

MESTRADO INTEGRADO EM ENGENHARIA DO AMBIENTE

**APLICAÇÃO DE NANOMATERIAIS NA DESINFEÇÃO DE
ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO**

ANA SOFIA GUEDES GORITO DOS SANTOS

Dissertação submetida para obtenção do grau de
MESTRE EM ENGENHARIA DO AMBIENTE

Presidente do Júri: Fernando Francisco Machado Veloso Gomes
(Professor Catedrático do Departamento de Engenharia Civil da Faculdade de Engenharia da
Universidade do Porto)

Orientador académico: Olívia Salomé Gonçalves Pinto Soares, Investigador Auxiliar

Coorientador académico: Manuel Fernando Ribeiro Pereira, Professor Associado

Coorientador académico: Olga Cristina Pastor Nunes, Professor Auxiliar

Orientador na empresa: Alexandra Gonçalves, Investigadora e Engenheira de
desenvolvimento na Bosch Termotecnologia, Aveiro

Porto, junho de 2018

MESTRADO INTEGRADO EM ENGENHARIA DO AMBIENTE 2017/2018

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

Tel. +351- 22 508 1884

Fax +351- 22 508 1449

✉ mjmota@fe.up.pt

Editado por

FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

Rua Dr. Roberto Frias

4200-465 PORTO

Portugal

Tel. +351- 22 508 1400

Fax +351- 22 508 1440

✉ feup@fe.up.pt

🌐 <http://www.fe.up.pt>

Reproduções parciais deste documento serão autorizadas na condição que seja mencionado o Autor e feita referência a *Mestrado Integrado em Engenharia do Ambiente – 2017/2018 - Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2018.*

As opiniões e informações incluídas neste documento representam unicamente o ponto de vista do respetivo Autor, não podendo o Editor aceitar qualquer responsabilidade legal ou outra em relação a erros ou omissões que possam existir.

Este documento foi produzido a partir de versão eletrónica fornecida pelo respetivo Autor.

*“One Farol, Farol for one
Se um tem Farol, todos têm Farol”*

M&A

AGRADECIMENTOS

Este trabalho representa o culminar daquela que foi uma das maiores viagens que poderia ter. A realização do mesmo não seria possível sem a ajuda e apoio condicional de algumas pessoas a quem desejo expressar o meu agradecimento:

- Aos meus orientadores, Doutora Salomé Soares, Professora Doutora Olga Nunes, Professor Doutor Fernando Pereira e Doutora Alexandra Gonçalves pela oportunidade que me deram de realizar este trabalho, pela ajuda, dedicação e conhecimento transmitido durante a sua realização;
- À Bosch Termotecnologia pela oportunidade de colaboração para a realização deste projeto inovador;
- À Patrícia Ramalho, Rita Lopes, Patrícia Reis, Nuno Moreira, Ana Teresa Viana e Diana Salvador por todo o apoio durante a realização da parte experimental do trabalho, toda a dedicação e conhecimentos transmitidos;
- Aos meus companheiros de viagem, os melhores que poderia ter tido, por me terem acompanhado ao longo destes 5 anos com a promessa de serem muitos mais;
- Ao meu irmão, aos meus pais e à minha avó, por me acompanharem há 22 anos, e serem o maior exemplo que eu poderia ter;

Este trabalho foi parcialmente financiado pelos projetos:

(i) “AIProcMat@N2020 - Advanced Industrial Processes and Materials for a Sustainable Northern Region of Portugal 2020”, com referência NORTE-01-0145-FEDER-000006, cofinanciado pelo Programa Operacional Regional do Norte (NORTE 2020), através do Portugal 2020 e do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) e do Projeto POCI-01-0145-FEDER-006984 - Laboratório Associado LSRE-LCM - financiado FEDER, através do COMPETE2020 – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia I.P.

(ii) POCI-01-0145-FEDER-006939 (Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia, UID/EQU/00511/2013) financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia I.P.

(iii) NORTE-01-0145-FEDER-000005 – LEPABE-2-ECO-INNOVATION, cofinanciado pelo Programa Operacional Regional do Norte (NORTE 2020), através do Portugal 2020 e do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER).



BOSCH
Tecnologia para a vida

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma tecnologia de desinfecção de água para consumo humano através da aplicação de nanopartículas magnéticas (NPM's), com propriedades antibacterianas, para a remoção de diferentes microorganismos. A abordagem seguida tem como fim a aplicação da tecnologia em pontos de saída de água, como por exemplo torneiras, por esse motivo foram realizados ensaios em reator fechado e posteriormente em reator com funcionamento em contínuo.

Para atingir o objetivo proposto pela empresa Bosch Termotecnologia foram sintetizadas 8 nanopartículas diferentes tendo na sua base óxidos de ferro que lhes conferem propriedades magnéticas que auxiliam na sua separação da suspensão líquida. Às várias partículas foram adicionadas, durante a sua síntese, elementos como Cu, Ag e nanotubos de carbono (CNT) e alguns materiais foram revestidos com carbono ou carbono dopado com azoto através da técnica de deposição química em fase de vapor (do inglês CVD). A caracterização dos materiais sintetizados foi realizada utilizando várias técnicas como: análise termogravimétrica, adsorção de azoto a -196 °C, redução a temperatura programada, microscopia eletrónica de transmissão e dispersão de raios-X.

Para a avaliação da eficiência de remoção bacteriana de cada uma das nanopartículas sintetizadas utilizou-se uma suspensão bacteriana de *Escherichia coli* (*E.coli*) e realizaram-se vários ensaios, em reator fechado; fazendo variar condições experimentais como o tempo de contacto e a concentração de nanomaterial com o objetivo de selecionar as nanopartículas capazes de remover, de forma eficiente, as bactérias presentes na suspensão no menor tempo de contacto possível. Após a seleção das condições ótimas de funcionamento, foram realizados ensaios com a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* com todas as nanopartículas sintetizadas com o objetivo de averiguar a eficiência de remoção das mesmas para dois tipos de bactérias diferentes.

As nanopartículas magnéticas que se revelaram mais eficientes na remoção bacteriana foram as de C-FeO@CVD750, CuFeO/CNT e 5% Ag/FeO. Posteriormente o desempenho destas NPM's foi avaliado num reator a operar em modo contínuo utilizando um leito fixo e tempos de contacto de 1 min e 30 s. Para a realização destes ensaios foram utilizadas suspensões bacterianas de *E.coli*, *S.aureus* e uma suspensão mista com as duas bactérias.

Por último, realizaram-se ensaios de lixiviação das nanopartículas e recorreu-se ao kit Live/Dead para avaliar as propriedades antibacterianas das nanopartículas de C-FeO@CVD750, CuFeO/CNT e 5% Ag/FeO.

Os ensaios realizados em reator fechado permitiram a seleção das NPM's mais eficientes para a remoção bacteriana e das condições de operação ideais para a obtenção de uma remoção bacteriana

máxima. Os ensaios em reator de funcionamento em contínuo permitiram concluir que as NPM's de C-FeO@CVD750 e CuFeO/CNT são eficientes na remoção bacteriana permitindo obter eficiências de remoção de 100 % para tempos de contacto relativamente curtos, além de serem estáveis uma vez que se observou que não sofrem desativação durante o tempo de operação estudado.

Palavras-Chave: Nanopartículas magnéticas (NPM's), desinfecção de água, remoção bacteriana, propriedades antibacterianas.

ABSTRACT

The objective of this work was the development of a water disinfection technology for human consumption through the application of magnetic nanoparticles, with antibacterial properties, for the removal of different microorganisms. The approach followed aims to apply this technology in water outlet points, as for example taps, therefore tests were carried out in batch reactor and later in reactor with continuous operation.

To achieve the goal proposed by the company Bosch Thermotechnology, 8 different nanoparticles were synthesized having in their base iron oxides that give them magnetic properties. Elements such as Cu, Ag and carbon nanotubes were added to the particles during their synthesis and some materials were coated with carbon or carbon doped with nitrogen by chemical vapour deposition technique (CVD). The characterization of the synthesized materials was done using various techniques such as: thermogravimetric analysis, nitrogen adsorption at -196 °C, temperature programmed reduction, transmission electron microscopy and X-ray dispersion.

A bacterial suspension of *Escherichia coli* (*E.coli*) was used to evaluate the bacterial removal efficiency of each of the synthesized nanoparticles and several tests were carried out in a batch reactor; several experimental conditions such as contact time and nanomaterial concentration were evaluated in order to select the nanoparticles capable of efficiently removing the bacteria present in the suspension in the shortest contact time possible. After the selection of the optimum conditions of operation, experiments were performed with gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) with all nanoparticles synthesized in order to evaluate the efficiency of removal for two different types of bacteria.

The magnetic nanoparticles that proved to be the most efficient in bacterial removal were C-FeO@CVD750, CuFeO/CNT and 5% Ag/FeO. Subsequently, the performance of these magnetic nanoparticles was evaluated in a reactor operated in continuous mode with fixed conditions. Bacterial suspensions of *E.coli*, *S.aureus* and a mixed suspension with the two bacteria were used to carry out these tests.

Finally, leaching tests were performed with the nanoparticles and Live/Dead kit was used to validate the antibacterial properties of C-FeO@CVD750, CuFeO/CNT and 5% Ag/FeO nanoparticles.

The experiments carried out in batch reactor allowed the selection of the most efficient nanoparticles for the bacterial removal and of the optimum operating conditions to obtain a maximum bacterial removal. Continuous reactor assays have shown that C-FeO@CVD750 and CuFeO/CNT nanoparticles are efficient in bacterial removal allowing 100% removal efficiencies for relatively short

contact times and are stable since it was observed that they do not suffer deactivation during the operation time studied.

Keywords: Magnetic nanoparticles (MNP's), water disinfection, bacterial removal, antibacterial properties.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	i
Resumo.....	iii
Abstract	v
Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas.....	xiii
Nomenclatura.....	xv
Nota da empresa – Bosch Termotecnologia s.a.....	1
1 Introdução.....	3
1.1 Enquadramento.....	3
1.2 Objetivos do trabalho realizado	5
2 Estado da arte	7
2.1 Processos de desinfecção química.....	7
2.2 Processos de desinfecção física	10
2.3 Aplicação de nanomateriais no tratamento de água	12
2.4 Utilização de nanopartículas magnéticas para desinfecção de água	17
2.5 Parâmetros e condições que influenciam o tratamento de água com nanopartículas magnéticas	19
3 Materiais e metodologia	21
3.1 Síntese de nanopartículas magnéticas.....	21
3.1.1 Síntese de nanopartículas de Fe_2O_3 (FeO).....	21
3.1.2 Síntese de nanopartículas de CuFe_2O_4 (CuFeO).....	22
3.1.3 Síntese de nanopartículas de prata (5% Ag/FeO).....	22
3.1.4 Síntese de nanopartículas de Fe_2O_3 revestidas com material de carbono por CVD (C-FeO@CVD750).....	23
3.1.5 Síntese de nanopartículas de Fe_2O_3 revestidas com material de carbono dopado com azoto por CVD (N-C-FeO@CVD750)	24

3.1.6	Síntese de nanopartículas de Fe_2O_3 com nanotubos de carbono (FeO/CNT).....	25
3.1.7	Síntese de nanopartículas de CuFe_2O_4 com nanotubos de carbono (CuFeO/CNT)	25
3.1.8	Síntese de nanopartículas de prata com nanotubos de carbono (5% Ag/CNT)	25
3.2	Caracterização das nanopartículas magnéticas	25
3.2.1	Análise termogravimétrica (TGA)	25
3.2.2	Adsorção de azoto a -196°C	26
3.2.3	Redução a temperatura programada (TPR).....	26
3.2.4	Microscopia eletrónica de transmissão (TEM)	26
3.2.5	Difração de raios-X (XRD).....	26
3.3	Remoção de células bacterianas - ensaios em reator fechado	27
3.3.1	Preparação das suspensões bacterianas	27
3.3.2	Ensaio em reator fechado	27
3.3.3	Parâmetros testados.....	30
3.3.4	Comparação dos resultados obtidos para a <i>Escherichia coli</i> (gram-negativa) com a <i>Staphylococcus aureus</i> (gram-positiva)	32
3.4	Remoção de células bacterianas - ensaios em reator contínuo.....	33
3.4.1	Condições utilizadas durante os ensaios em contínuo com as suspensões bacterianas	34
3.4.2	Ensaio de controlo	35
3.5	Enumeração das células vivas e mortas - análises com o kit live/Dead	35
3.6	Análises de microscopia eletrónica de varrimento (SEM).....	36
3.6.1	Preparação das NPM's para análise após contacto com as suspensões bacterianas	36
4	Resultados e discussão	39
4.1	Caracterização das nanopartículas magnéticas	39
4.1.1	Adsorção de azoto a -196°C	39
4.1.2	Análise termogravimétrica (TGA)	40
4.1.3	Redução a temperatura programada (TPR).....	42

4.1.4	Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	44
4.1.5	Difração de raios-X (XRD).....	46
4.2	Ensaio em reator fechado.....	47
4.2.1	Comparação das nanopartículas magnéticas na remoção bacteriana e ensaios cinéticos de remoção de <i>Escherichia coli</i>	47
4.2.2	Influência da concentração das nanopartículas magnéticas na remoção bacteriana.....	53
4.2.3	Comparação dos resultados obtidos para <i>Escherichia coli</i> (gram-negativa) com <i>Staphylococcus aureus</i> (gram-positiva)	55
4.3	Ensaio em contínuo	57
4.4	Ensaio de lixiviação das nanopartículas magnéticas	60
4.5	Enumeração das células vivas e mortas - análises com o kit live/dead	61
4.5.1	Ensaio com a suspensão bacteriana de <i>E.coli</i>	61
4.5.2	Ensaio com a suspensão bacteriana de <i>S.aureus</i>	64
4.6	Análises de microscopia eletrônica de varrimento (SEM).....	65
5	Conclusão	67
6	Perspetivas futuras.....	69
	Referências bibliográficas	71
	Anexos.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Nanomateriais que são avaliados como funcionais para a purificação da água (Adaptado de [24])	13
Figura 2- Estrutura típica das nanopartículas magnéticas (Adaptado de [42]).....	18
Figura 3- Mecanismos antibacterianos das nanopartículas (Adaptado de [45])	19
Figura 4- Esquema representativo do procedimento utilizado para a síntese de partículas revestidas com material de carbono por CVD	24
Figura 5- Esquema representativo do procedimento utilizado para a síntese de partículas revestidas com material de carbono dopado com azoto por CVD	24
Figura 6- Esquema representativo dos ensaios realizados em reator fechado	28
Figura 7- Esquema representativo dos ensaios realizados em reator fechado numa segunda fase....	29
Figura 8- Instalação utilizada para a realização dos ensaios em contínuo: (A) Suspensão bacteriana antes do tratamento, (B) Bomba peristáltica, (C) Reator, (D) Suspensão bacteriana após o tratamento	33
Figura 9-Termográficos das nanopartículas magnéticas de (A) FeO, FeO/CNT, C-FeO@CVD750, N-C-FeO@CVD750 e CNT (B) 5% Ag/FeO, 5% Ag/CNT e CNT, (C) CuFeO, CuFeO/CNT e CNT.....	41
Figura 10- Perfil de TPR das nanopartículas magnéticas sintetizadas, (A) FeO, FeO/CNT, C-FeO@CVD750 e N-C-FeO@CVD750, (B) 5% Ag/FeO, (C) CuFeO e CuFeO/CNT	42
Figura 11- Imagens TEM das partículas de (A) FeO, (B) N-C-FeO@CVD750 e (C) C-FeO@CVD750 (D) FeO/CNT	44
Figura 12- Imagens TEM das partículas CuFeO e CuFeO/CNT	45
Figura 13- Imagens TEM das partículas de 5% Ag/FeO.....	45
Figura 14- Perfis XRD das NPM's	46
Figura 15- Cinética de remoção (%) e redução log da <i>Escherichia coli</i> quando em contacto com nanopartículas magnéticas de (A) FeO, (B) FeO/CNT, (C)C-FeO@CVD750 e (D) N-C-FeO@CVD750	48
Figura 16- Cinética de remoção (%) e redução log da <i>E.coli</i> quando em contacto com nanopartículas magnéticas de 5% Ag/FeO.....	50
Figura 17- Cinética de remoção (%) e redução log da <i>Escherichia coli</i> quando em contacto com NPM's de (A) CuFeO, (B) CuFeO/CNT	51
Figura 18- Remoção (%) e redução log de <i>E.coli</i> em função da concentração de NPM's para (A) C-FeO@CVD750, (B) CuFeO/CNT e (C) 5% Ag/FeO.....	53

Figura 19-Resultados da eficiência de remoção bacteriana (%) para os ensaios com a bactéria <i>S.aureus</i>	56
Figura 20- Resultados da redução log para os ensaios com a bactéria <i>S.aureus</i>	56
Figura 21- Ensaio de controlo realizado na ausência de NPM's na coluna	58
Figura 22- Eficiência de remoção (%) e redução log de <i>E.coli</i> para as nanopartículas de (A) C-FeO@CVD750 e (B) CuFeO/CNT no reator em contínuo	58
Figura 23- Eficiência de remoção (%) e redução log de <i>S.aureus</i> para as nanopartículas de (A) C-FeO@CVD750 e (B) CuFeO/CNT no reator em contínuo	59
Figura 24- Eficiência de remoção (%) e redução log de uma suspensão mista (<i>E.coli</i> + <i>S.aureus</i>) para as nanopartículas de CuFeO/CNT em reator contínuo para tempos de contacto de (A) 1 min e (B) 30 s	59
Figura 25- Imagens obtidas no microscópio de fluorescência para a suspensão bacteriana de <i>E.coli</i> antes (A) e após o tratamento com nanopartículas magnéticas de C-FeO@CVD750	62
Figura 26- Imagens obtidas no microscópio de fluorescência para a suspensão bacteriana de <i>E.coli</i> antes (A) e após o tratamento com nanopartículas magnéticas de 5% Ag/FeO	63
Figura 27- Imagens obtidas no microscópio de fluorescência para a suspensão bacteriana de <i>S.aureus</i> antes (A) e após (B) o tratamento com nanopartículas magnéticas de C-FeO@CVD750	64
Figura 28- Imagens obtidas através de análise SEM para as NPM's de C-FeO@CVD750, CuFeO/CNT e 5% Ag/FeO antes do contacto com as suspensões bacterianas	65
Figura 29- Imagens obtidas através de análise SEM para as NPM's de C-FeO@CVD750, CuFeO/CNT e 5% Ag/FeO após o contacto com a suspensão bacteriana de <i>E.coli</i>	65
Figura 30- Imagens obtidas através de análise SEM para as NPM's de C-FeO@CVD750, CuFeO/CNT e 5% Ag/FeO após o contacto com a suspensão bacteriana de <i>S.aureus</i>	66
Figura 31- Placas de PCA com os espalhamentos referentes aos ensaios realizados com as NPM's de 5% Ag/FeO para os ensaios em reator fechado de comparação das nanopartículas magnéticas	A3.1
Figura 32- Placas de PCA com os espalhamentos referentes aos ensaios realizados com as NPM's de 5% Ag/FeO para os ensaios em reator fechado de influência da concentração das nanopartículas magnéticas	A3.2
Figura 33- Placas de PCA com os espalhamentos referentes aos ensaios realizados com as NPM's de 5% Ag/FeO para os ensaios em reator fechado de influência da concentração das nanopartículas magnéticas	A3.2

