESSA, Denis Moledo; BARBIERI, Edison; SIMÕES, Marta Filipa; OTTONI, Cristiane Angélica. Effects of mycogenic silver nanoparticles on organisms of different trophic levels. *Chemosphere*, 308, 136540, 2022.
6. BAHCELIOGLU, Ecem; UNALAN, Husnu Emrah; ERGUDER, Tuba Hande. Silver-based nanomaterials: A critical review on factors affecting water disinfection performance and silver release. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 51(20), 2389-2423, 2021.
7. BHARDWAJ, Abhishek Kumar; SUNDARAM, Shanthi; YADAV, Krishna Kumar; *et al.* An overview of silver nano-particles as promising materials for water disinfection. *Environmental Technology & Innovation*, 23, 101721, 2021.

8. BHARTI, Sharda; MUKHERJI, Soumyo; MUKHERJI, Suparna. Water disinfection using fixed bed reactors packed with silver nanoparticle immobilized glass capillary tubes. *Science of The Total Environment*, 689, 991–1000, 2019.
9. Brasil, Ministério da Saúde. Portaria n.º 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre normas de potabilidade de água para o consumo humano.
10. CHING, Su Hung; BANSAL, Nidhi; BHANDARI, Bhesh. Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(6), 1133-1152, 2017.
11. FOGLER, H. Scott. Elements of chemical engineering reactions, 4. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.
12. GOMES, Tânia A. T.; ELIAS, Waldir P.; SCALETISKY, Isabel C.; et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian journal of microbiology*, 47, 3-30, 2016.
13. GONÇALVES, V. S., GURIKOV, P., POEJO, J., et al. Alginate-based hybrid aerogel microparticles for mucosal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 107, 160-170, 2016.
14. HONG, Xuesen; WEN, Junjie; XIONG, Xuhua; et al. Silver nanowire-carbon fiber cloth nanocomposites synthesized by UV curing adhesive for electrochemical point-of-use water disinfection. *Chemosphere*, 154, 537-545, 2016.
15. JURADO-MARTÍN, Irene; SAINZ-MEJÍAS, Maite; MCCLEAN, Siobhán. *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3128, 2021.
16. KARIMI, Javad; MOHSENZADEH, Sasan. Physiological Effects of Silver Nanoparticles and Silver Nitrate Toxicity in *Triticum aestivum*. *Iran J Sci Technol Trans Sci*, 41, 111–120, 2017.
17. KHAN, Sadaf Aiman; JAIN, Marut; PANDEY, Ashish; et al. Leveraging the potential of silver nanoparticles-based materials towards sustainable water treatment. *Journal of Environmental Management*, 319, 115675, 2022.
18. KUMAR, Sandeep; BHANJANA, Gaurav; SHARMA, Amit; et al. Synthesis, characterization and on field evaluation of pesticide loaded sodium alginate nanoparticles. *Carbohydrate polymers*, 101, 1061-1067, 2014.

19. LIM, Timothy J.Y.; SARGENT, Robert; HENRY, Rebekah; *et al.* Riparian buffers: Disrupting the transport of *E. coli* from rural catchments to streams. *Water Research*, 222, 118897, 2022.
20. MAZUMDER, Jahirul Ahmed; PERWEZ, Mohammad; NOORI, Rubia; *et al.* Development of sustainable and reusable silver nanoparticle-coated glass for the treatment of contaminated water. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(22), 23070-23081, 2019.
21. MUKHERJEE, Abhijit; DUTTAGUPTA, Srimanti; CHATTOPADHYAY, Siddhartha; *et al.* Impact of sanitation and socio-economy on groundwater fecal pollution and human health towards achieving sustainable development goals across India from ground-observations and satellite-derived nightlight. *Scientific reports*, 9(1), 1-11, 2019.
22. Nações Unidas. Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (2015). Disponível em: <<https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>>. Acesso em: 24 maio 2022.
23. NDABA, Busiswa; ROOPNARAIN, Ashira; RAMA, Haripriya; *et al.* Biosynthesized metallic nanoparticles as fertilizers: An emerging precision agriculture strategy. *Journal of Integrative Agriculture*, 21(5), 1225-1242, 2022.
24. NEETHU, Sahadevan; RADHAKRISHNAN, E. K., JYOTHIS, Mathew. Biofabrication of Nanoparticles Using Fungi. *In Nanotechnology for Agriculture*, 53-73, 2019.
25. PEREIRA, Adejanildo da S.; DINIZ, Marianne M.; De JONG, Gabriel; *et al.* Chitosan-alginate beads as encapsulating agents for *Yarrowia lipolytica* lipase: Morphological, physico-chemical and kinetic characteristics. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139, 621-630, 2019.
26. PLANET, Paul J. *Pseudomonas aeruginosa*. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*, 866-870.e1, 2018.
27. SINGH, Anirudh; GAUTAM, Pavan Kumar; VERMA, Arushi; *et al.* Green synthesis of metallic nanoparticles as effective alternatives to treat antibiotics resistant bacterial infections: A review. *Applied Biotechnology Reports*, e00427, 2020.

28. SOFI, Mohd Abass; SUNITHA, S.; SOFI, Mohammad Ashaq; *et al.* An overview of antimicrobial and anticancer potential of silver nanoparticles. *Journal of King Saud University-Science*, 101791, 2021.
29. TAN, Xiaojun; CHEN, Chao; HU, Yongyou; *et al.* Novel AgNWs-PAN/TPU membrane for point-of-use drinking water electrochemical disinfection. *Science of the Total Environment*, 637, 408-417, 2018.
30. TRUU, Marika; LIGI, Teele; NÕLVAK, Hiie; *et al.* Impact of synthetic silver nanoparticles on the biofilm microbial communities and wastewater treatment efficiency in experimental hybrid filter system treating municipal wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, v. 440, p. 129721, 2022.
31. United Nations. The Sustainable Development Goals Report (2020). p. 36.
32. ZHANG, Huai-Zhi; ZHANG, Chang; ZENG, Guang-Ming; *et al.* Easily separated silver nanoparticle-decorated magnetic graphene oxide: synthesis and high antibacterial activity. *Journal of colloid and interface science*, 471, 94-102, 2016.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Instituto de Biociências  
Câmpus do Litoral Paulista



### PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Discente:** STELLA DANIELS KOVACS

**Título:** "Implementação de parâmetros em reator de leito fixo na desinfecção de água contaminada utilizando nanopartículas de prata micológicas imobilizadas em alginato"

**Orientador:** Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni

**Curso/Habilitação:** Bacharelado em Ciências Biológicas/Biologia Marinha

| COMISSÃO EXAMINADORA                  | CONCEITO |
|---------------------------------------|----------|
| Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni |          |
| MSC. Mariana Ferreira Martins Cardoso |          |

**PARECER:**

*Muna foi muito elogiada e foram sugeridas pequenas alterações no documento final.*

**CONCEITO FINAL:**

A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que a discente **Stella Daniels Kovacs** obteve o seguinte conceito:

☒ APROVADO

☐ REPROVADO

São Vicente, 06 de dezembro de 2024.

*Cristiane Angélica Ottoni*  
Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni

*Mariana F. M. Cardoso*  
MSC. Mariana Ferreira Martins Cardoso