

OBTENÇÃO DE CARVÃO ATIVADO IMPREGNADO COM ÍONS METÁLICOS PARA FINS BACTERICIDAS

RIBEIRO, G.V.¹, RIGO, C.¹, VARGAS, A.C.², GRESSLER, L. T.², FOLETTTO, E.L.¹

¹ Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos

² Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

E-mail para contato: gvieiraribeiro@gmail.com

RESUMO – O desenvolvimento de produtos com ação antimicrobiana, inibitória ou mesmo letal, tem atraído considerável atenção nos mais distintos campos de pesquisa e aplicações. O objetivo deste estudo é obter um material antimicrobiano a partir de carvão ativado submetido à adsorção em um meio com íons metálicos. Para a caracterização deste material, avaliaram-se os efeitos inibitório e bactericida das amostras através de testes microbiológicos com diferentes bactérias. Quanto à metodologia experimental aplicada, foram testados os efeitos da presença de íons de prata, de cobre e de zinco, através de amostras de carvão impregnado em culturas de bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* de diferentes cepas. Tais efeitos foram avaliados através de testes de concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contexto

O desenvolvimento de produtos com ação antimicrobiana, inibitória ou mesmo letal, tem atraído atenção em diferentes campos de pesquisa e aplicações. Quer sejam empregados em ambientes industriais, hospitalares, sanitários ou mesmo domiciliares, esses chamados biomateriais atuam de forma eficaz na prevenção, no controle e no combate a agentes microbiológicos nocivos e às patogenicidades por eles desencadeadas.

Segundo Morones *et al.* (2005), surtos de doenças infecciosas causadas por diferentes bactérias patogênicas e o desenvolvimento de resistência aos antibióticos são alguns dos fatores que desencadeiam a procura por novos agentes antibacterianos.

Ainda que alguns materiais conhecidos naturalmente ofereçam esse efeito antimicrobiano, cabe ao segmento de pesquisa e desenvolvimento de materiais, encontrar através de novas fontes e adequando tecnologias aos diferentes processos, produtos que atendam às demandas específicas que surgem constantemente, intensificando propriedades inerentes ao material originário sem

alterar demais características desejáveis. Nessa linha de pesquisa, a preparação de sólidos com propriedades inibitórias ou bactericidas, através da metodologia de impregnação de íons metálicos, é fonte de diversos estudos.

Li *et al.* (2002) aponta que vários compostos apresentam um conhecido efeito microbicida, especialmente os de natureza orgânica. Contudo, o uso deste tipo de compostos apresenta desvantagens como tendências de volatilização ou decomposição, pontos de fusão e ebulição baixos, além de apresentarem alguma toxicidade.

Hu (HU, 2000, *apud* Li *et al.*, 2002) comenta que os materiais inorgânicos dotados desse efeito normalmente ocorrem sob a forma de compósitos onde a incorporação de íons metálicos ou compostos orgânicos dentro ou fora de suas estruturas os faz atuar como um carregador ou um suporte que libera estas substâncias de forma controlada e apropriada. Entre os carregadores inorgânicos citados com maior frequência na literatura, incluem-se, zeólitas, argilas, vidro e carvão ativado.

Como exemplos de produtos aos quais se agregam esses agentes, podem-se citar filtros de tratamento de águas de abastecimento, cerâmicas e descontaminantes para pisos (utilizáveis em ambientes assépticos), bandagens para queimaduras e materiais para implantes ósseos, aditivos nas rações animais, na produção de tintas e na de papéis, entre outros.

O objetivo dessa pesquisa é obter e caracterizar um material antimicrobiano a partir de carvão ativado submetido à adsorção em um meio com íons metálicos. Optou-se primeiramente pela aplicação da prata, que, como citado por Park & Jang (2003), tem um longo histórico de uso medicinal como agente antimicrobiano e, posteriormente, testaram-se amostras contendo zinco e cobre, metais recorrentemente apontados no levantamento bibliográfico realizado.

2. METODOLOGIA

2.1. Referencial Teórico

Trata-se de uma metodologia de pesquisa experimental aliada à pesquisa bibliográfica e documental. Para tal, os dados referenciais foram coletados mediante diferentes fontes, nas quais se destacaram publicações periódicas, dissertações, teses e patentes, enquanto que os dados experimentais foram obtidos em ambiente laboratorial.