Figura 34- Suspensões bacterianas após tratamento com as NPM's de C-FeO@CVD750 e CuFeO/CNT em reator contínuo.....	A4.1
--	------

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Microorganismos patogénicos possíveis de encontrar em águas, fontes primárias e doenças associadas à sua ingestão [4]	4
Tabela 2- Síntese das propriedades dos nanomateriais e possíveis aplicações no processo de desinfecção da água [2]	17
Tabela 3- Condições de operação utilizadas para a realização do ensaio de controlo.....	30
Tabela 4- Condições de operação utilizadas para a realização dos ensaios de comparação das várias nanopartículas magnéticas sintetizadas.....	31
Tabela 5- Condições de operação utilizadas para a realização dos ensaios cinéticos com a <i>E.coli</i>	31
Tabela 6- Condições de operação utilizadas para a realização dos ensaios de avaliação da influência da concentração das nanopartículas magnéticas na remoção da <i>E.coli</i>	32
Tabela 7- Condições de operação adotadas para o ensaio com a bactéria gram-negativa <i>S. aureus</i> para cada uma das nanopartículas magnéticas.....	32
Tabela 8- Condições de operação dos ensaios em contínuo	34
Tabela 9- Caracterização textural das nanopartículas magnéticas.....	39
Tabela 10- Constituição das nanopartículas magnéticas	40
Tabela 11- Consumo de hidrogénio nas análises TPR para cada uma das NPM's sintetizadas	43
Tabela 12- Propriedades das NPM's obtidas através da análise XRD	46
Tabela 13- Condições experimentais e NPM's ideais para a remoção bacteriana tendo em conta os resultados obtidos nos ensaios em reator fechado	55
Tabela 14- Resultados de remoção bacteriana e redução log obtidos para as NPM's de C-FeO@CVD750, CuFeO/CNT e 5% Ag/FeO quando em contacto com uma suspensão bacteriana de <i>E.coli</i> e <i>S.aureus</i> (tempo de contacto de 1 min e concentração de NPM's de 50 mg/ml)	57
Tabela 15- Resultados dos ensaios de lixiviação para as NPM's de C-FeO@CVD750 e CuFeO/CNT	61
Tabela 16- Valores de UFC/mL e logarítmicos antes e após o tratamento para os ensaios de comparação de NPM's com <i>E.coli</i> e respetivos desvios médios entre réplicas.....	A1.1
Tabela 17- Valores de UFC/mL e logarítmicos antes e após o tratamento para os ensaios de cinética com <i>E.coli</i>	A1.1
Tabela 18- Desvios médios entre réplicas para os ensaios cinéticos com a suspensão bacteriana de <i>E.coli</i>	A1.2
Tabela 19- Valores de UFC/mL e logarítmicos antes e após o tratamento para os ensaios de influência de concentração de NPM's.....	A1.2

Tabela 20 - Desvios médios entre réplicas para os ensaios de influência de concentração de NPM's com a suspensão bacteriana de <i>E.coli</i>	A1.3
Tabela 21- Valores de UFC/mL e logarítmicos antes e após o tratamento para os ensaios com <i>S.aureus</i>	A1.3
Tabela 22 - Valores de UFC/mL e logarítmicos antes e após o tratamento para os ensaios em contínuo	A1.4

NOMENCLATURA

ADN	Ácido desoxirribonucleico
C-FeO@CVD750	Nanopartículas magnéticas de Fe_2O_3 revestidas com material de carbono por CVD
CNT	Nanotubos de carbono
CuFeO	Nanopartículas magnéticas de CuFe_2O_4
CuFeO/CNT	Nanopartículas magnéticas de CuFe_2O_4 com nanotubos de carbono
CVD	Deposição química em fase vapor (do inglês chemical vapour deposition)
EDS	Dispersão em energia (do inglês Energy Dispersive Spectroscopy)
FeO	Nanopartículas magnéticas de Fe_2O_3
FeO/CNT	Nanopartículas magnéticas de Fe_2O_3 com nanotubos de carbono
M	Molaridade
N-C-FeO@CVD750	Nanopartículas magnéticas de Fe_2O_3 revestidas com material de carbono dopado com azoto por CVD
NPM's	Nanopartículas magnéticas
PCA	Agar padrão (do inglês Plate Count Agar)
rpm	Rotações por minuto
S_{BET}	Área específica superficial BET (Braunner, Emmett, Teller)
SEM	Microscopia eletrónica de varrimento (do inglês Scanning Electron Microscopy)
STEM	Microscopia eletrónica de varrimento por transmissão (do inglês Scanning Transmission Electron Microscopy)
TGA	Análise Termogravimétrica (do inglês Thermogravimetric analysis)

TPR	Redução a temperatura programada (do inglês Temperature programmed reduction)
UFC's	Unidades Formadoras de Colónias
XRD	Difração de raios-X (do inglês X-ray diffraction)
5% Ag/FeO	Nanopartículas magnéticas de AgFe_2O_3 com um teor de prata de 5% (%m)
5% Ag/CNT	5% (%m) Prata suportada em nanotubos de carbono

NOTA DA EMPRESA – BOSCH TERMOTECNOLOGIA S.A.

Sob a designação de Vulcano Termodomésticos S.A., a Bosch Termotecnologia S.A. iniciou a sua atividade em Cacia (Aveiro), no dia 17 de março de 1977, com base num contrato de licenciamento com a Robert Bosch, para a transferência da tecnologia utilizada pela empresa alemã no fabrico de esquentadores.

Em 1988, a empresa foi adquirida pelo Grupo Bosch, que transferiu para Portugal competências e equipamentos, iniciando um processo de especialização dentro do Grupo.

Líder do mercado europeu desde 1992, e terceiro produtor mundial de esquentadores, a Bosch Termotecnologia SA é hoje o centro de competência da Robert Bosch para este produto, competindo-lhe a conceção e o desenvolvimento de novos aparelhos bem como, a sua produção e comercialização.

Beneficiando de sinergias no desenvolvimento de aparelhos de queima a gás, a Bosch Termotecnologia iniciou em 1996 a produção de caldeiras murais a gás e em 2011 a produção de bombas de calor para uso doméstico.

O último passo no alargamento da gama de produtos produzidos em Aveiro, deu-se em 2016, com a produção de aparelhos elétricos para aquecimento de água.

Presente em 55 países e diversos mercados, desde a Europa até à Austrália, a Bosch Termotecnologia produz uma variada gama de modelos que são comercializados internacionalmente através de marcas próprias do Grupo (Bosch, Buderus, Junkers, Leblanc, Vulcano) ou de clientes.

Ao longo dos últimos anos a empresa introduziu no mercado mundial de esquentadores inúmeras inovações, como os aparelhos com ignição automática, esquentadores de elevada potência, o controlo remoto Celsius e a tecnologia de condensação. Produtos e componentes inovadores que se tornaram pontos de referência e que estimulam as vendas e reforçam a notoriedade dos seus produtos no mercado.

Além destes produtos inovadores que têm vindo a receber ao longo dos últimos anos inúmeros prémios nacionais e internacionais e que vêm comprovar o seu nível de excelência, a empresa melhora continuamente os seus próprios processos com o forte apoio e a participação de todos os seus colaboradores, sendo hoje reconhecida como uma das melhores empresas para trabalhar em Portugal.

As instalações de Aveiro e Lisboa encontram-se dentro do âmbito da certificação ISO 14001. O registo EMAS abrange apenas as instalações de Aveiro.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ENQUADRAMENTO

Água é o recurso mais essencial para a existência de vida na Terra. A existência de um meio de acesso fiável a água limpa é considerada uma das mais básicas metas humanitárias e continua a ser um dos maiores desafios do século 21 [1].

O crescimento populacional, as alterações climáticas e a crescente industrialização revelaram-se as principais causas associadas à escassez de água potável no planeta tornando-se necessário a implementação de novas e mais avançadas tecnologias de tratamento de água com o objetivo de garantir uma maior oferta de água potável e reduzir a poluição da mesma. Nos países em desenvolvimento, este tipo de infraestruturas são escassas ou quase inexistentes pelo que a implementação de novas tecnologias com uma boa relação custo-benefício é de extrema importância [1,2].

São vários os problemas associados à falta de água apropriada para o consumo humano. Estima-se que cerca de 2.6 mil milhões de habitantes não possuem ou possuem poucos meios de saneamento e escasso acesso a água potável e cerca de 1,1 mil milhões de pessoas bebem água que não é própria para consumo. Milhões de pessoas morrem anualmente devido a doenças associadas à má qualidade da água de consumo [3]. Estima-se que 99,8 % das mortes em países em desenvolvimento se devem a problemas nas redes de saneamento e má qualidade de água sendo que 90 % das vítimas são crianças [4].

Em termos gerais, os maiores riscos microbianos estão associados à ingestão de água contaminada com fezes humanas e animais, que possuem microorganismos patogénicos, sendo estes os principais responsáveis pelo desenvolvimento de doenças associadas ao sistema digestivo [4,5]. São vários os tipos de microorganismos que é possível encontrar nas águas e que apresentam, mesmo em baixas concentrações, risco para a saúde humana podendo o contacto

com este tipo de microorganismos desenvolver pseudo-infecções ou doenças dependendo da dose infecciosa mínima associada a cada um [4,6].

Na Tabela 1 encontram-se descritos alguns dos microorganismos patogénicos que é possível encontrar em águas provenientes de regiões em desenvolvimento, fontes primárias e respetivas doenças associadas à ingestão desses microorganismos [4].

Tabela 1- Microorganismos patogénicos possíveis de encontrar em águas, fontes primárias e doenças associadas à sua ingestão [4]

Grupo de microorganismo	Microorganismos	Fontes primárias	Doenças associadas
<u>Bactérias</u>	<i>Salmonella typhi</i>	Fezes humanas	Febre tifoide
	<i>Salmonella paratyphi</i>		Febre paratifoide
	<i>Escherichia coli</i>		Gastroenterite
	<i>Vibrio cholera</i>	Fezes humanas e zooplâncton em água doce	Cólera
	<i>Legionella pneumophila</i>	Fontes de água tépida	Doença respiratória aguda
	<i>Leptospira spp.</i>	Urina animal e humana	Leptospirose
<u>Vírus</u>	Vírus da Hepatite A	Fezes humanas	Hepatite infecciosa
	Vírus da Hepatite E		
	Poliovírus		Poliomielite
	Rotavírus		Gastroenterite
<u>Protozoários</u>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Fezes humanas	Meningoencefalite amebiana
	<i>Balantidium coli</i>	Fezes humanas e de animais	Balantidiose
	<i>Entamoeba histolytica</i>	Fezes humanas e de animais	Disenteria amebica
	<i>Giardia lamblia</i>	Fezes animais	Giardíase
<u>Vermes</u>	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Fezes humanas e de animais	Ascariíase

Apesar de o tratamento de água para consumo humano ser um fator relevante, independentemente dos fatores económicos e geográficos de cada país, problemas associados a doenças intestinais nos países em desenvolvimento revelam-se uma maior preocupação nos dias de hoje tendo em conta a falta de cuidados médicos que existem nestas regiões fazendo com que uma simples infeção possa ser fatal [6].

A desinfecção da água torna-se, assim, uma etapa indispensável no tratamento de água para consumo humano [7]. O termo “desinfecção” refere-se ao processo de destruição/inativação de microorganismos patogénicos que se encontrem na água e sejam suscetíveis de causar impactos negativos na saúde humana ou levem ao desenvolvimento e propagação de outros microorganismos patogénicos indesejáveis [8–10]. Muitas vezes, este processo encontra-se associado à destruição completa de todas as formas vivas presentes na água (esterilização) embora o processo em si não implique a chegada a esse extremo [11].

São várias as tecnologias existentes para a desinfecção de água e, atualmente, a eficácia das mesmas é avaliada segundo a eficiência de remoção de microorganismos utilizando-se como indicador a bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) que é o tipo de bactéria mais vulgarmente encontrada nas fezes de animais de sangue quente e alguns répteis [4,7]. Ao longo dos anos foram desenvolvidas e melhoradas diferentes técnicas para a desinfecção de águas para o consumo humano sendo um dos principais objetivos a prevenção da reprodução dos microorganismos patogénicos e a sua morte de forma a serem eliminados de forma definitiva do curso de água [12].

1.2 OBJETIVOS DO TRABALHO REALIZADO

Face à problemática anteriormente descrita, e impulsionados pelo desenvolvimento de uma tecnologia de desinfecção de água eficiente, limpa e com uma boa relação custo-benefício a Bosch Termotecnologia, em parceria com o LSRE-LCM e LEPABE, propôs o desenvolvimento de uma tecnologia de desinfecção de água por aplicação de nanopartículas magnéticas e materiais de carbono.

O trabalho realizado no âmbito da presente dissertação é uma continuação de estudos realizados anteriormente e pretende aumentar o desenvolvimento desta tecnologia através da aplicação de diferentes nanomateriais que foram reconhecidos como eficientes no processo de desinfecção de água, para a remoção de microorganismos patogénicos.

Neste estudo serão utilizados os nanomateriais (FeO, CuFeO, C-FeO@CVD750 e N-C-FeO@CVD750) que apresentaram melhores eficiências na remoção de diferentes bactérias, nomeadamente *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* mas serão também desenvolvidos novos nanomateriais. Assim, serão sintetizadas diferentes nanopartículas magnéticas tendo na sua base óxidos de ferro às quais foram adicionadas Cu, Ag e CNT e alguns materiais foram revestidos com carbono ou carbono dopado com azoto através da técnica de deposição química em fase de vapor (CVD) com o objetivo de avaliar a sua eficiência de remoção dos microorganismos anteriormente referidos.

Como objetivo final, os nanomateriais magnéticos que se revelarem como mais promissores na remoção bacteriana serão aplicados num sistema com funcionamento em contínuo utilizando um leito fixo de nanopartículas de forma a aproximar as condições de trabalho às condições reais de aplicação, como por exemplo, torneiras.

Esta dissertação encontra-se dividida em 4 partes: estado da arte, materiais e metodologia, resultados e discussão e conclusões. No estado de arte encontra-se uma visão

geral sobre as técnicas de desinfecção de água existentes, fazendo referência às vantagens e desvantagens inerentes a cada uma, e uma abordagem mais específica à aplicação de nanomateriais na desinfecção de água. O capítulo dos materiais e metodologia descreve todos os procedimentos seguidos durante a realização do trabalho experimental. Nos resultados e discussão estão expostos todos os resultados obtidos nos ensaios realizados, as caracterizações dos materiais utilizados e a discussão dos resultados obtidos. Por último, são apresentadas as conclusões retiradas do trabalho realizado e sugestões de trabalho futuro para o desenvolvimento do tema.

2 ESTADO DA ARTE

A desinfecção da água tem sido praticada há milénios embora os princípios do processo não fossem totalmente conhecidos desde o início. Alguns indícios apontam que nos anos 500 a.C. já era recomendado o uso de água fervida na confeção de alimentos e durante um longo período de tempo considerava-se que a transmissão de doenças era através do odor e não estava relacionada com a ação de microrganismos. Desta forma, a desinfecção da água surgiu como uma tentativa de controlar a propagação de doenças através dos odores libertados [8,9].

Avanços tecnológicos levaram ao desenvolvimento de novas técnicas envolvendo processos físicos e químicos para a desinfecção da água. Na sua idealidade, as tecnologias de desinfecção de água devem ser eficazes na eliminação de microrganismos patogénicos sem a adição de agentes tóxicos à água e com uma boa relação custo-benefício sendo de extrema importância o conhecimento das várias técnicas existentes de forma a selecionar a melhor para o tratamento [7,13].

2.1 PROCESSOS DE DESINFEÇÃO QUÍMICA

Os processos de desinfecção química são baseados na introdução de reagentes químicos (desinfetantes) na água de entre os quais se destacam: cloro em estado gasoso (Cl_2), hipoclorito de sódio (NaOCl), hipoclorito de cálcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$), dióxido de cloro (ClO_2) e ozono (O_3) [9, 10].

A eficácia do processo de desinfecção utilizando reagentes químicos depende de vários fatores como o tipo de desinfetante utilizado, a quantidade utilizada, o tipo e quantidade de microorganismos presentes e as características físicas e químicas da água [9]. Quanto mais fortes forem as propriedades de oxidação do desinfetante químico e quanto maior for a dose aplicada, menor será o tempo de contacto necessário para a desinfecção da água. No entanto, tendo em conta que o processo de desinfecção envolve a adição de reagentes químicos à água,

é aconselhável a aplicação da dosagem mínima indispensável de forma a reduzir a formação de subprodutos resultantes do processo de desinfecção [13]. Desta forma, as características necessárias para um bom desinfetante podem ser resumidas nos seguintes pontos [13]:

- Capacidade de destruir/inativar, num período de tempo razoável, os microrganismos patogénicos presentes na água;
- Desinfetante não deve ser tóxico para o ser humano e animais, e quando utilizado na dosagem normal não deve afetar as características físicas da água;
- A aplicação do desinfetante deve apresentar uma boa relação custo-benefício e evitar a formação de subprodutos tóxicos de desinfecção.

De entre todos os agentes desinfetantes acima mencionados, o mais utilizado em processos de recuperação de efluentes é o cloro (Cl_2) devido à confiabilidade do processo de desinfecção, baixos custos de operação e eficácia no tratamento [10]. Este composto, é habitualmente utilizado como desinfetante primário em estações de tratamento de águas, tanto como pré-desinfetante como pós-desinfetante, com o objetivo de inativar microrganismos patogénicos existentes, mas é também utilizado no fornecimento de cloro residual em sistemas de distribuição para controlar o crescimento de microrganismos [11,14].

O cloro é um agente oxidante forte, com uma grande capacidade desinfetante e extremamente reativo que, quando em contacto com a matéria orgânica presente na água, a irá degradar formando uma ampla gama de compostos clorados como os trihalometanos (THM's) e os ácidos haloacéticos (HAA's) que, por serem nocivos para a saúde e serem considerados agentes genotóxicos, têm limites de concentração estabelecidos pela EPA para a sua presença nos ecossistemas [8,9,15]. Os THM's formam-se através da reação dos compostos clorados com compostos orgânicos, como solo e materiais vegetais, e os HAA's formam-se através da combinação do gás de acetileno com vapor de água [15].

Este tipo de subprodutos resultantes da aplicação de cloro para desinfecção da água são um fator de preocupação e nas últimas décadas são vários os estudos focados principalmente na presença de THM's e HAA's na água com o objetivo de encontrar métodos de controlo para a sua formação após a aplicação do processo de desinfecção com cloro [8].

O hipoclorito de sódio (NaOCl) (também conhecido como sendo a forma líquida do reagente cloro) e o hipoclorito de cálcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) são dois outros agentes que podem ser utilizados na desinfecção química da água apresentando eficiências idênticas à desinfecção com o cloro bem como a formação de subprodutos indesejáveis do processo [15].

O hipoclorito de sódio tem vindo a ser utilizado como agente desinfetante e ganhou popularidade nas últimas décadas. Uma das vantagens da utilização deste reagente no processo de desinfecção de água em detrimento do cloro gasoso reside no facto de este ser mais seguro

de manusear que o anterior sendo, no entanto, uma substância perigosa e corrosiva que necessita de cuidados extremos no seu armazenamento e manuseamento [15].

O hipoclorito de cálcio é utilizado em detrimento ao hipoclorito de sódio e comporta-se de forma muito similar a este no processo de desinfecção [15]. Por se encontrar na forma sólida é mais facilmente manuseável que o anterior, no entanto, não oferece vantagens no que diz respeito à eficiência no processo de desinfecção ou formação de subprodutos sendo, também, uma substância corrosiva prejudicial para a saúde humana [15].

A utilização de dióxido de cloro na pré-desinfecção e oxidação da água para consumo humano é um processo que apresenta altas eficiências na desinfecção da água e produz baixas concentrações de subprodutos quando comparado com o método de cloração. No entanto, as dificuldades de manuseamento/armazenamento e o perigo associado a este gás faz com que este não seja considerado uma tecnologia competitiva para a desinfecção com cloro utilizada convencionalmente [15].

A desinfecção de água utilizando ozono é uma tecnologia que tem vindo a ser utilizada durante quase um século desde a sua primeira aplicação numa rede de distribuição de água em Nice, França [15]. O ozono é muitas vezes combinado em diferentes processos com peróxido de hidrogénio ou luz ultravioleta de forma a melhorar a eficiência oxidante e pode ser utilizado nos processos de desinfecção primária, remoção de algas, sabor e odor presente na água, sendo um agente que minimiza a formação de subprodutos de desinfecção muitas vezes associados aos processos de desinfecção com cloro [15].

São várias as vantagens associadas à aplicação de ozono na desinfecção de água destacando-se a grande eficiência na eliminação de bactérias, vírus e protozoários, a baixa formação de subprodutos de desinfecção e, sendo o ozono um elemento considerado perigoso que se forma no próprio local, não é necessário o seu transporte e armazenamento o que facilita a sua utilização [15].

As desvantagens associadas a esta técnica prendem-se com a toxicidade deste gás, exigindo uma monitorização consistente de todo o processo, e o curto período de semi-vida do ozono faz com que seja necessária a adição de um agente desinfetante residual secundário à base de cloro para cumprir os requisitos da EPA de 0,2 ppm de desinfetante residual presente nos sistemas de redes de água potável [13,15].

2.2 PROCESSOS DE DESINFECÇÃO FÍSICA

Os processos de desinfecção físicos baseiam-se na aplicação de diferentes tecnologias que não envolvem a adição de reagentes químicos à água evitando a problemática de formação de subprodutos de desinfecção derivados das técnicas que utilizam cloro. De entre estes métodos destaca-se a utilização de radiação ultravioleta (UV), descargas elétricas na água, cavitação e ultrassons, sendo a primeira a mais económica [7,16].

A utilização de radiação UV como método de desinfecção da água envolve a exposição direta do corpo de água à luz ultravioleta. O efeito germicida deste tipo de energia foi reportado pela primeira vez em 1878 por Downs & Blunt mas, por problemas de confiabilidade na tecnologia e no equipamento, deixou de ser utilizada para efeitos de desinfecção de água. Superados os contratempos encontrados, o método foi ganhando popularidade, principalmente nos países europeus, graças ao seu custo de aplicação que a torna economicamente competitiva em relação método de cloração. As primeiras instalações para o tratamento de água através de radiação ultravioleta na Europa surgiram na Suíça e na Áustria em 1955 e é uma técnica utilizada na desinfecção de água para consumo humano desde 1916 nos Estados Unidos da América [10,16,17].

A inativação de microorganismos, tendo por base a sua exposição a este tipo de radiação, é função da intensidade a que estes são expostos, do comprimento de onda da radiação, tempo de exposição, qualidade da água e tipo de microorganismos. Esta técnica envolve a absorção da radiação UV no espectro germicida (200 - 300 nm) pelos ácidos nucleicos dos microorganismos patogénicos. Esta exposição provoca danos no material genético (ADN e ARN) dos microorganismos levando a danos fotoquímicos prevenindo que estes se propaguem ou se mantenham ativos. O comprimento de onda para o qual o processo atinge a eficiência máxima encontra-se entre 250 e 260 nm sendo que a máxima absorção de radiação pelo material genético dos microorganismos ocorre para um comprimento de onda de 200 nm [16,17]. A eficácia do processo aumenta com a decrescente complexidade dos microorganismos alvo e com o decréscimo da espessura parede celular dos mesmos [18]. As bactérias encontram-se entre os microorganismos com menor resistência quando expostos à luz ultravioleta sendo que a inativação destes microorganismos pode atingir uma eficiência de 99,9% quando expostas a uma dose de radiação na ordem dos 26,4 mWs/cm² [16].

A performance deste processo para a desinfecção de água é proporcionalmente afetada pela absorbância da radiação ultravioleta pela água a ser tratada. As características químicas e microbiológicas da água são os dois fatores que mais afetam a eficiência deste processo. Características microbiológicas incluem o tipo de microorganismos existentes, a fonte de onde

estes provêm, a idade e a densidade. Características químicas prendem-se com a concentração de nitritos, sulfitos, ferro e compostos aromáticos na água [16,17].

A radiação UV utilizada para a inativação de microorganismos é, normalmente, obtida através da utilização de lâmpadas de vapor de mercúrio ionizado de baixa e média pressão que originam o comprimento de onda ótimo para efeitos germicidas. O processo envolve uma lâmpada de descarga elétrica que gera luz, transformando energia elétrica em energia cinética de eletrões. Esta energia é convertida em radiação por um processo de colisão [16].

Como todas as técnicas utilizadas na desinfecção de água existem vantagens e desvantagens associadas à tecnologia. Algumas vantagens inerentes à utilização da radiação UV como técnica de desinfecção são:

- Eficiência na inativação de uma grande variedade de bactérias utilizando doses baixas de desinfetante;
- Mínimos riscos para a saúde humana devido à baixa formação de subprodutos;
- Não necessita da aplicação de nenhum produto químico tóxico pelo que é seguro para os operadores e público;
- Técnica simples e com baixo custo de operação e manutenção [10].

Algumas das desvantagens prendem-se com as dificuldades de aplicação da técnica para águas com matéria dissolvida ou em suspensão pois esta reduz a intensidade de radiação disponível para a eliminação dos microorganismos [10].

Outra tecnologia de desinfecção física da água é a filtração com recurso a membranas que permite uma desinfecção constante e de alta qualidade sendo uma boa alternativa para os processos convencionais de tratamento de água [19].

A utilização de membranas para o tratamento de água permite o aumento da confiabilidade da água tratada pois estas podem ser utilizadas nos pontos de consumo de água (saída das torneiras) com o objetivo de filtrar e purificar a água para tempos de contacto muito reduzidos [19].

Uma membrana sintética é uma fina camada de material orgânico ou inorgânico sintético que funciona como uma interface que separa duas fases e restringe o transporte de diferentes materiais/microorganismos [19].

São vários os processos de separação por membrana capazes de remover materiais com diferentes granulometrias. Destes processos destacam-se a microfiltração (MF) na separação de partículas, ultrafiltração (UF) para a separação de macromoléculas e osmose reversa na separação de componentes iónicos (OR) [19]. As membranas podem ser utilizadas para a retenção de microorganismos sem que ocorra a sua eliminação ou inativação. Um estudo

realizado com o microorganismo *Pseudomonas diminuta* com várias membranas mostrou que o rácio entre o número de microorganismos na zona de alimentação e o número de microorganismos retidos na membrana era maior que 10^{10} para uma membrana de 0,22 μm de diâmetro dos poros e 10^8 para uma membrana de 0,45 μm [19].

No que diz respeito às desvantagens associadas à aplicação de membranas para o tratamento de água para consumo humano o principal problema está associado à colmatção da membrana devido à retenção e possível crescimento dos microrganismos aquando da filtração. Uma forma de controlar este problema seria a aplicação de cloro de forma a complementar o processo de desinfecção. A fraca retenção de espécies mais pequenas, como coloides e vírus, bem como a diminuição do fluxo de água nos pontos de saída são outros problemas associadas à utilização desta tecnologia [19].

2.3 APLICAÇÃO DE NANOMATERIAIS NO TRATAMENTO DE ÁGUAS

Face a todas as problemáticas e desvantagens associadas às técnicas convencionais de desinfecção de água surgiu a necessidade de encontrar novas técnicas mais eficazes e com menos desvantagens associadas à sua aplicação [20].

O desenvolvimento da nanotecnologia, tecnologia que consiste na manipulação deliberada de materiais para uma escala inferior a 100 nm, levou ao desenvolvimento de novos materiais e dispositivos que aproveitam as vantagens associadas a fenómenos que ocorrem exclusivamente a esta escala de comprimento. Os nanomateriais são desenvolvidos através da implementação de nanotecnologia e revelam-se como os mais promissores para a purificação de água [21].

Os nanomateriais são excelentes adsorventes e catalisadores devido à sua elevada área superficial específica e alta reatividade. São materiais com uma forte ação antimicrobiana e, ao contrário dos desinfetantes químicos convencionalmente utilizados, são substâncias relativamente inertes em água pelo que não é expectável a formação de subprodutos de desinfecção que constituem uma das maiores preocupações no que diz respeito ao tratamento de água para consumo humano [20]. Desta forma, quando bem implementados no sistema de tratamento de águas, os nanomateriais são capazes de atingir altos níveis de eficiência podendo ser uma alternativa para a substituição dos métodos de desinfecção convencionais anteriormente referidos [20].

Apesar dos vários avanços na área da nanotecnologia os mecanismos antibacterianos das nanopartículas ainda não são totalmente conhecidos, no entanto, os mais aceites atualmente

incluem a indução das bactérias a stress oxidativo, libertação de iões metálicos e mecanismos não oxidativos [22].

São vários os tipos de nanomateriais desenvolvidos ao longo dos anos destacando-se na desinfecção de água para consumo humano as nanopartículas de óxidos metálicos, nanotubos de carbono, dendrímeros e zeólitos sendo estes os mais capazes de eliminar microorganismos responsáveis pelo desenvolvimento de doenças, remover metais tóxicos e solutos orgânicos e inorgânicos das águas sujeitas a tratamento [23,24]. Na Figura 1 encontra-se esquematizada a estrutura de cada uma das nanopartículas mencionadas.

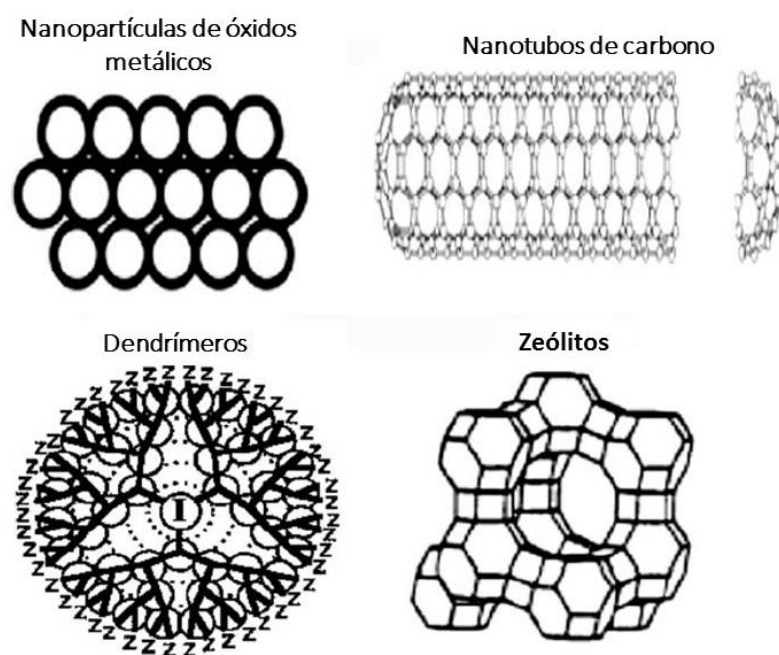


Figura 1- Nanomateriais que são avaliados como funcionais para a purificação da água (Adaptado de [24])

Nanopartículas com nanotubos de carbono

Os nanotubos de carbono (CNT - Carbon Nanotubes) são alótropos de carbono com uma nanoestrutura cilíndrica que possuem uma elevada área superficial específica fazendo com que este tipo de nanomaterial tenha uma grande capacidade de adsorção de diferentes materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos [2,25]. Este material é um dos mais leves e resistentes com uma grande capacidade de condução de calor e eletricidade tendo por isso várias aplicações em diferentes áreas da investigação [26–28].

Os nanotubos de carbono são estruturas hidrofóbicas (têm preferência a não estar em contacto com a água), no entanto, a água é capaz de passar através dos tubos devido a um revestimento no topo de cada um que atrai a água para a abertura do mesmo. Enquanto a água flui rapidamente devido às propriedades hidrofóbicas das paredes do tubo, os poluentes, iões e

sais presentes na água são retidos nos nanotubos o que torna este material tão importante no processo de desinfecção da água e dessalinização [27–29].

Outra das propriedades inerentes às nanopartículas com nanotubos de carbono e que as torna tão eficientes nos processos de desinfecção de água são as suas propriedades antimicrobianas. As ações antibacterianas dos nanotubos de carbono são uma combinação de processos físicos e químicos. Fisicamente os nanotubos de carbono podem causar danos estruturais na membrana celular dos microrganismos danificando a sua forma estrutural. As interações químicas entre os nanotubos de carbono e os microrganismos podem levar à produção de substâncias tóxicas que levam as células a um estado de stress oxidativo provocando a sua morte ou inativação [2,25]. Neste processo de eliminação bacteriana, apesar de existir oxidação química, não são libertados subprodutos tóxicos constituindo uma grande vantagem em relação às técnicas de desinfecção de água convencionais [2,30,31].

Os nanotubos de carbono podem ser implementados numa membrana multifuncional que permite a remoção de contaminantes orgânicos e metais presentes na água. A sua regeneração após utilização faz-se através de ajustes nas suas condições de operação, como a mudança de pH [2,31].

Embora a implementação de nanotubos de carbono para o tratamento de águas tenha grandes vantagens em relação à utilização de carvão ativado, o seu uso a escala industrial, como em grandes estações municipais de tratamento de águas não se revela eficiente devido aos elevados custos de produção dos nanotubos de carbono e da grande quantidade de material necessária para o tratamento ser eficaz [2]. Desta forma, a implementação deste tipo de nanomateriais nos pontos de uso (como torneiras para a saída de água potável) são a aplicação onde o produto se torna mais competitivo, pois são necessárias menores quantidades de material para atingir o objetivo final de remoção bacteriana e de contaminantes altamente degradáveis como antibióticos e fármacos [2].

Dendrímeros

Os dendrímeros ou polímeros dendríticos são moléculas nano-dimensionais, radialmente simétricas de estrutura bem definida e homogênea com um núcleo tipicamente simétrico com invólucro interno e externo podendo ter vários grupos funcionais [32].

Este tipo de nanopartículas têm a particularidade de possuírem inúmeras ramificações que são responsáveis pela sua alta solubilidade e reatividade apresentando potencial para atrair de forma seletiva contaminantes e retê-los na sua estrutura ramificada evitando que eles passem através da membrana [32,33].

São geralmente utilizados para a remoção de poluentes orgânicos e metais pesados. Os compostos orgânicos são adsorvidos pelo interior hidrofóbico do dendrímero enquanto os metais pesados são adsorvidos pelas ramificações exteriores [2].

Este tipo de partículas são reutilizáveis podendo ser recuperadas através de um ajuste de pH, no entanto, devido ao seu complexo processo de síntese, não são comercializados em grande escala sendo por isso pouco aplicado no tratamento de água [2].

Zeólitos

Os zeólitos são estruturas muito porosas com excelentes propriedades de permuta iónica e adsorção que permitem a captação de diferentes espécies presentes em solução aquosa demonstrando assim serem nanopartículas promissoras no campo de desinfecção de água. Estas estruturas possuem uma superfície, maioritariamente com carga negativa, o que permite combinar na sua matriz porosa diferentes nanopartículas conferindo-lhe diferentes capacidades dependendo do objetivo para o qual estas são aplicadas [2,34,35].

Este tipo de nanomateriais podem ser obtidos naturalmente através de extração mineira ou de forma sintética através da modificação de zeólitos naturais por aplicação de diferentes tratamentos químicos e térmicos. Os zeólitos obtidos de forma sintética podem ser produzidos para serem comercializados tendo variadas aplicações como adsorventes em filtros de coluna [34–36].

Uma das modificações mais famosas neste tipo de nanopartículas é a incorporação de iões de prata, técnica que é conhecida e utilizada desde o início dos anos 80 e se mostrou promissora na área de desinfecção de águas contaminadas devido às propriedades antibacterianas da prata que atacam os microrganismos, levando ao fenómeno de plasmólise e tendo o caminho livre para atacar o ADN causando danos na capacidade de replicação do mesmo e, assim, inibir o seu crescimento [2,34,37]. As estruturas do zeólito com os iões de prata ficam agregadas até ao momento em que, em contacto com uma solução aquosa, os iões de prata são libertados da matriz do zeólito podendo ser permutadas com diferentes catiões presentes na solução com a qual estão em contacto [2,38].