2.2. Metodologia Experimental

A obtenção das amostras de carvão ativado impregnado com íons metálicos foi dividida em três etapas, aqui descritas como experimento I, experimento II e experimento III.

O experimento I consistiu em um pré-teste, nele produziram-se quatro amostras de diferentes concentrações de prata que foram submetidas apenas a teste microbiológico de disco-difusão em ágar. Com base nos resultados obtidos nessa primeira etapa, o experimento II foi conduzido com novos limites de trabalho. Um terceiro experimento, citado como experimento III, foi realizado empregando-

se a mesma metodologia do experimento II, mas também com íons metálicos de cobre e de zinco e um tratamento térmico adicional.

2.2.1. Experimento I

Nesta etapa foram preparadas quatro amostras iniciais de carvão impregnado com prata. As concentrações de prata desejadas eram de 0.5%, 1.0%, 2.0% e 5.0 % (onde o percentual refere-se à proporção em peso de $\frac{g_{prata}}{g_{carvãoimpregnado}}$).

Para a preparação da suspensão base, 100 mL de água deionizada foram vertidos sobre 5,0 gramas de carvão ativado pulverizado, previamente seco em estufa à temperatura aproximada de 100°C. Preparam-se quatro suspensões que foram mantidas, em erlenmeyers de vidro de 250 mL, sob agitação de 110 rpm, em incubadora *shaker*.

As quatro soluções de $AgNO_3$ necessárias foram preparadas de acordo com a Tabela 1, com água deionizada, em balões volumétricos de 50 mL. Uma vez preparadas as soluções de nitrato de prata, com o auxílio de uma pipeta volumétrica de 50 mL, cada uma foi gotejada lentamente sob a sua respectiva suspensão em agitação. A adsorção foi então conduzida, ainda sob agitação de 110 rpm e temperatura de 30°C, durante duas horas.

Tabela 1- Soluções de $AgNO_3$.

| Solução | Fração de prata (%) | Massa de carvão impregnado (g) | Massa de Ag (g) | Massa de $AgNO_3$ (g) |
|---------|---------------------|--------------------------------|-----------------|-----------------------|
| 01 | 0,5 | 5,025 | 0,251 | 0,039 |
| 02 | 1,0 | 5,05 | 0,051 | 0,080 |
| 03 | 2,0 | 5,10 | 0,102 | 0,161 |
| 04 | 5,0 | 5,26 | 0,263 | 0,414 |

Para se evitarem maiores perdas de massa através da filtração, optou-se por secar, em estufa, à temperatura de 100°C, durante 90 horas, toda a suspensão após a adsorção. Para facilitar a remoção posterior do sólido, os volumes foram transferidos para béqueres de vidro de 500 mL, onde se adicionaram mais 100 mL de água deionizada, empregada na remoção do carvão aderido nas paredes dos erlenmeyers.

Ao término do procedimento, possuíam-se quatro amostras de carvão impregnado com prata em diferentes concentrações de 0.5%, 1.0%, 2.0% e 5.0 % (em $\frac{g_{prata}}{g_{carvãoimpregnado}}$). Essas amostras foram então submetidas a teste de disco-difusão em ágar e caracterizaram o pré-teste.

2.2.2. Experimento II

Em função dos resultados obtidos no pré-teste, preparou-se nova amostra com a concentração desejada de 2,0%, onde o percentual refere-se à proporção em peso de $\frac{g_{prata}}{g_{carvãoimpregnado}}$.

A metodologia de preparo dessa amostra foi similar à descrita no item 2.2.1 (Experimento I). Contudo, em função da quantidade de amostra necessária para a realização dos testes de

caracterização, partiu-se agora de 10 gramas de carvão ativado pulverizado, previamente seco em estufa à temperatura aproximada de 100°C. Em termos de novo volume, foram empregados 150 mL de água deionizada na suspensão, 50 mL de solução de AgNO₃ (0,321 g de AgNO₃) e 50 mL de água deionizada para auxílio na transferência de frascos. Por se tratar de uma massa maior de sólido, a adsorção foi conduzida a 170 rpm. As demais condições se mantiveram constantes.