Um grande número de parâmetros pode influenciar o processo de permuta iónica na água tais como a condutividade, pH, temperatura, força iónica e a afinidade que o zeólito possui com determinada espécie química pelo que a sua aplicação pode ser mais limitada devido a este fator [34,39]. São consideradas partículas não tóxicas por serem extraídas facilmente do ambiente, no entanto, a sua ecotoxicidade deve ser reavaliada sempre que ocorre qualquer modificação da estrutura [2].

Nanopartículas metálicas incluindo óxidos metálicos

As nanopartículas metálicas são excelentes sorventes devido à sua elevada área superficial e afinidade que podem adquirir com diferentes componentes presentes nas águas dependendo da sua estrutura química [21].

Algumas das nanopartículas sintetizadas com metais ou óxidos metálicos podem ser detentoras de características magnéticas (têm na sua constituição partículas de magnetite (Fe_3O_4)) que facilitam a sua separação e recuperação após utilização de forma simples e económica [2]. Para além disso, este tipo de nanopartículas mostraram resultados positivos no processo de eliminação de microrganismos em águas, sendo possível observar, através de análises de caracterização das partículas por espectroscopia eletrónica de transmissão (TEM), mudanças na integridade da membrana das células dos microrganismos que, na maioria das vezes, resultou na morte da bactéria ou na sua inativação [21,40]. No entanto, a dimensão deste tipo de nanopartículas é um fator fulcral quando se trata da aplicação das mesmas para a desinfecção de água. A toxicidade destas partículas para os microrganismos patogénicos é tanto maior quanto menor a dimensão das mesmas pois, desta forma, as partículas são capazes de invadir as células mais facilmente levando à desintegração da mesma [40,41].

As nanopartículas de prata e de dióxido de titânio fazem parte deste grupo de nanomateriais tendo vindo a demonstrar resultados muito promissores desde o início dos anos 50 onde começaram por ser aplicadas em piscinas com a função de algicidas sendo mais tarde, a partir de 1970, funcionalizados como filtros de água [2].

Uma das particularidades inerentes às nanopartículas de prata prende-se com o seu efeito antibacteriano sendo minimamente prejudiciais para a saúde humana pelo que têm sido amplamente aplicadas em filtros implementados em pontos de saída de água como uma medida de desinfecção de água [2]. A ação antibacteriana das nanopartículas de prata é baseada na libertação contínua de iões prata presentes na estrutura das nanopartículas que interagem com os microrganismos danificando a sua estrutura celular através de stress oxidativo. Após um certo período de operação das nanopartículas, dependendo da espessura e composição da camada de prata, o revestimento, ou mesmo a estrutura completa das nanopartículas, deve ser renovado acarretando, a longo prazo, custos significativos de renovação [2,40].

No que diz respeito às nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2) estas apresentam uma grande estabilidade química o que faz com que tenham um maior tempo de duração do que as partículas de prata, devido ao facto de a estrutura deste tipo de nanopartículas permanecer inalterada durante o processo de degradação dos compostos orgânicos e microrganismos. São nanopartículas economicamente viáveis e que não são tóxicas para os humanos, no entanto,

necessitam de lâmpadas ultravioleta, que consomem uma grande quantidade de energia, para a sua ativação [2].

Uma das desvantagens associadas a todas as nanopartículas, exceto as de dióxido de titânio e as de prata, está relacionada com a não permanência de substâncias antibacterianas (como radicais hidroxilo), presentes nas nanopartículas, na água após a sua remoção. Desta forma, não é possível garantir a qualidade da água e a sua desinfecção após o tempo de contacto, o que seria de extrema importância para dispositivos de armazenamento e distribuição [2].

Tabela 2- Síntese das propriedades dos nanomateriais e possíveis aplicações no processo de desinfecção da água [2]

Nanomaterial	Propriedades	Aplicação
<u>Nanopartículas metálicas e óxidos metálicos</u>	Altos custos de produção Partículas magnéticas resistentes à abrasão Pouco reutilizáveis Fotocatalíticas	Remoção de metais pesados
<u>Nanopartículas com nanotubos de carbono</u>	Elevada área superficial com grande capacidade de adsorção Efeito bactericida Partículas reutilizáveis Altos custos de produção Possibilidade de provocar problemas de saúde	Remoção de contaminantes altamente degradáveis (fármacos, antibióticos, etc.)
<u>Dendrímeros</u>	Bifuncional (parte interna adsorve poluentes orgânicos e parte externa adsorve metais pesados) Partículas reutilizáveis Processo de produção complexo	Remoção de metais pesados e poluentes orgânicos
<u>Zeólitos</u>	Libertação controlada de nanopartículas de prata Efeito bactericida Superfície ativa reduzida através da imobilização de partículas de prata	Processos de desinfecção

2.4 UTILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA DESINFECÇÃO DE ÁGUA

Nanopartículas magnéticas são partículas de granulometria compreendida entre 1 e 100 nm e têm a particularidade de possuírem na sua estrutura minerais magnéticos como ferro, níquel e cobalto que fazem com que elas sejam atraídas por um campo magnético exterior [2,42]. Este fator aliado à área superficial das nanopartículas faz com que sejam estruturas muito eficientes para a adsorção de metais pesados, elementos radioativos e microorganismos, presentes na água e solos contaminados, e que o processo de separação do adsorvente da solução seja simples e rápido devido à existência de um campo magnético que atrai as partículas.

As nanopartículas magnéticas podem ser reutilizadas após a separação quando aplicado o devido tratamento aos contaminantes tóxicos a elas adsorvidos [43].

As nanopartículas magnéticas mais utilizadas são as que incorporam na sua estrutura nanopartículas de ferro zero valente (nZVI) – Fe_3O_4 e Fe_2O_3 – podendo ser sintetizadas segundo vários métodos como co-precipitação, microemulsão, decomposição térmica, deposição de vapor químico, entre outras [44]. A Figura 2 apresenta a estrutura típica das nanopartículas magnéticas.

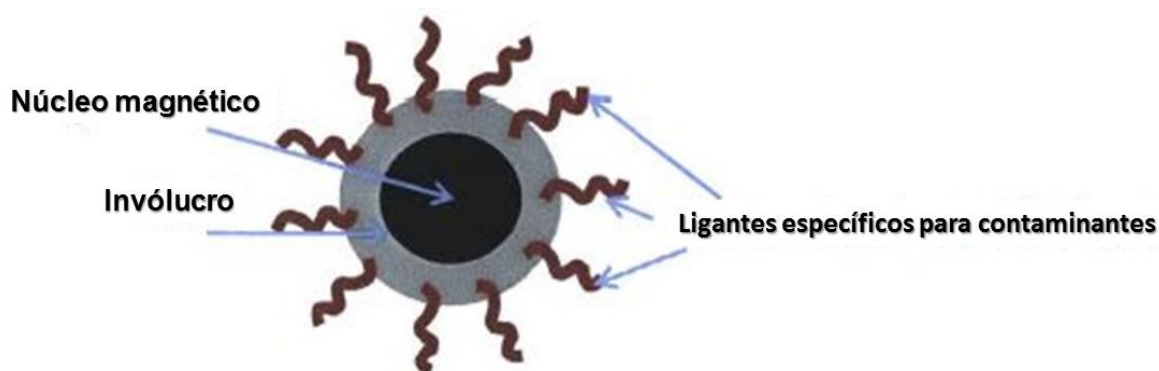


Figura 2- Estrutura típica das nanopartículas magnéticas (Adaptado de [42])

O interesse da utilização das nanopartículas magnéticas para a remoção bacteriana está relacionada com as alterações metabólicas que estas provocam nas bactérias e com a possível funcionalização das mesmas com anticorpos, proteínas, hidratos de carbono ou moléculas orgânicas e inorgânicas compatíveis originando grupos funcionais específicos livres na sua superfície e fornecendo um maior número de sítios ativos que auxiliam numa adsorção mais bem sucedida de iões metálicos e eliminação de microorganismos [43,45]. No entanto, muitas vezes, as biomoléculas que se encontram interligadas às nanopartículas magnéticas possuem mais afinidade para microorganismos específicos fazendo com que estas se tornem mais seletivas e sejam ineficazes na captura de outro tipo de bactérias [46]. Em alguns casos, quando a superfície funcionalizada da nanopartícula magnética entra em contacto com a membrana celular das bactérias, estas podem destruí-la levando à sua morte. A eficiência de eliminação/captura de bactérias utilizando nanopartículas magnéticas funcionalizadas depende do nanomaterial utilizado para adsorver os poluentes e do tempo de contacto entre as nanopartículas e as bactérias que quanto maiores melhor a eficiência [43,47].

Para a ação dos efeitos antibacterianos das NPM's estas necessitam de estar em contacto com as bactérias sendo as formas de contato exercidas através de forças eletrostáticas, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas [45].

Segundo as pesquisas existentes referentes à aplicação de nanopartículas magnéticas para a remoção de bactérias, os principais processos subjacentes aos efeitos antibacterianos estão relacionados com a ruptura da membrana celular da bactéria, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou liberação de íons metálicos, penetração na membrana celular bacteriana e indução de efeitos antibacterianos intracelulares. Assim que ocorre a ruptura da membrana celular da bactéria, levando à alteração da forma e função da mesma comprometendo a sua permeabilidade, as NPM's invadem o citoplasma da mesma interagindo com componentes básicos da célula bacteriana como o ADN, lisossomas, ribossomas e enzimas. Estas interações podem causar stress oxidativo, alterações heterogêneas na célula, inibição enzimática, desativação de proteínas e alterações nos genes de expressão [45]. A Figura 3 apresenta um esquema representativo dos mecanismos de ação das nanopartículas na célula bacteriana.

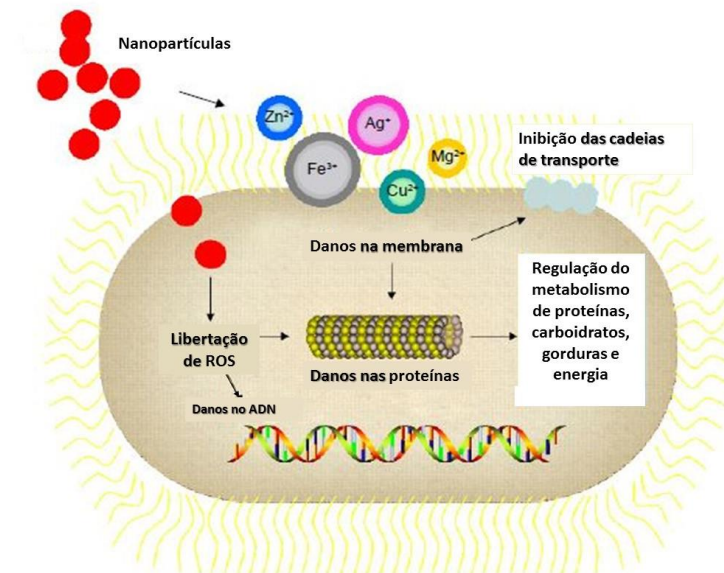


Figura 3- Mecanismos antibacterianos das nanopartículas (Adaptado de [45])

2.5 PARÂMETROS E CONDIÇÕES QUE INFLUENCIAM O TRATAMENTO DE ÁGUA COM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Para obtenção de eficiências de desinfecção de água elevadas aquando da aplicação de nanopartículas magnéticas é necessário controlar os diferentes fatores que podem influenciar o processo.

Estudos no âmbito da aplicação de nanopartículas magnéticas para a desinfecção bacteriana demonstraram que fatores como o pH e a força iónica da solução são fatores importantes no que diz respeito à captura de microorganismos presentes em solução. Vários estudos mostraram que as forças fundamentais para a captura bacteriana estão relacionadas com a carga superficial da mesma, a hidrofobicidade e propriedades, químicas e físicas, da

superfície das bactérias e da sua matriz [48]. As bactérias apresentam uma membrana com carga superficial predominantemente negativa pelo que as interações entre as nanopartículas e os microorganismos são maioritariamente regidas por forças eletrostáticas [47].

Huang et al. [47] demonstraram que a captura de bactérias como a *Escherichia coli* e *Sarcina Lutea* não sofriam alterações com a variação do pH. Por outro lado, para a bactéria *Staphylococcus aureus* o pH ótimo de captura centrava-se entre os 5,0 e os 8,0. Como referido anteriormente, as nanopartículas podem ter uma superfície funcionalizada, possuindo espécies como aminoácidos agregados na sua membrana sendo, desta forma, a captura de bactérias regida através de forças eletrostáticas. O ponto isoelétrico (pi), que se caracteriza pelo valor de pH para o qual apresenta uma carga nula, das nanopartículas magnéticas funcionalizadas com aminoácidos está acima de 9 sendo que quando o pH da solução se encontra abaixo do pi destas nanopartículas elas possuem uma carga superficial positiva que favorece a interação com as bactérias, visto a sua membrana apresentar uma carga superficial predominantemente negativa para um pH superior a 4,5 [43,47].

As bactérias podem ser distinguidas em dois grupos diferentes no que diz respeito à sua parede celular: bactérias gram-positivas e gram-negativas. As bactérias gram-negativas são envolvidas por uma fina camada de peptidoglicano que, por sua vez, é circundada por uma membrana externa. As bactérias gram-positivas possuem uma parede celular espessa de peptidoglicanos, mas não apresentam a membrana celular externa [48,49]. Abdolmaleki et al. [48] demonstrou nos seus estudos que a funcionalização das nanopartículas magnéticas com a poliamida com β -ciclo dextrinas revelaram resultados eficientes na remoção de bactérias gram-positivas (*Bacillus cereus*) e gram-negativas (*E.coli*) sendo a interação entre as NPM's e as bactérias feita através de interações eletrostáticas e hidrofóbicas [48,50].

Huang et al. [47] demonstraram que a eficiência de captura bacteriana aumentou com o aumento da concentração de nanopartículas magnéticas utilizadas sendo que um aumento na concentração de NPM's de 0,1 mg/mL para as bactérias *S.lutea*, *E.coli* e *P.aeruginosa* e de 0,3 mg/mL para a *S.aureus* já mostrava aumentos de eficiência promissores para a remoção das bactérias. O mesmo estudo demonstrou que a eficiência de remoção bacteriana vai atingindo um ponto de estabilização com o aumento da concentração de NPM's. El-Boubbou et al. [51] e Jin et al. [46] demonstraram que a eficiência de remoção bacteriana é tanto mais elevado quanto maior for o tempo de contacto entre estas e as nanopartículas magnéticas utilizando nos ensaios a bactéria *E.coli*. Através destes estudos foi, também, possível demonstrar que a partir de um certo tempo de contacto a eficiência de remoção bacteriana tende a estabilizar sendo que isto acontece para tempos de contacto mais elevados [46].

3 MATERIAIS E METODOLOGIA

3.1 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Com o objetivo de analisar a eficiência de cada material na remoção de bactérias presentes na água desenvolveram-se nanopartículas magnéticas constituídas por diferentes materiais.

3.1.1 Síntese de nanopartículas de Fe_2O_3 (FeO)

Para a preparação das nanopartículas magnéticas de Fe_2O_3 recorreu-se ao método de co-precipitação [42]:

- Preparou-se uma solução de 500 mL de 1,5 M NaOH e uma solução de 50 mL de 2 M HCl;
- Dissolveu-se na solução de HCl 40 mmol de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 20 mmol de $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$;
- Colocou-se a solução de NaOH sob agitação e foi adicionada gota-a-gota a solução anteriormente preparada. Após a mistura das duas soluções formou-se imediatamente um precipitado de cor preta;
- Após a adição da solução de HCl com ferro a agitação foi mantida durante 30 min a uma velocidade de 410 rpm;
- Após o tempo de agitação e com o auxílio de um íman, separou-se o precipitado da solução sendo este lavado com água destilada até que a água de lavagem apresentasse um pH neutro;
- O produto final foi levado à estufa a 100 °C até secar;
- Após a secagem, as partículas foram moídas utilizando um almofariz e pilão;
- Peneirou-se as partículas de forma a terem dimensões entre 0,1 e 0,3 mm.

Este procedimento foi repetido várias vezes de forma a obter uma quantidade de partículas de ferro suficiente para a realização de todos os ensaios.

3.1.2 Síntese de nanopartículas de CuFe_2O_4 (CuFeO)

A preparação de nanopartículas magnéticas de CuFe_2O_4 foi realizada através do método da co-precipitação [42]:

- Preparou-se uma solução de 400 mL de 3 M NaOH e uma solução de 10 mL de 0,5 M HCl;
- Colocou-se a solução de NaOH em agitação e aqueceu-se até 100 °C;
- Dissolveu-se 40 mmol de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 80 mL de água destilada e 20 mmol de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ na solução de HCl previamente preparada;
- Aqueceram-se as duas soluções anteriores até uma temperatura de 50 °C e, posteriormente, foram misturadas;
- Adicionou-se a solução obtida anteriormente à solução de NaOH e deixou-se em agitação durante 2 h a 100 °C;
- A solução foi deixada a arrefecer até a temperatura ambiente e, de seguida, com o auxílio de um ímã, procedeu-se à lavagem das partículas até a água de lavagem apresentar um pH próximo da neutralidade;
- O produto final foi levado à estufa a 100 °C até secar;
- Após a secagem, as partículas foram moídas utilizando um almofariz e pilão;
- Peneirou-se as partículas de forma a terem dimensões entre 0,1 e 0,3 mm.

O procedimento foi repetido várias vezes de forma a obter uma quantidade de partículas de cobre suficiente para a realização de todos os ensaios.

3.1.3 Síntese de nanopartículas de prata (5% Ag/FeO)

A preparação das nanopartículas de 5% Ag/FeO foram realizadas através do método de impregnação incipiente.

- Pesou-se 1 g de FeO (preparado na secção 3.1.1) para um matraz e 0,083 g de AgNO_3 para um frasco de vidro de 5 mL;
- Adicionou-se 0,5 mL de H_2O ao frasco que contem a prata e colocou-se no ultrassom por alguns segundos com o objetivo de dissolver a massa de prata existente;
- Colocou-se o matraz em vácuo durante 10 min com o objetivo de dispersar o material;

- Através de uma bomba peristáltica fez-se passar a solução de prata existente no frasco para o matraz;
- Adicionou-se, periodicamente, cerca de 0,5 mL de H₂O até a massa de FeO presente no matraz ficar molhada;
- Deixou-se o matraz no ultrassom durante 90 min;
- A amostra foi colocada na estufa a 100 °C até secar;
- As partículas obtidas foram tratadas termicamente utilizando as seguintes condições: Q_{N₂}=50 cm³/min, duração de 2 h, temperatura de 200 °C e rampa de aquecimento de 10 °C/min.

3.1.4 Síntese de nanopartículas de Fe₂O₃ revestidas com material de carbono por CVD (C-FeO@CVD750)

Este procedimento de revestimento de carbono utilizando a técnica de deposição química em fase vapor (Chemical Vapour Deposition – CVD) foi realizado para as NPM's de FeO anteriormente preparadas (3.1.1) utilizando partículas com uma granulometria inferior a 0,1 mm.