2.2.3. Experimento III

O terceiro experimento foi realizado seguindo-se a mesma metodologia aplicada no experimento II, com as seguintes condições:

- *Suspensão*- (200 mL de água deionizada e 9,8 gramas de carvão ativado pulverizado previamente seco em estufa à temperatura aproximada de 100°C);
- *Soluções*- (tabela 2 e água deionizada em balão volumétrico de 250 mL);
- *Adsorção*- (suspensão mais 60 mL de solução gotejada)- adsorção conduzida, sob agitação de 110 rpm e temperatura de 30°C, durante 2 horas.
- *Secagem*- toda a suspensão + 20 mL de água deionizada (transferência do sólido), secagem em estufa, à temperatura de 100°C, durante 90 horas.

Tabela 2- Soluções fontes de Prata, Cobre e Zinco.

| Metal | Reagente | Fração de metal (%) | Massa de carvão impregnado (g) | Massa de metal (g) | Massa de reagente (g) |
|-------|--|---------------------|--------------------------------|--------------------|-----------------------|
| Prata | AgNO ₃ | 2,0 | 10,00 | 0,2 | 0,039 |
| Cobre | Cu(NO ₃) ₂ .3H ₂ O | 2,0 | 10,00 | 0,2 | 0,080 |
| Zinco | Zn(NO ₃) ₂ .6H ₂ O | 2,0 | 10,00 | 0,2 | 0,161 |

Uma vez que a atividade de prata e dos demais metais já é conhecida na literatura científica, optou-se pela realização de um tratamento térmico adicional, como apontado nos trabalhos de Oya et al. (1993), Oya e Kimura (1994), Li et al (1998), Adhoum & Monser (2002), Xavier (2010) e Ko (2010). Após a secagem, as amostras foram submetidas a aquecimento de 400 °C, durante 2 horas, em atmosfera de N₂ a uma taxa de aquecimento de 10°C/min. Posteriormente, as amostras foram lavadas com 100 mL de água em filtro de membranas e secas em estufa à 100°C durante 48 horas.

2.2.4. Testes Microbiológicos

No Experimento I, foram realizados apenas os testes da amostra de carvão ativado impregnado com prata a 2,0 % em meio com as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC e *Escherichia coli* ATCC. A figura 1 ilustra o procedimento. Empregou-se a técnica utilizada por Rosário (2010), adaptando-a as amostras de carvão. Foram depositados 2 mg de carvão ativado impregnado com prata em orifícios de 7mm de diâmetro no ágar e também papel filtro impregnado com suspensão de 2 mg de carvão e 10 µL de água destilada estéril, similar a discos de ATB.



Figura 1- Preparo da amostra para disco-difusão em ágar.

Uma vez obtidas as amostras com a concentração indicada pelo teste de disco-difusão em ágar, realizaram-se análises quantitativas de Concentração Mínima Inibitória (CIM) e Concentração Mínima Bactericida (CMB), também citadas por Rosário (2010). A figura 2 foi obtida durante a técnica, a presença de coloração indica a existência de bactérias.

Para estas análises, empregaram-se seis diferentes cepas de bactérias, ATCC *E.coli*, SB 440/00 *E.coli*, SB457/00 *E.coli*, ATCC *S. aureus*, SB255/98 *S.aureus* e SB390/98 *S.aureus*, sendo todas provenientes do Laboratório de Bacteriologia (LABAC) da Universidade Federal de Santa Maria. Foram realizadas análises distintas, empregando-se água ou DMSO como diluentes. Todas as amostras foram testadas em triplicata para cada cepa.

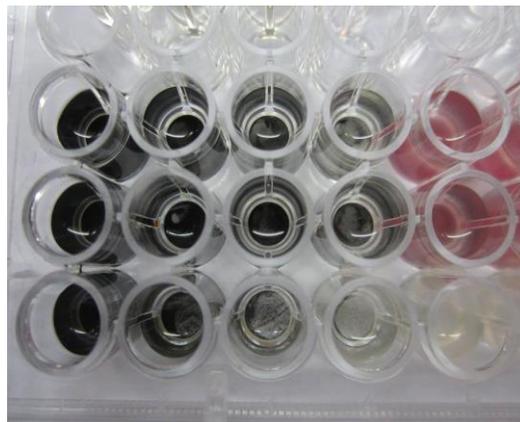


Figura 2- MIC carvão impregnado com prata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Através do experimento I, pode-se visualizar que a concentração ideal de prata na amostra de carvão era de aproximadamente 2,0%, já que o diâmetro do halo inibitório tanto para esta quanto para a de concentração 5,0% não variou muito, como pode ser observado na figura 3.