Numa primeira fase de aplicação da técnica, a amostra (1 g de material) foi aquecida até uma temperatura de 400 °C com uma corrente gasosa de hidrogénio (H₂) e azoto (N₂) com uma rampa de aquecimento de 5 °C/min sendo que o caudal de ambos os gases foi de 20 cm³/min. Após atingir os 400 °C a temperatura permaneceu neste patamar durante 2 h.

Numa segunda fase, a amostra foi aquecida até aos 750 °C mantendo a rampa de aquecimento. Quando a temperatura pretendida foi atingida as correntes gasosas foram substituídas por hidrogénio (H₂) com um caudal de 10 cm³/min e etano (C₂H₆) com um caudal de 25 cm³/min permanecendo 2 h nesta temperatura.

No final, procedeu-se ao arrefecimento do material usando uma corrente de azoto com um caudal de 50 cm³/min.

O esquema representativo do procedimento anteriormente referido encontra-se na Figura 4.

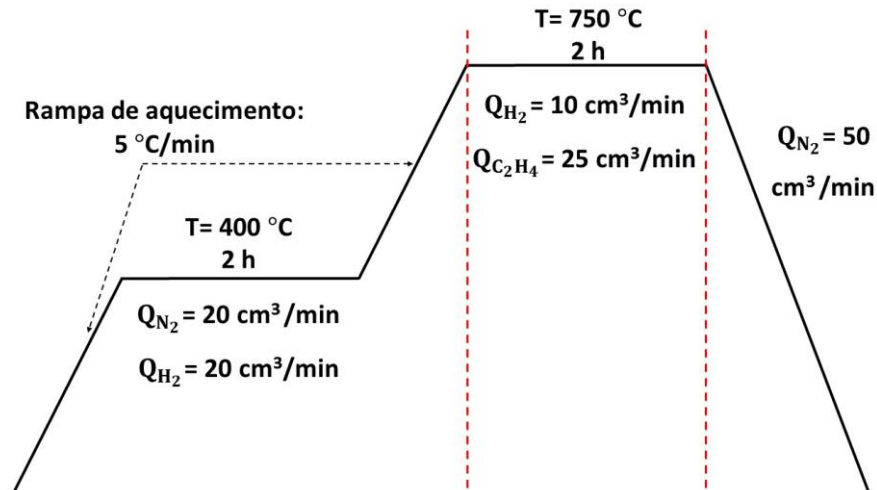


Figura 4- Esquema representativo do procedimento utilizado para a síntese de partículas revestidas com material de carbono por CVD

3.1.5 Síntese de nanopartículas de Fe_2O_3 revestidas com material de carbono dopado com azoto por CVD (N-C-FeO@CVD750)

Este procedimento foi realizado através da técnica de deposição química em fase de vapor (CVD) para as nanopartículas de FeO inicialmente preparadas utilizando partículas com uma granulometria inferior a 0,1 mm.

O procedimento experimental para o revestimento das partículas com material de carbono dopado com azoto é idêntico ao apresentado na secção 3.1.4 sendo que a única diferença encontra-se na segunda fase do tratamento (para uma temperatura de 750 °C) onde foi utilizado um caudal de 10 cm³/min de NH_4 em detrimento do H_2 .

O esquema representativo do procedimento seguido encontra-se na Figura 5.

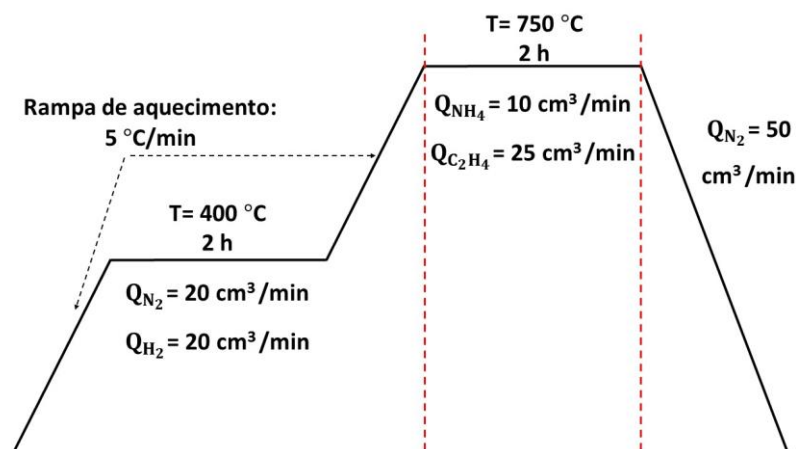


Figura 5- Esquema representativo do procedimento utilizado para a síntese de partículas revestidas com material de carbono dopado com azoto por CVD

3.1.6 Síntese de nanopartículas de Fe_2O_3 com nanotubos de carbono (FeO/CNT)

O procedimento de síntese destas partículas é idêntico ao apresentado na secção 3.1.1 sendo a única diferença a introdução de 1 g de nanotubos de carbono comerciais (Nanocyl 3100) (CNT) na solução de HCl com os precursores de ferro e posterior mistura.

3.1.7 Síntese de nanopartículas de CuFe_2O_4 com nanotubos de carbono (CuFeO/CNT)

A síntese destas nanopartículas segue o procedimento apresentado na secção 3.1.2 sendo a única diferença a introdução de 1 g de nanotubos de carbono (Nanocyl 3100) logo após misturar as duas soluções de ferro e cobre previamente aquecidas até 50 °C.

3.1.8 Síntese de nanopartículas de prata com nanotubos de carbono (5% Ag/CNT)

A síntese destas nanopartículas segue o procedimento apresentado na secção 3.1.3 sendo a única diferença a utilização de 1 g de nanotubos de carbono em detrimento das partículas de FeO utilizadas inicialmente, pelo que estas partículas não serão magnéticas.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Todas as nanopartículas magnéticas sintetizadas anteriormente foram sujeitas a diferentes análises com o objetivo de as caracterizar e conhecer as suas propriedades e para avaliar de que forma essas características podem influenciar os resultados de remoção bacteriana.

3.2.1 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica tem como objetivo a avaliação das propriedades térmicas dos vários materiais em função da temperatura tendo em conta a variação da massa dos mesmos.

Esta análise foi realizada para todas as nanopartículas magnéticas sintetizadas anteriormente com recurso ao analisador térmico Netzsch STA 409 Luxx® e a aquisição de resultados foi feita através do software Proteus Thermal Analysis. Para a realização das análises foi utilizado um caudal de azoto (N_2) com uma rampa de 10 °C/min e uma gama de temperaturas de 50 a 900 °C. A análise compreende ainda dois passos isotérmicos a 900 °C: 7 min com uma corrente de azoto (N_2) e 13 min com uma corrente de ar.

3.2.2 Adsorção de azoto a -196 °C

A caracterização textural dos materiais foi determinada a partir das isotérmicas de equilíbrio de adsorção de azoto (N_2) a -196 °C. As isotérmicas foram realizadas no equipamento *Quantachrome NOVA 4200e*.

Para a realização desta análise foram pesados 100 mg de amostra de cada material anteriormente sintetizado. De seguida, a amostra foi introduzida no equipamento durante 3 h a 150 °C para ser desgaseificada. A massa da amostra foi calculada através da diferença entre a massa total da amostra e da célula depois e antes da desgaseificação.

As células com as amostras foram colocadas num banho contendo azoto líquido. As áreas superficiais específicas (S_{BET}) dos materiais foram calculadas numa gama de pressão relativa entre 0,05 e 0,3 pelo método BET e o volume de poros da amostra foi obtido para $P/P_0=0,95$.

3.2.3 Redução a temperatura programada (TPR)

As análises de redução a temperatura programada (TPR) foram realizadas com recurso ao equipamento AMI-200 (*Altamira Instruments*) sendo aquecida 100 mg de uma amostra com uma rampa de 5 °C/min até aos 700 °C utilizando um caudal de 5% (v/v) de H_2 diluído em argon (caudal total de 30 cm³/min).

Estes ensaios foram realizados com o objetivo de determinar o estado de redução dos metais em estudo através da monitorização contínua das reações de redução consecutivas das espécies com a variação da temperatura.

3.2.4 Microscopia eletrónica de transmissão (TEM)

As análises de microscopia eletrónica de transmissão foram realizadas com o objetivo de obter informações relativamente à estrutura das nanopartículas magnéticas sintetizadas.

As imagens obtidas foram realizadas na Unidade de Microscopia Eletrónica da Universidade de Trás os Montes e Alto Douro com recurso ao microscópio *LEO 906E* a operar com uma tensão de aceleração de 120 kV.

3.2.5 Difração de raios-X (XRD)

A análise de difração de raios-X é uma técnica utilizada para estudar a estrutura cristalina dos materiais.

A análise foi realizada na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, num difractómetro PANalytical X'Pert PRO com fonte de radiação Cu Ka ($\lambda = 1,54 \text{ nm}$). A intensidade de voltagem utilizada foi de 50 kV e intensidade de corrente de 40 mA. Os resultados foram recolhidos na gama de 2θ entre 10° e 90° com uma velocidade de $0,017^\circ \text{ s}^{-1}$.

3.3 REMOÇÃO DE CÉLULAS BACTERIANAS - ENSAIOS EM REATOR FECHADO

Os ensaios em reator fechado foram realizados com o objetivo de averiguar a eficiência de cada um dos nanomateriais sintetizados na remoção de células bacterianas em suspensão. As bactérias utilizadas nos ensaios foram a *Escherichia coli* (DSM 1103) e *Staphylococcus aureus* (DSM 1104).

Numa primeira fase foram realizados vários ensaios, em reator fechado, com a bactéria *E.coli* de forma a avaliar a eficiência de cada tipo de nanopartícula na remoção deste tipo de bactérias tendo em conta diferentes condições de operação. Posteriormente, os resultados obtidos para a bactéria *E. coli* (gram-negativa) foram comparados com os obtidos para a bactéria *S.aureus* (gram-positiva).

3.3.1 Preparação das suspensões bacterianas

As estirpes de *E.coli* e *S.aureus* foram cultivadas em meio sólido Plate Count Agar (PCA) sendo as condições de incubação de 20 h a 30°C e 24 h a 37°C , respetivamente.

Após o período de incubação, foram preparadas as suspensões em solução salina estéril (0,85 % NaCl) com densidades celulares de 10^8 UFC/mL correspondentes a valores de densidade ótica de, aproximadamente, 0,1 (para um comprimento de onda de 610 nm) para a *E.coli* e de 0,13 (para um comprimento de onda de 600 nm) para a *S.aureus*.

De seguida, foram realizadas diluições seriadas de 10 de modo a obter uma suspensão bacteriana com uma densidade de 10^6 UFC/mL . Sendo este o valor padrão indicado para os ensaios de desinfecção bacteriana, os ensaios laboratoriais foram realizados com estas suspensões.

3.3.2 Ensaio em reator fechado

Para a realização dos ensaios em reator fechado todo o material foi previamente autoclavado de modo a evitar qualquer tipo de contaminação ou erro nos resultados obtidos.

As partículas foram esterilizadas antes da realização dos ensaios com as suspensões bacterianas, sendo colocadas, dentro de Erlenmeyers de 100 mL, numa estufa a 160 °C durante 1 h.

Tendo como base a suspensão bacteriana de densidade 10^6 UFC/mL, como descrito acima, foram adicionados 10 mL da suspensão ao Erlenmeyer que continha as NPM's estéreis. O Erlenmeyer foi colocado em agitação orbital a 150 rpm sem qualquer contacto com a luz exterior.

De modo a ser possível quantificar o número de UFC/mL após cada um dos ensaios realizados, 1 mL de suspensão foi retirado do Erlenmeyer. Durante este procedimento usou-se um íman para separar as partículas magnéticas da suspensão.

Seguidamente foram efetuadas diluições seriadas da amostra, utilizando tubos de ensaio com 9 mL de salina estéril (NaCl 0,85 %). Estas diluições foram necessárias para que fosse possível a contagem de unidades formadoras de colónias nas placas de espalhamento e desta forma averiguar se houve remoção das bactérias pelos nanomateriais ou não. Por norma, para que seja contável, o número de unidades formadoras de colónias deve estar entre 20 e 300 UFC's. Desta forma, foram realizados espalhamentos em triplicado em placas com o meio PCA para as 4 diluições obtidas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) correspondentes, caso não tivesse ocorrido nenhuma remoção, a densidades celulares de 10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2 UFC/mL.

Como ensaio de controlo foi utilizada a mesma suspensão bacteriana na ausência de nanopartículas magnéticas. Neste caso apenas foram efetuados espalhamentos em placas de meio PCA das últimas 3 diluições.

A Figura 6 representa o esquema correspondente ao procedimento utilizado para a realização dos ensaios em reator fechado.

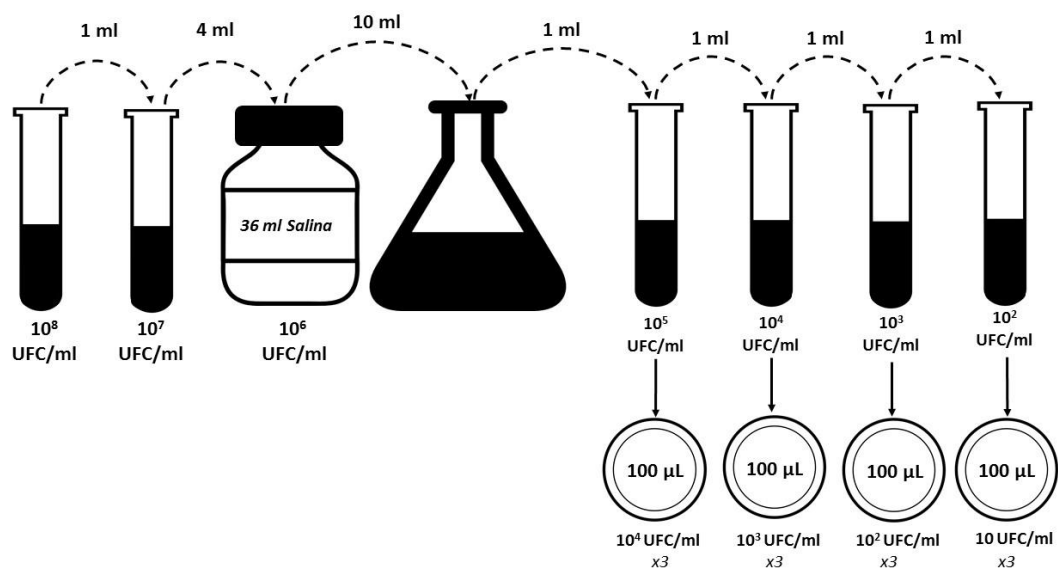


Figura 6- Esquema representativo dos ensaios realizados em reator fechado

Depois da realização dos primeiros ensaios foi possível observar a presença de algumas incoerências nos resultados no que diz respeito ao número de colônias contáveis nas placas pelo que o procedimento representado na figura anterior foi substituído pelo que se encontra esquematizado na Figura 7 com o objetivo de realizar o espalhamento de suspensão retirada diretamente do Erlenmeyer onde se encontravam em contacto direto com as nanopartículas magnéticas.

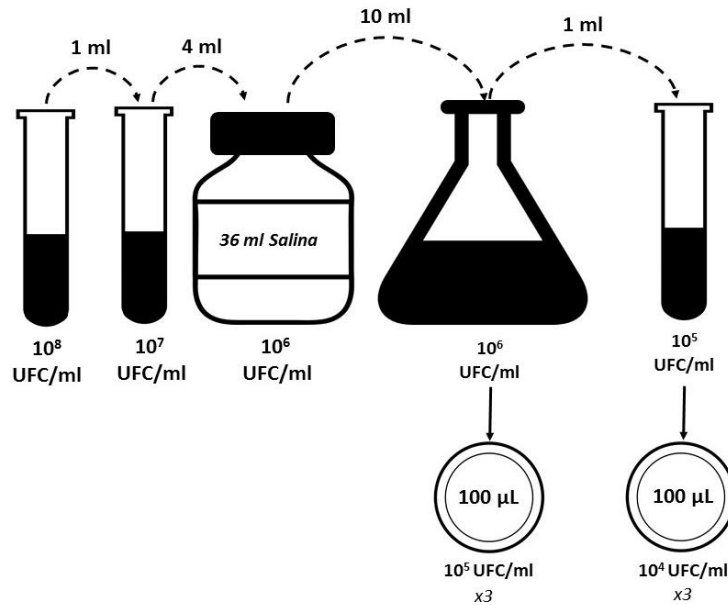


Figura 7- Esquema representativo dos ensaios realizados em reator fechado numa segunda fase

A eficiência de remoção das bactérias da suspensão após tratamento com as NPM's foi calculada com recurso à seguinte equação:

$$\text{Eficiência de remoção das bactérias (\%)} = \frac{\frac{UFC_{Inicial}}{ml} - \frac{UFC_{Final}}{ml}}{\frac{UFC_{Inicial}}{ml}} \times 100$$

Para calcular a redução logarítmica das bactérias após o tratamento com as NPM's utilizou-se a seguinte equação:

$$\text{Redução log} = \log_{Inicial} \left(\frac{UFC}{ml} \right) - \log_{Final} \left(\frac{UFC}{ml} \right)$$

A redução logarítmica é o termo utilizado para descrever a metodologia quantitativa de redução na contagem microbiana resultante de um processo aplicado à suspensão microbiana que pode, ou não, inibir o seu crescimento.

Para o caso específico do presente trabalho, como se pretendia avaliar a capacidade de desinfecção bacteriana das NPM's sintetizadas, a suspensão bacteriana inicial utilizada tinha um

valor logarítmico de 6,0. Para esta função, as melhores NPM's serão aquelas onde ocorrer maior redução bacteriana após contacto com a suspensão. Assim, o valor ideal de log final será o mais próximo de zero possível. Desta forma, quanto maior for o valor de redução log obtido maior será a eficiência de remoção bacteriana alcançada pelas nanopartículas magnéticas pois significa que o valor obtido para log final é baixo e que a remoção bacteriana após o tratamento foi significativa.

Note-se que devido à técnica usada, onde o limite de detecção é de 10 UFC/mL, uma eficiência de remoção bacteriana de 100 % não corresponde, necessariamente, a uma redução log máxima (6 log). Por essa razão, é importante avaliar os resultados obtidos tendo em conta os valores de redução log.

3.3.3 Parâmetros testados

3.3.3.1 Ensaio de controlo

O ensaio de controlo foi realizado tendo em conta o procedimento representado na Figura 6 sem a introdução das nanopartículas magnéticas no Erlenmeyer.

A realização deste ensaio de controlo teve como objetivo a obtenção de uma amostra de bactérias sujeitas às condições do reator fechado sem entrarem em contacto com as nanopartículas que as possam eliminar. Este ensaio foi utilizado para a comparação do número de UFC/mL antes e após o tratamento com as mesmas.

As condições utilizadas encontram-se representadas na Tabela 3.

Tabela 3- Condições de operação utilizadas para a realização do ensaio de controlo

Parâmetros	Condições de operação utilizadas
<u>Bactéria</u>	<i>Escherichia coli</i>
<u>Tipo de agitação</u>	Orbital a 150 rpm
<u>Tempo de agitação</u>	15 min

3.3.3.2 Comparação das nanopartículas magnéticas na remoção das bactérias

Para comparar a eficiência de cada uma das nanopartículas magnéticas na remoção bacteriana foi utilizada, em ensaios independentes, a mesma massa de cada uma das nanopartículas nas condições apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4- Condições de operação utilizadas para a realização dos ensaios de comparação das várias nanopartículas magnéticas sintetizadas

Parâmetros	Condições de operação utilizadas
<u>Bactéria</u>	<i>Escherichia coli</i>
<u>Tipo de agitação</u>	Orbital a 150 rpm
<u>Tempo de agitação</u>	15 min
<u>NPM's</u>	FeO CuFeO 5% Ag/FeO C-FeO@CVD750 FeO/CNT CuFeO/CNT N-C-FeO@CVD750 5% Ag/CNT
<u>Concentração de NPM'S</u>	12 mg/mL

3.3.3.3 Ensaio cinéticos de remoção da *Escherichia coli*

A realização deste ensaio teve como objetivo determinar o comportamento das nanopartículas magnéticas em contacto com a *E.coli* ao longo do tempo avaliando a eficiência com que estas eliminam as bactérias para tempos de contacto mais reduzidos.

Para a realização destes ensaios foram utilizadas todas as nanopartículas magnéticas com o objetivo de averiguar quais as mais eficientes na remoção bacteriana para o menor tempo de contacto possível com a suspensão tendo em conta os ensaios em funcionamento em contínuo. Foram realizados ensaios em duplicado para todas as nanopartículas e, através dos resultados obtidos, selecionaram-se aquelas que apresentaram resultados mais promissores para realizar um ensaio em triplicado.

As condições de operação aplicadas encontram-se descritas na Tabela 5 e o ensaio de controlo foi realizado para um tempo de agitação de 10 min nas mesmas condições que os ensaios realizados com as partículas.

Tabela 5- Condições de operação utilizadas para a realização dos ensaios cinéticos com a *E.coli*

Parâmetros	Condições de operação utilizadas
<u>Bactéria</u>	<i>Escherichia coli</i>
<u>Tipo de agitação</u>	Orbital a 150 rpm
<u>Tempo de agitação</u>	30 s 1 min 2,5 min 5 min 10 min
<u>NPM's</u>	FeO CuFeO 5% Ag/FeO C-FeO@CVD750 FeO/CNT CuFeO/CNT N-C-FeO@CVD750 5% Ag/CNT
<u>Concentração de NPM'S</u>	12 mg/mL

3.3.3.4 Influência da concentração das nanopartículas magnéticas na remoção das bactérias

O objetivo destes ensaios prende-se com a determinação da eficiência de remoção da bactéria *E.coli* para diferentes concentrações de nanopartículas magnéticas no sistema.

Para estes ensaios a suspensão bacteriana com a bactéria em estudo foi exposta a diferentes concentrações de NPM's para um tempo de agitação de 1 min.

As condições de operação aplicadas encontram-se apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6- Condições de operação utilizadas para a realização dos ensaios de avaliação da influência da concentração das nanopartículas magnéticas na remoção da *E.coli*

Parâmetros	Condições de operação utilizadas
<u>Bactéria</u>	<i>Escherichia coli</i>
<u>Tipo de agitação</u>	Orbital a 150 rpm
<u>Tempo de agitação</u>	1 min
<u>NPM's</u>	5% Ag/FeO CuFeO/CNT C-FeO@CVD750
<u>Concentração de NPM'S</u>	4 mg/mL 8 mg/mL 12 mg/mL 16 mg/mL 20 mg/mL 30 mg/mL 50 mg/mL

3.3.4 Comparação dos resultados obtidos para a *Escherichia coli* (gram-negativa) com a *Staphylococcus aureus* (gram-positiva)

Os ensaios com *S.aureus* foram realizados para todas as nanopartículas magnéticas sintetizadas. Com base nos resultados obtidos nos ensaios anteriores foram utilizadas as melhores condições em termos de concentração ideal de nanopartículas e tempo de agitação.

A Tabela 7 representa as condições adotadas para a realização dos ensaios.

Tabela 7- Condições de operação adotadas para o ensaio com a bactéria gram-negativa *S. aureus* para cada uma das nanopartículas magnéticas

Parâmetros	Condições de operação utilizadas
<u>Bactéria</u>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<u>Tipo de agitação</u>	Orbital a 150 rpm
<u>Tempo de agitação</u>	1 min
<u>NPM's</u>	FeO CuFeO 5% Ag/FeO C-FeO@CVD750 FeO/CNT CuFeO/CNT N-C-FeO@CVD750
<u>Concentração de NPM'S</u>	50 mg/mL

3.4 REMOÇÃO DE CÉLULAS BACTERIANAS - ENSAIOS EM REATOR CONTÍNUO

Com a realização destes ensaios em reator com modo de funcionamento em contínuo pretendeu-se avaliar a eficiência de remoção bacteriana em condições experimentais próximas das condições reais de aplicação desta tecnologia e averiguar se, após um longo período de funcionamento, as NPM's sofriam alguma desativação. Para tal utilizaram-se as nanopartículas que se revelaram mais eficientes aquando a realização dos ensaios em reator fechado.

Os ensaios em reator contínuo foram realizados para suspensões das duas bactérias em estudo (*E.coli* e *S.aureus*). As suspensões bacterianas foram preparadas tendo em conta o procedimento apresentado na secção 3.3.1.

Todos os ensaios foram realizados no interior de uma câmara de fluxo laminar para garantir a assepsia de todos os equipamentos e o material utilizado foi devidamente autoclavado e exposto a radiação ultravioleta dentro da câmara de forma a evitar qualquer tipo de contaminação ou erro nos resultados obtidos.

Os ensaios foram realizados num reator a funcionar em modo contínuo, devidamente dimensionado, e foi utilizada uma coluna (Omnifit) com diâmetro de 1 cm e uma bomba peristáltica.

Inicialmente, procedeu-se aos cálculos das dimensões do reator de modo a obter o tempo de contacto entre as partículas e a suspensão bacteriana desejado. Todos os cálculos efetuados encontram-se representados no Anexo A1. Os ensaios foram realizados para um tempo de duração de 3 h com períodos de amostragem de 30 min e para um tempo de contacto entre as partículas e a suspensão de 1 min (180 tempos). A massa de NPM's utilizada nestes ensaios foi de 40 mg. A Figura 8 mostra a instalação utilizada durante o ensaio e as setas correspondem à direção do fluxo da suspensão sujeita a tratamento.

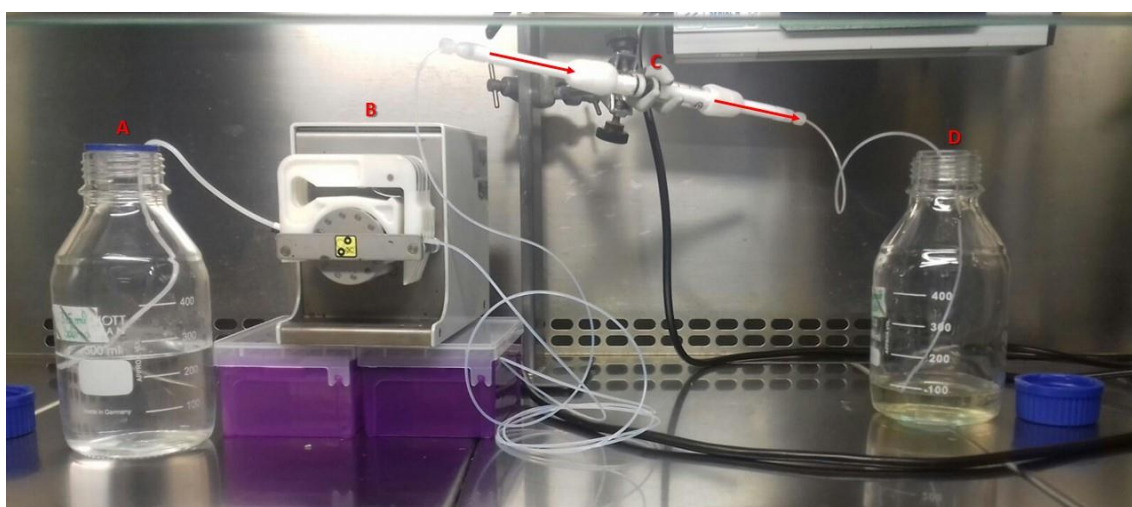


Figura 8- Instalação utilizada para a realização dos ensaios em contínuo: (A) Suspensão bacteriana antes do tratamento, (B) Bomba peristáltica, (C) Reator, (D) Suspensão bacteriana após o tratamento

3.4.1 Condições utilizadas durante os ensaios em contínuo com as suspensões bacterianas

Os ensaios em reator contínuo foram realizados com as nanopartículas magnéticas que mostraram maior eficiência de remoção bacteriana aquando a realização dos ensaios em reator fechado.

A Tabela 8 resume as condições adotadas para os ensaios com os dois tipos de suspensão bacteriana (suspensão com a bactéria *E.coli* e suspensão com a bactéria *S.aureus*) e uma suspensão mista composta pelas duas bactérias.

Tabela 8- Condições de operação dos ensaios em contínuo

Parâmetros	ENSAIO 1	ENSAIO 2	ENSAIO 3	ENSAIO 4	ENSAIO 5	ENSAIO 6
<u>Bactéria</u>	<i>E.coli</i>		<i>S.aureus</i>		Suspensão mista (<i>E.coli</i> + <i>S.aureus</i>)	
<u>Tempo de ensaio</u> (h)	3					
<u>Periodicidade de amostragem</u> (min)	30					
<u>NPM's utilizadas</u>	CuFeO/CNT	C-FeO@CVD750	CuFeO/CNT	C-FeO@CVD750	CuFeO/CNT	CuFeO/CNT
<u>Massa de NPM's</u> (mg)	40					
<u>Caudal</u> (mL/min)	0,8	0,4	0,8	0,4	0,8	1,6
<u>Volume do leito</u> (cm³)	0,7845	0,3927	0,7845	0,3927	0,3927	0,7845
<u>Velocidade da bomba</u> (rpm)	12	5	12	5	12	22,5
<u>Tempo de contacto</u> (τ)	1 min					30 s

Para o caso concreto das nanopartículas com nanotubos de carbono (CuFeO/CNT), devido à sua elevada densidade, não foi possível estabelecer um leito de 0,5 cm para uma massa de NPM's de 40 mg. Assim, procurou-se ajustar o comprimento do leito de forma a manter um tempo de contacto da suspensão bacteriana com as nanopartículas de 1 min. Assim, para a realização dos ensaios com as NPM's de CuFeO/CNT foi utilizado um caudal de 0,8 mL/min ao invés dos 0,4 mL/min.

3.4.2 Ensaio de controlo

Para cada um dos ensaios realizados em contínuo foi efetuado o espalhamento da suspensão bacteriana inicial servindo como controlo da suspensão. No entanto, para confirmar que toda a suspensão líquida, juntamente com as suas bactérias, era capaz de atravessar a tubagem da instalação, sem que as bactérias ficassem retidas nas paredes da mesma, realizou-se um ensaio, nas mesmas condições base do anterior, na ausência de nanopartículas magnéticas na coluna. Este ensaio permitiu recolher amostras da suspensão com a mesma periodicidade que os ensaios realizados com as NPM's e, desta forma, averiguar se a suspensão final continha a densidade bacteriana esperada.

3.5 ENUMERAÇÃO DAS CÉLULAS VIVAS E MORTAS - ANÁLISES COM O KIT LIVE/DEAD

Após a aplicação das nanopartículas magnéticas para a remoção bacteriana uma das questões levantadas seria se as bactérias eram de facto eliminadas (mortas) ou se apenas ficariam agregadas às nanopartículas magnéticas. Desta forma, foi utilizado o Kit Live/Dead que permite visualizar as células bacterianas ao microscópio de fluorescência sendo possível distinguir as células vivas das mortas.

O Kit Live/Dead (LIVE/DEAD™ BacLight™ (Bacterial Viability Kit) – Termo Fisher Scientific) foi desenvolvido para a discriminação de células bacterianas viáveis (vivas) e não viáveis (que apresentam a estrutura da sua membrana comprometida sendo consideradas mortas) através da sua coloração de diferentes cores. O kit é composto por dois corantes, verde e vermelho, que conferem fluorescência às células. O corante verde (SYTO 9) é capaz de penetrar na membrana celular das células e intercalar o DNA concedendo uma cor verde a todas as células. O corante vermelho (Iodeto de propídio) só é capaz de penetrar na membrana celular quando esta se encontra danificada e desta forma, só concede cor vermelha às células que se encontram desintegradas (mortas). Com uma mistura apropriada dos dois corantes é possível a distinção entre células bacterianas viáveis e não viáveis de uma determinada amostra considerada [52].

Para a realização deste teste foram realizados ensaios em reator fechado segundo o procedimento apresentado na secção 3.3.3.4 utilizando suspensões das duas bactérias em estudo. As nanopartículas utilizadas foram as de 5% Ag/FeO, CuFeO/CNT e C-FeO@CVD750, para uma suspensão de *E.coli*, e CuFeO/CNT e C-FeO@CVD750 para uma suspensão de *S.aureus*. A suspensão de trabalho foi preparada segundo o procedimento apresentado na secção 3.3.1 e o tempo de contacto entre a suspensão bacteriana e as NPM's foi de 1 min para uma agitação orbital de 150 rpm.

Após o contacto das nanopartículas com a suspensão bacteriana, pipetou-se 1 mL de suspensão que foi submetida a filtração com uma membrana (Whatman) de porosidade 0,2 μm e um diâmetro de 25 mm. Após a filtração da suspensão foram adicionados 250 μL de corante verde e 50 μL de corante vermelho de forma a cobrir a superfície da membrana filtrante. A membrana foi coberta, de modo a estar resguardada da luz exterior, e deixou-se reagir durante 10 min. Após esse tempo, filtrou-se a solução e procedeu-se à visualização no microscópio.

A visualização foi realizada com uma ampliação de 1000 x recorrendo ao microscópio de fluorescência Nikon eclipse C1. Para a visualização das imagens obtidas o software utilizado foi o Lasv4.2.

3.6 ANÁLISES DE MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO (SEM)

Os ensaios de microscopia eletrónica de varrimento foram realizados utilizando o Microscópio Eletrónico de Varrimento ambiental, de alta resolução (Schottky), com microanálise por raios-X e Análise de Padrões de Difração de Eletrões Retro difundidos: Quanta 400FEG ESEM / EDAX Genesis X4M. As amostras foram revestidas com filme fino de Au/Pd, por pulverização catódica (sputtering), utilizando o equipamento SPI Module Sputter Coater.

Esta técnica de caracterização de materiais é usualmente utilizada para a obtenção de imagens tridimensionais da morfologia externa das NPM's, bem como, da sua constituição.

Foram realizadas análises de SEM com o objetivo de obter imagens representativas das NPM's antes e após o tratamento das duas suspensões bacteriana utilizadas (*E.coli* e *S.aureus*) de forma a verificar se existia adsorção das bactérias nas NPM's após o tratamento e se se verificavam alterações morfológicas nas nanopartículas após a sua utilização.

3.6.1 Preparação das NPM's para análise após contacto com as suspensões bacterianas

Para que fosse possível a observação de células bacterianas adsorvidas às NPM's estas foram devidamente preparadas com o objetivo de manter a estrutura das bactérias.

Em primeiro lugar a suspensão bacteriana foi filtrada utilizando um sistema de filtração e um filtro de porosidade 0,22 μm com um diâmetro de 25 mm (Whatman). De seguida, as partículas foram imersas numa solução de glutaraldeído (2,5 % v/v) preparada em PBS (Phosphate- buffered saline) durante 2 h. Este passo permite fixar as células bacteriana às NPM's. As partículas foram, de seguida, lavadas 3 vezes com PBS sendo a duração de cada lavagem de 15 min. O passo de desidratação foi realizado através de lavagens com etanol com

concentrações crescentes (10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 90 % e 100 % (v/v)) de 20 min cada uma. A última lavagem com etanol 100 % foi repetida para uma duração de 30 min [53].

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

4.1.1 Adsorção de azoto a -196 °C

A caracterização textural das nanopartículas magnéticas consistiu na aplicação da técnica de adsorção de azoto a -196 °C para a obtenção dos valores correspondentes das áreas superficiais específicas (S_{BET}) através do método BET e do volume total de poros ($V_{\text{p P/P0}=0,95}$). Os resultados obtidos encontram-se representados na Tabela 9.

Tabela 9- Caracterização textural das nanopartículas magnéticas

Amostra	S_{BET} (m ² /g) ± 5 m ² /g	$V_{\text{p P/P0}=0,95}$ (cm ³ /g)
<u>FeO</u>	161	0,324
<u>CuFeO</u>	256	0,280
<u>5% Ag/FeO</u>	134	0,290
<u>C-FeO@CVD750</u>	17	0,040
<u>N-C-FeO@CVD750</u>	<5	0,014
<u>FeO/CNT</u>	178	0,425
<u>CuFeO/CNT</u>	226	0,351
<u>5% Ag/CNT</u>	157	0,385
<u>CNT</u>	197	0,488

Analisando os resultados obtidos é possível observar que as NPM's base FeO e CuFeO apresentam valores de área superficial específica de 161 e 256 m²/g, respetivamente, e os nanotubos de carbono de 197 m²/g. Quando sujeitas a tratamento por CVD (deposição química em fase de vapor) para deposição de carbono, a área superficial das partículas de FeO diminui

de forma significativa sendo que para o caso de tratamento por CVD com amônia (amostra N-C-FeO@CVD750) o valor se encontra abaixo do limite de detecção do equipamento ($<5 \text{ m}^2/\text{g}$). As altas temperaturas ($750 \text{ }^\circ\text{C}$) utilizadas na aplicação desta técnica induziu o decréscimo da área superficial das partículas [54–56]. As partículas sintetizadas através do método de CVD são também as que apresentam um volume de poros mais baixo.