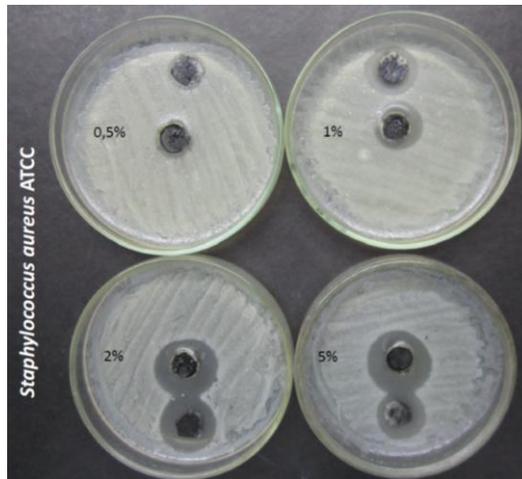


Figura 3- Disco-difusão em ágar.

Contudo, por se tratar de uma técnica qualitativa, os resultados da disco-difusão são muito influenciados pela espessura do ágar e pela profundidade do poço de inserção da amostra, assim, realizaram-se também técnicas quantitativas de concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida. A figura 4 traz a visualização de alguns dos resultados obtidos. A tabela 3 traz a síntese dos resultados obtidos para a amostra de carvão impregnado com prata.

Tabela 3- Resultados de CIM e CBM para prata.

| Amostras | Diluyente: água | | Diluyente: DMSO | |
|---------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| | CIM | CBM | CIM | CBM |
| Prata em $\mu\text{g/mL}$ | | | | |
| ATCC <i>E.coli</i> | 100 $\mu\text{g/mL}$ | 100 $\mu\text{g/mL}$ | 50 $\mu\text{g/mL}$ | 50 $\mu\text{g/mL}$ |
| ATCC <i>S.aureus</i> | 50 $\mu\text{g/mL}$ | 50 $\mu\text{g/mL}$ | 50 $\mu\text{g/mL}$ | 100 $\mu\text{g/mL}$ |
| SB440/00 <i>E. coli</i> | 200 $\mu\text{g/mL}$ | 200 $\mu\text{g/mL}$ | 25 $\mu\text{g/mL}$ | 50 $\mu\text{g/mL}$ |
| SB390/98 <i>S.aureus</i> | 200 $\mu\text{g/mL}$ | 400 $\mu\text{g/mL}$ | 12,5 $\mu\text{g/mL}$ | 50 $\mu\text{g/mL}$ |

Percebe-se que o DMSO funciona como um melhor diluyente na técnica, possibilitando que concentrações menores de prata se dispersem e sejam suficientes para atuar como agente inibitório e bactericida.