Os nanomateriais FeO/CNT e CuFeO/CNT resultantes da adição dos nanotubos de carbono durante a síntese das nanopartículas magnéticas apresentam áreas superficiais específicas e volume total de poros intermédios entre o valor dos CNT e os das nanopartículas base devido ao fato de resultarem de uma mistura física destes materiais e por não terem sido sujeitos a tratamentos térmicos. Por outro lado, os nanomateriais preparados pelo método de impregnação incipiente (5% Ag/FeO e 5% Ag/CNT) apresentam uma S_{BET} e V_p ligeiramente inferiores aos materiais originais (FeO e CNT) devido à deposição de prata na superfície destes materiais.

4.1.2 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica de todos os materiais sintetizados teve como objetivo a avaliação das propriedades térmicas dos materiais em função da temperatura observando a variação de massa dos mesmos.

Os resultados obtidos para as análises termogravimétricas de todas as NPM's sintetizadas encontram-se apresentados na Tabela 10 (valores percentuais) e na Figura 9.

Tabela 10- Constituição das nanopartículas magnéticas

Amostra analisada	% Carbono	% Metal
<u>FeO</u>	-	97
<u>CuFeO</u>	-	96
<u>5% Ag/FeO</u>	-	98
<u>C-FeO@CVD750</u>	29	71
<u>N-C-FeO@CVD750</u>	1	99
<u>FeO@CNT</u>	25	75
<u>CuFeO@CNT</u>	11	89
<u>5% Ag/CNT</u>	90	10
<u>CNT</u>	87	13

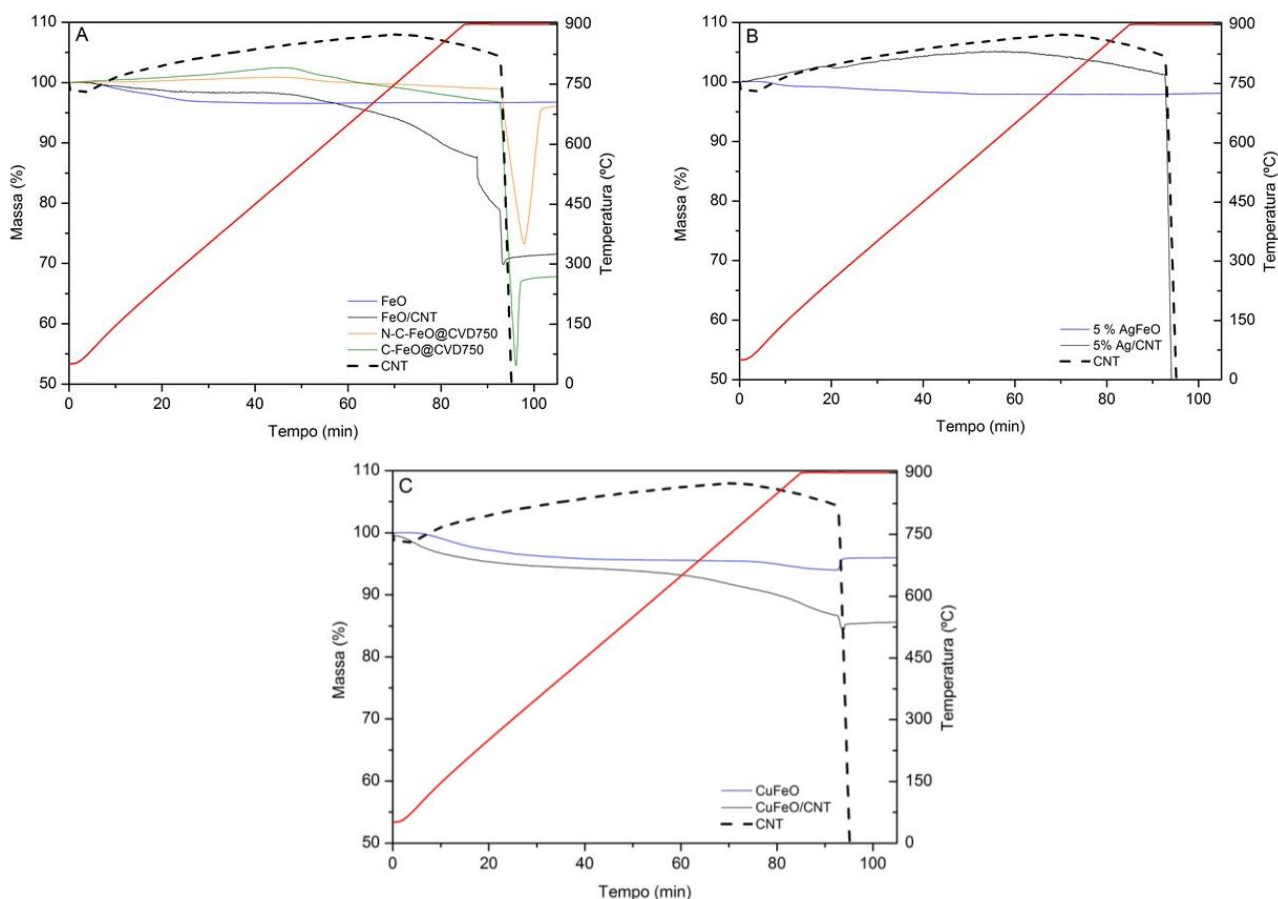


Figura 9-Termográficos das nanopartículas magnéticas de (A) FeO, FeO/CNT, C-FeO@CVD750, N-C-FeO@CVD750 e CNT (B) 5% Ag/FeO, 5% Ag/CNT e CNT, (C) CuFeO, CuFeO/CNT e CNT

Observando o gráfico presente na Figura 9 é possível verificar que para as nanopartículas que não possuíam carbono na sua constituição a perda de massa foi bastante reduzida quando comparada com materiais com carbono o que já seria de esperar pois, com o aumento da temperatura, o carbono presente nas nanopartículas é queimado e quanto maior a quantidade de carbono presente maior é a redução de massa durante o tratamento.

Para as NPM's sintetizadas através da aplicação da técnica de CVD (C-FeO@CVD750) a redução de massa foi de 29 %, referente ao carbono depositado nas nanopartículas, sendo maior do que o valor registado para as NPM's de FeO que foi de 3 %, uma vez que estas apresentam metais na sua constituição. Resultados idênticos a este eram esperados para as NPM's com tratamento por CVD dopadas com azoto, no entanto, o valor de perda de massa registado foi de apenas 1 %, provavelmente devido à presença de azoto na estrutura.

Analisando o gráfico presente na Figura 9 (A) é possível observar um aumento de massa no final do processo para as nanopartículas sintetizadas através da técnica de CVD que poderá estar relacionada com a oxidação das partículas metálicas quando são expostas ao caudal de ar no final da análise.

Observando as curvas correspondentes aos termográficos para as nanopartículas com nanotubos de carbono na sua constituição e para os nanotubos de carbono originais, é possível verificar uma elevada perda de massa por estes materiais serem constituídos maioritariamente por carbono, como é possível verificar através dos dados presentes na Tabela 10. Para estes resultados é possível destacar a elevada perda de massa das nanopartículas de 5% Ag/CNT, que já seria de esperar tendo em conta o procedimento de preparação das mesmas (secção 3.1.8) onde a massa de prata utilizada é muito reduzida.

Os resultados obtidos para os nanotubos de carbono não estão de acordo com o esperado uma vez que, de acordo com o fornecedor, estes CNT têm um elevado grau de pureza (95 %) sendo, por isso, esperado uma percentagem de carbono mais elevada.

4.1.3 Redução a temperatura programada (TPR)

A análise de redução a temperatura programada foi realizada com o objetivo de determinar a temperatura de redução dos metais presentes nas nanopartículas magnéticas sintetizadas. Os perfis obtidos para cada uma das nanopartículas encontram-se representados na Figura 10.

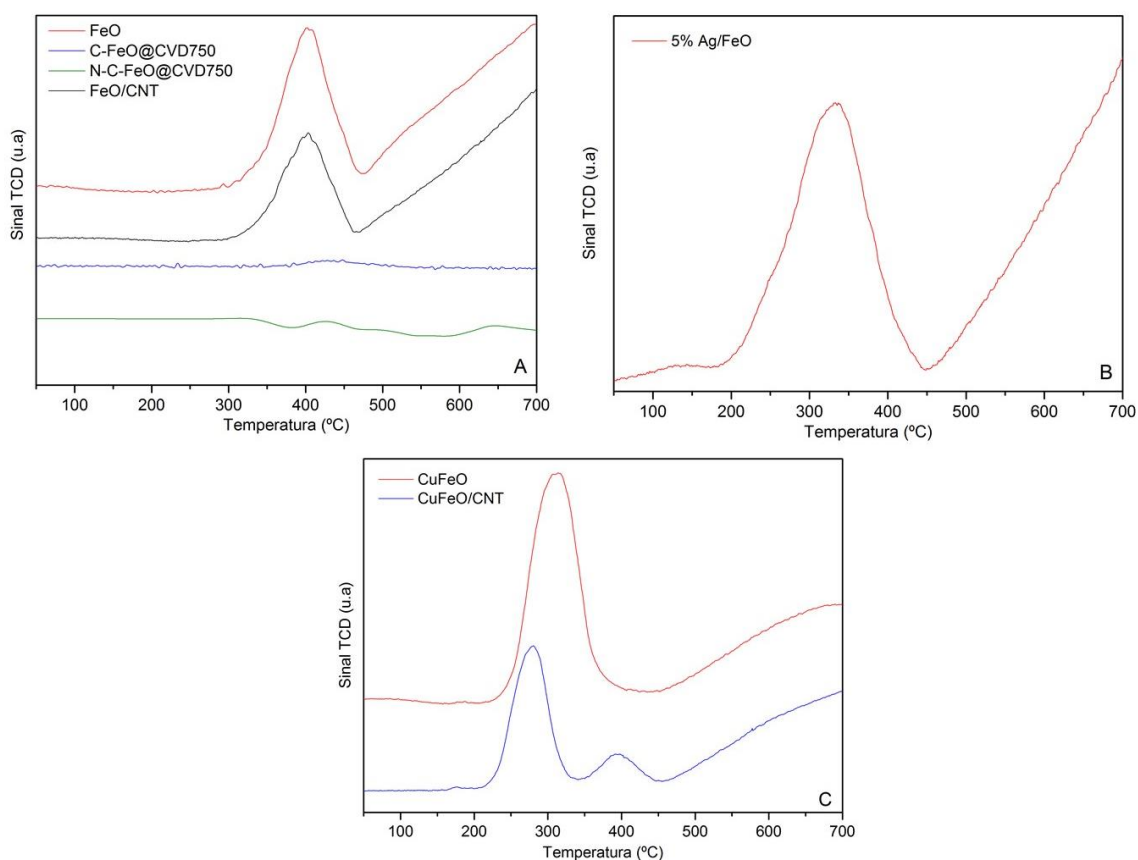


Figura 10- Perfil de TPR das nanopartículas magnéticas sintetizadas, (A) FeO, FeO/CNT, C-FeO@CVD750 e N-C-FeO@CVD750, (B) 5% Ag/FeO, (C) CuFeO e CuFeO/CNT

Na Figura 10 (A) é possível observar os picos de redução característicos das nanopartículas de Fe_2O_3 . O primeiro pico ocorre para uma temperatura próxima dos 400 °C e corresponde ao instante em que ocorre a redução das nanopartículas de Fe_2O_3 para Fe_3O_4 [57]. De seguida, entre os 400 °C e os 700 °C, ocorreu o segundo pico onde se dá uma redução sequencial de Fe_3O_4 para FeO e, por fim para Fe^0 [57,58]. Para as nanopartículas com tratamento por CVD (C-FeO@CVD750 e N-C-FeO@CVD750) os dois picos anteriormente referidos não são observados devido ao encapsulamento dos óxidos de ferro pelo material de carbono. No entanto, para as nanopartículas de ferro com nanotubos (FeO/CNT) é possível observar o pico de redução do ferro, embora este possua uma menor amplitude. Isto deve-se ao facto de os nanotubos de carbono estarem apenas misturados com as nanopartículas de ferro não as revestindo como no caso do tratamento por CVD.

Analisando a Figura 10 (B) é, mais uma vez, evidente a existência de um pico de redução do ferro para uma temperatura entre os 200 e os 450 °C. Em comparação com as nanopartículas de ferro originais, o primeiro pico de redução ocorre para uma temperatura ligeiramente inferior devido à presença de prata na estrutura das nanopartículas [59–61].

A Figura 10 (C) apresenta os perfis de TPR obtidos para as nanopartículas com cobre na sua estrutura. Como é possível observar, as nanopartículas apenas com cobre (CuFeO) possuem dois picos de redução. O primeiro pico ocorre entre os 200 e os 350 °C representando a gama de temperaturas onde ocorre a redução de CuFe_2O_4 para Cu^0 e Fe_3O_4 . O segundo pico observado ocorre entre os 400 e os 700 °C e corresponde à redução sequencial de Fe_3O_4 para FeO e, por último, para Fe^0 [57,59].

De modo a quantificar o H_2 consumido durante cada análise recorreu-se a um detetor de condutividade térmica. O consumo de hidrogénio foi contabilizado através da área dos gráficos representativos do consumo de hidrogénio em função da temperatura. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Tabela 11.

Tabela 11- Consumo de hidrogénio nas análises TPR para cada uma das NPM's sintetizadas

Amostra analisada	Consumo de H_2 (mmol/g)
<u>FeO</u>	0,25
<u>CuFeO</u>	0,43
<u>5% Ag/FeO</u>	0,34
<u>C-FeO@CVD750</u>	0,01
<u>N-C-FeO@CVD750</u>	0
<u>FeO/CNT</u>	0,20
<u>CuFeO/CNT</u>	0,28

Pela análise da Tabela 11 é possível verificar que para as NPM's sintetizadas através da técnica de CVD o consumo de H_2 é muito baixo (muito próximo de 0) quando comparado com os valores obtidos para as nanopartículas originais que não foram sujeitas a qualquer tratamento (FeO, CuFeO e 5% Ag/FeO). Isto acontece porque as partículas sintetizadas através da técnica de CVD possuem o metal, neste caso o FeO, encapsulado por uma membrana de carbono que resguarda o metal fazendo com que ele não sofra redução e, desta forma, não seja consumido H_2 no processo. Na secção 4.1.4 são apresentadas as análises TEM das nanopartículas de C-FeO@CVD750 e N-C-FeO@CVD750 e pelas imagens obtidas é possível observar este fenómeno.

Para as NPM's com CNT na sua constituição os valores de consumo de H_2 são muito idênticos aos verificados para as nanopartículas originais pois apesar de as partículas possuírem, também, carbono na sua constituição, este encontra-se misturado com o metal.

4.1.4 Microscopia eletrónica de transmissão (TEM)

As análises de TEM foram realizadas com o objetivo de obter informação relativa à estrutura das NPM's. As imagens obtidas encontram-se nas Figuras 11 a 13.

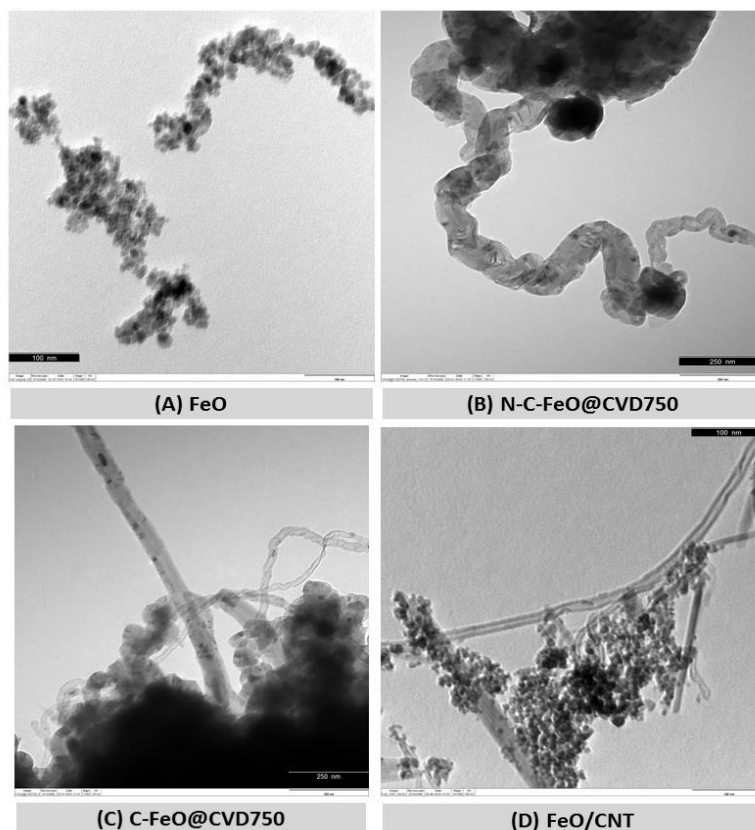


Figura 11- Imagens TEM das partículas de (A) FeO, (B) N-C-FeO@CVD750 e (C) C-FeO@CVD750 (D) FeO/CNT

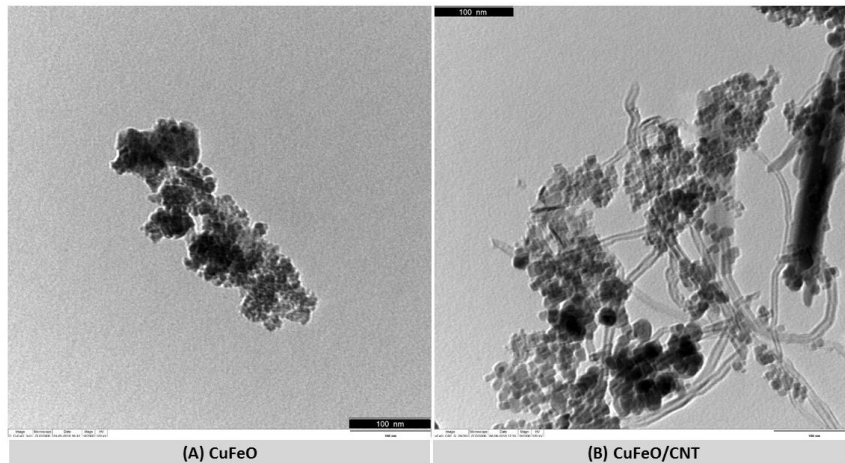


Figura 12- Imagens TEM das partículas CuFeO e CuFeO/CNT

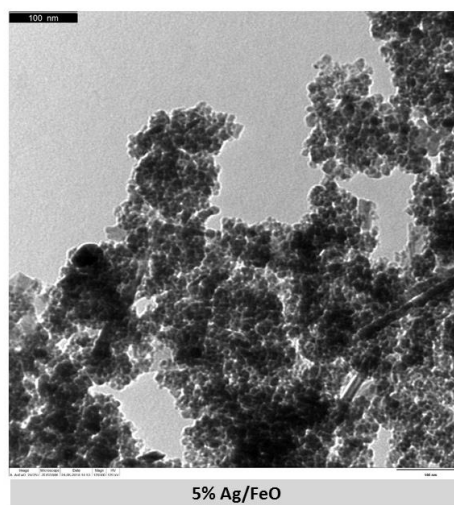


Figura 13- Imagens TEM das partículas de 5% Ag/FeO

Pela análise das imagens de TEM presentes na Figura 11 é possível observar uma grande diferença de estrutura das partículas de FeO (A), que apresentam uma forma esférica com dimensões reduzidas embora não seja bem definida, para as NPM's de N-C-FeO@CVD750 (B) e C-FeO@CVD750 (C) sendo notória a existência de uma camada de carbono a revestir as partículas metálicas, tendo-se observado a presença de nanotubos e nanofibras de carbono.