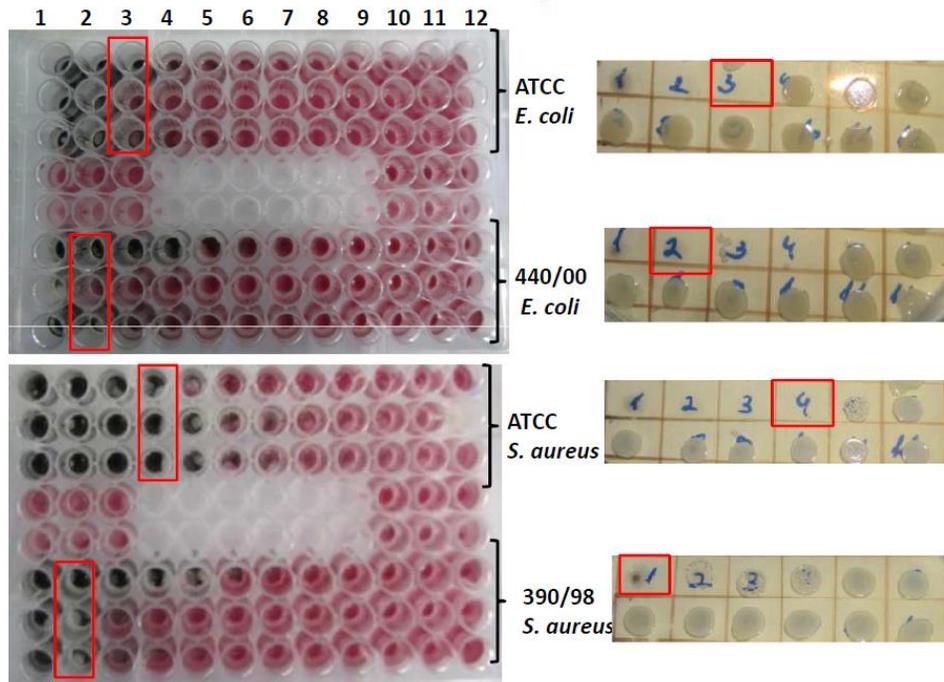


Figura 4- CMI (à esquerda) e CMB (à direita).

Por fim, através do experimento III, foram produzidas novas amostras de carvão impregnado com íons de prata, de zinco e de cobre. Por serem metais de conhecido efeito antimicrobiano, optou-se por avaliar a sua ação quando submetidos a tratamento térmico adicional, já que esta prática é citada inúmeras vezes nas publicações do gênero.

Sabendo-se que, dentre esses metais, a prata possui o maior efeito antimicrobiano, partiu-se de concentrações maiores de todas as amostras termicamente tratadas. A concentração inicial de metal empregada foi de 2000 $\mu\text{g/mL}$, sendo sucessivamente diluída para $\frac{1}{2}$. Contudo, os resultados obtidos demonstraram que mesmo conduzido em atmosfera inerte, o tratamento térmico reduziu ou até mesmo anulou a capacidade inibitória e a bactericida desses metais. O zinco e o cobre não tiveram ação bacteriostática nem bactericida. A prata não teve ação para ATCC de *E. coli*, nem para a cepa 440/00, embora tenha apresentado CMI e CMB de 1000 $\mu\text{g/mL}$ para a ATCC de *S. aureus* e CMI de 1000 $\mu\text{g/mL}$ para a cepa 390/98.

4. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos, verifica-se que o carvão ativado é um suporte viável para a produção de um material antimicrobiano. Por ser um material usualmente empregado em tratamento de águas de consumo e em ambientes hospitalares, essa demanda torna a capacidade bactericida e a bacteriostática atrativas para esses fins. Em termos práticos, verificou-se que o DMSO atua como um melhor diluente para as técnicas de análise microbiológica e que embora

citado em inúmeras referências, o tratamento térmico não se mostrou dequado para esse tipo de amostra.

5. Referências

ADHOUM, N.; MONSER, L. Removal of cyanide from aqueous solution using impregnated activated carbon. *Chemical Engineering and Processing*, v. 41, p.17-21, 2002.

KO, Tse-Tao. Method of fabricating product of activated carbon supporting silver. United States Patente. Patent n.US7,687,433 B2, mar.30,2010.

LI, B.; YU, S.; HWANG, J.Y.; SHI, S. Antibacterial vermiculite nano-material. *Journal of Minerals & Materials. Characterization & Engineering*, v.1, n.1, p. 61-68, 2002.

LI, Ch.Y.; WAN, Y.Z.; WANG, J.; WANG, Y.L.; JIANG, X.Q.; HAN, L.M. *Carbon*, v.36, p.61-65, 1998.

MORONES, J.R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMÍREZ, J.T.; YACAMAN, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, v. 16, p. 2346–2353, 2005.

OYA, A.; KIMURA, M.; SUGO, T.; KATAKAI, A.; ABE, Y.; IIZUKA, T.; AKIYAMA, N.; LINARES-SOLANO, A.; SALINAS-MARTINEZ DE LECEA, C. , *Carbon*, v. 32, p.107-110, 1994.

OYA, A.; WAKAHARA, T.; YOSHIDA, S. *Carbon*, v.31, p.1243-1247, 1993.

PARK, S; JANG, Y. Preparation and characterization of activated carbon fibers supported with silver metal for antibacterial behavior. *Journal of Colloid Interface Science*, v. 261, p. 238-243, 2003.

ROSÁRIO, J.A., Obtenção de material antimicrobiano a partir de bentonita nacional tratada com prata. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, UFSC, 2010.

XAVIER, R.N.; TRAGHETTA, D. G.; OLIVERIA, C. M. R. *Revista Brasileira de Ciências Ambientais*, n.15, 2010.