Na Figura 12 (A) pode-se observar que as NPM's de CuFeO apresentam uma estrutura cilíndrica não muito bem definida.

As Figuras 11 (D) e 12 (B) apresenta a imagem de TEM das nanopartículas de FeO/CNT e CuFeO/CNT, respectivamente, sendo possível observar que as partículas se encontram bem misturadas com os nanotubos de carbono, sendo visíveis as estruturas dos dois tipos de materiais.

A Figura 13 apresenta a imagem TEM referente às partículas de 5% Ag/FeO observando-se uma mistura dos dois metais não sendo possível uma clara distinção dos dois.

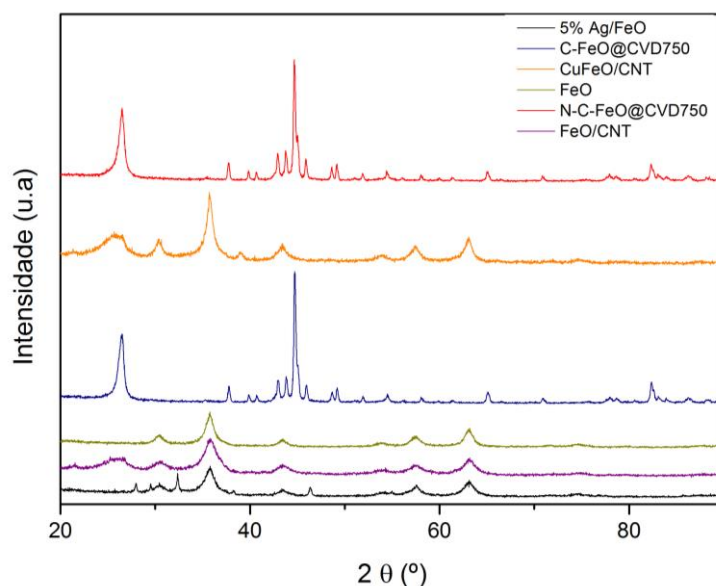
4.1.5 Difração de raios-X (XRD)

Figura 14- Perfis XRD das NPM's

A Tabela 12 apresenta a constituição das nanopartículas magnéticas sintetizadas.

Tabela 12- Propriedades das NPM's obtidas através da análise XRD

NPM's	Fases identificadas	Estrutura cristalina
<u>FeO</u>	Magnetite	tc=20,5 ±0,5 nm
<u>5% Ag/FeO</u>	AgCl Chlorargyrite 7,2 % Maghemite 69,5 % Magnetite 23,2 %	8,2 nm
<u>C-FeO@CVD750</u>	Cementite (Fe ₃ C)= 2,99 % Fe α= 1,59 % Grafite= 95,43 %	Cementite (Fe ₃ C)= 84,1±10 nm Fe α= 72,3±5 nm Grafite=15,9 ±1 nm
<u>N-C-FeO@CVD750</u>	Cementite (Fe ₃ C)= 3,28 % Fe α= 1,43 % Grafite= 95,29 %	Cementite (Fe ₃ C)= 14,7±5 nm Fe α= <130 nm Grafite=14,5 ±5 nm
<u>CuFeO/CNT</u>	Cuproespinela (compatível com CuFe ₂ O ₄) Tenorite Grafite (não refinada)	Cuproespinela:14,5±0.5 nm
<u>FeO/CNT</u>	Magnetite Grafite	Magnetite: 7,3±0,5 nm

Analisando a Figura 14 é possível observar que as partículas de C-FeO@CVD750 e N-C-FeO@CVD750 são as que apresentam picos de maiores dimensões sendo os perfis de ambas muito idênticos. Na Tabela 12 é possível verificar para estas NPM's que a fase predominante corresponde à grafite o que confirma que a superfície destas NPM's é essencialmente constituída por carbono. No entanto, face aos resultados obtidos na análise termogravimétrica

(secção 4.1.2) para as NPM's de N-C-FeO@CVD750, estas não apresentam carbono na sua estrutura, ao contrário do esperado, pelo que os resultados das análises XRD em conjunto com as de TPR e TEM vêm contradizer os resultados obtidos na análise termogravimétrica sugerindo um erro experimental aquando da realização do ensaio.

Observando o perfil de XRD obtido para as NPM's de 5% Ag/FeO é possível verificar que os picos observados próximos dos 30° correspondem aos picos característicos da prata sendo que os restantes são idênticos aos que se observam no perfil de XRD das NPM's de FeO.

Para os perfis das NPM's com CNT (FeO/CNT e CuFeO/CNT) é possível observar que estes são muito idênticos ao perfil XRD do ferro não se observando grandes diferenças na altura dos picos como foi possível observar para as NPM's de C-FeO@CVD750 e N-C-FeO@CVD750.

4.2 ENSAIOS EM REATOR FECHADO

Os ensaios realizados em reator fechado tiveram como objetivo testar todas as nanopartículas para diferentes condições de modo a otimizar os parâmetros ideais para a sua aplicação e selecionar aquelas que seriam mais promissoras para a aplicação num sistema a funcionar em contínuo.

Todos os valores obtidos de UFC/mL, antes e após o tratamento com as NPM's, bem como os valores logarítmicos correspondentes para cada um dos ensaios realizados e os desvios padrão entre réplicas encontram-se descritos no Anexo A3.

Como foi referido anteriormente na secção 3.3.2, a remoção máxima irá, para estes ensaios de desinfecção, corresponder a uma redução log de 6. Desta forma, para todos os ensaios realizados em reator fechado, o valor logarítmico de UFC/mL da suspensão bacteriana inicial será sempre próxima desse valor (6 log) podendo variar ligeiramente devido à densidade ótica da suspensão.

4.2.1 Comparação das nanopartículas magnéticas na remoção bacteriana e ensaios cinéticos de remoção de *Escherichia coli*

Com o objetivo de comparar a eficiência de cada uma das NPM's foram realizados ensaios nas mesmas condições com um tempo de agitação de 15 min.

Após a realização dos ensaios foi possível observar que para o tempo de agitação considerado foram obtidas eficiências de 100%, ou aproximadamente 100%, para todas as NPM's não sendo possível a distinção das mesmas no que diz respeito à eficiência na remoção bacteriana.

Por esse motivo, foram realizados ensaios cinéticos para todas as NPM's excluindo as nanopartículas de prata com nanotubos de carbono (5% Ag/CNT) porque, pelo facto de não serem magnéticas, não foi possível recolher uma amostra significativa de suspensão, para espalhamento, isenta de partículas.

Os ensaios cinéticos foram realizados para diferentes tempos de contacto entre as NPM's e a suspensão bacteriana com o objetivo de selecionar aquelas que seriam mais eficientes na remoção das bactérias no menor tempo de contacto possível. Os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados obtidos encontram-se representados nos gráficos presentes nas Figura 15 a 17.

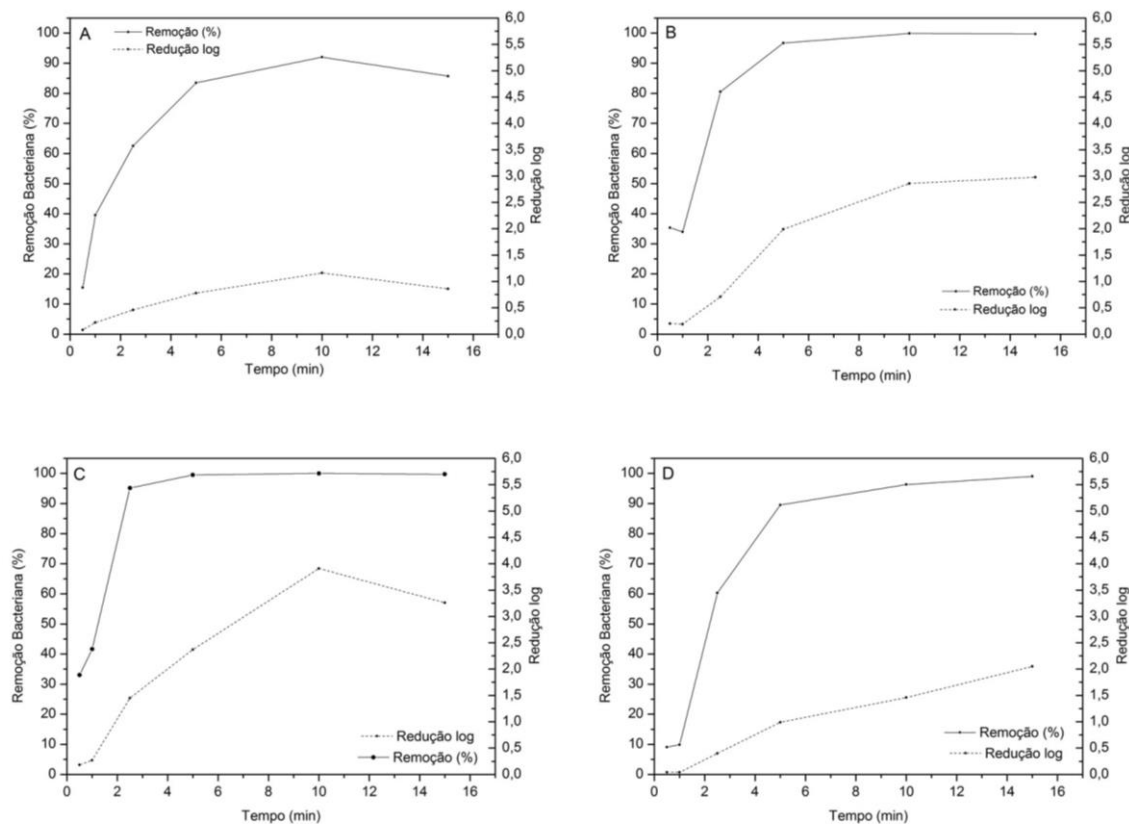


Figura 15- Cinética de remoção (%) e redução log da *Escherichia coli* quando em contacto com nanopartículas magnéticas de (A) FeO, (B) Feo/CNT, (C) C-FeO@CVD750 e (D) N-C-FeO@CVD750

Os gráficos representados na Figura 15 descrevem o comportamento da bactéria *E.coli* quando em contacto com as diferentes nanopartículas de ferro, observando-se que a eficiência de remoção aumenta com o aumento do tempo de contacto como foi exposto por Jin et al. [46].

O gráfico A é representativo dos valores de percentagem de remoção bacteriana e redução log obtidos para os ensaios com as nanopartículas de FeO. Para estes ensaios, a percentagem máxima de remoção bacteriana é atingida após 10 min de tempo de contacto (92,0%) correspondendo a um valor de redução log de 1,16. No entanto, é possível verificar uma

incoerência nos valores de remoção bacteriana ao fim de 15 min de contacto observando-se uma perda de eficiência por parte das NPM's. Esta incoerência pode ser explicada pela utilização de uma suspensão bacteriana diferente para a realização do ensaio com um tempo de agitação de 15 min que pode ter variado ligeiramente na densidade ótica conduzindo a ligeiras diferenças nos resultados obtidos.

O gráfico B mostra a eficiência de remoção bacteriana das nanopartículas de ferro com nanotubos de carbono (FeO/CNT). Observou-se que a partir do tempo de contacto de 5 min é possível atingir uma eficiência de remoção bacteriana de 96,7% correspondente a uma redução log de 1,99. Para tempos de contacto de 10 e 15 min as eficiências de remoção já são consideradas de 100%. No entanto, para estes tempos os valores de redução log registados foram cerca de metade do valor máximo possível de atingir sendo possível verificar que a eficiência de remoção bacteriana de 100% é relativa visto que as bactérias não são removidas na sua totalidade como é possível verificar pelos valores logarítmicos de UFC/mL obtidos após o tratamento com as NPM's (Anexo 3).

Considerando um tempo de contato mais curto, como acontece quando aplicado numa situação real, para 1 min o valor de redução log atingido foi de 0,19 (34,0%).

O gráfico C mostra as eficiências obtidas para as nanopartículas de ferro revestidas com material de carbono por CVD (C-FeO@CVD750) sendo possível observar que a partir dos 2,5 min de tempo de contacto é atingida uma eficiência de remoção bacteriana de 95,1%, correspondente a uma redução log de 1,45, revelando uma melhoria significativa em relação às nanopartículas de FeO/CNT anteriormente mencionadas. Para o tempo de contacto de 1 min o valor de redução log foi de 0,27 (41,6%).

Observando o gráfico D é possível constatar que as nanopartículas magnéticas de ferro revestidas com material de carbono dopado com azoto por CVD (N-C-FeO@CVD750) atingem uma eficiência máxima de 99,0% (redução 1,46 log) para um tempo de contacto de 15 min. No entanto, apesar de ter uma percentagem de eficiência de remoção bacteriana alta, a remoção não foi assim tão significativa para um tempo de contacto tão longo como o considerado. Para tempos de contacto mais curtos, 1 min e 2,5 min, as partículas de N-C-FeO@CVD750 foram as que apresentaram resultados menos promissores.

Comparando diretamente estas 4 partículas é possível perceber que as que apresentam maior potencial para a remoção bacteriana serão as nanopartículas de FeO/CNT e as de C-FeO@CVD750 pois são as mais capazes de atingir eficiências de remoção bacteriana altas para tempos de contacto mais curtos.

A avaliação da eficiência das NPM's para um tempo de contacto curto é importante quando o objetivo de aplicação real das nanopartículas é a desinfecção de água corrente como acontece nos pontos de saída da mesma onde os tempos de contacto são mínimos.

A Figura 16 mostra o gráfico das eficiências de remoção bacteriana e valores de redução log para as partículas de prata (5% Ag/FeO).

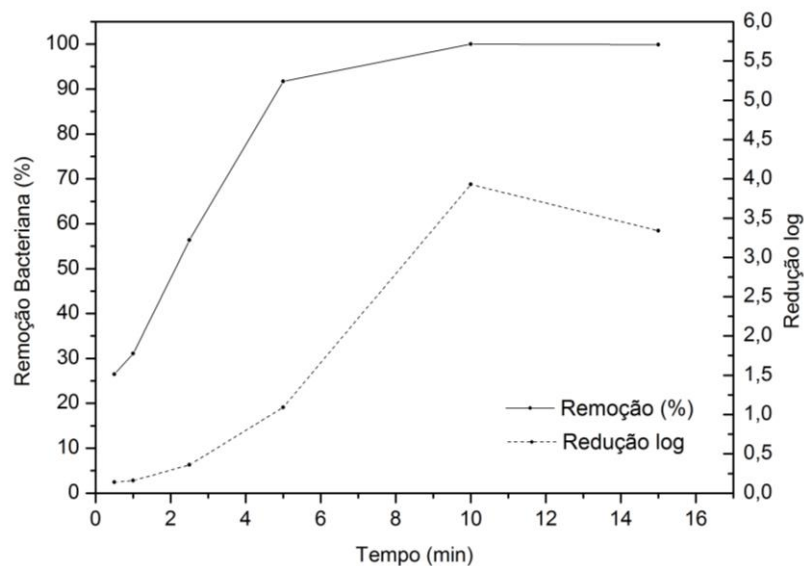


Figura 16- Cinética de remoção (%) e redução log da *E.coli* quando em contacto com nanopartículas magnéticas de 5% Ag/FeO

Pela análise do gráfico é possível observar que a eficiência de remoção máxima registada ocorre para um tempo de contacto de 10 min e foi de 100% (correspondente da redução log de 3,93). Para o tempo de contacto de 15 min é possível observar uma pequena incoerência nos resultados observando-se uma perda de eficiência de remoção bacteriana sendo a justificação para este resultado a mesma exposta para a Figura 15 (A). Para tempos de contacto mais curtos, 1 min e 2,5 min, as eficiências de remoção bacteriana obtidas foram de 31,1% e 56,4% correspondentes a valores de redução log de 0,16 e 0,36, respetivamente.

Aquando da realização dos ensaios de cinética com as nanopartículas de prata foi possível observar que 5 min após o contacto, a morfologia das colónias mostrou algumas alterações sendo possível observar que estas apresentavam sinais de stress visíveis pela presença de colónias de dimensão mais reduzida do que o habitual.

Os iões de prata são conhecidos pelos seus efeitos inibitórios e bactericidas, para além de um amplo espectro de atividades antimicrobianas [62]. As nanopartículas de prata promovem a neutralização da carga elétrica superficial da membrana bacteriana alterando a sua

penetrabilidade. Desta forma, a membrana fica mais fragilizada permitindo a entrada das NPM's no citoplasma da bactéria onde estas poderão interagir com vários organelos celulares o que pode induzir a fenómenos de stress oxidativo, alterações heterogéneas, inibição enzimática, desativação de proteínas ou alterações nos genes de expressão conduzindo à morte da célula [45,62,63]. No entanto, as nanopartículas podem, também, acumular-se na membrana celular da bactéria e causar deformações na sua estrutura [63].

Para o caso da bactéria *E.coli* estudos mostraram que o contacto dos iões de prata com a bactéria causaria a libertação da membrana celular do citoplasma [62]. Este fenómeno não leva diretamente à morte da bactéria podendo simplesmente causar deformações na sua morfologia. Esta pode ser uma das explicações para as diferentes morfologias observadas nas colónias da suspensão que esteve em contacto com as nanopartículas de prata. No Anexo 2 encontram-se imagens representativas deste fenómeno após a realização de um dos ensaios

A Figura 17 apresenta os gráficos referentes às eficiências de remoção bacteriana obtidas para as nanopartículas de cobre (CuFeO) e cobre com nanotubos de carbono (CuFeO/CNT).

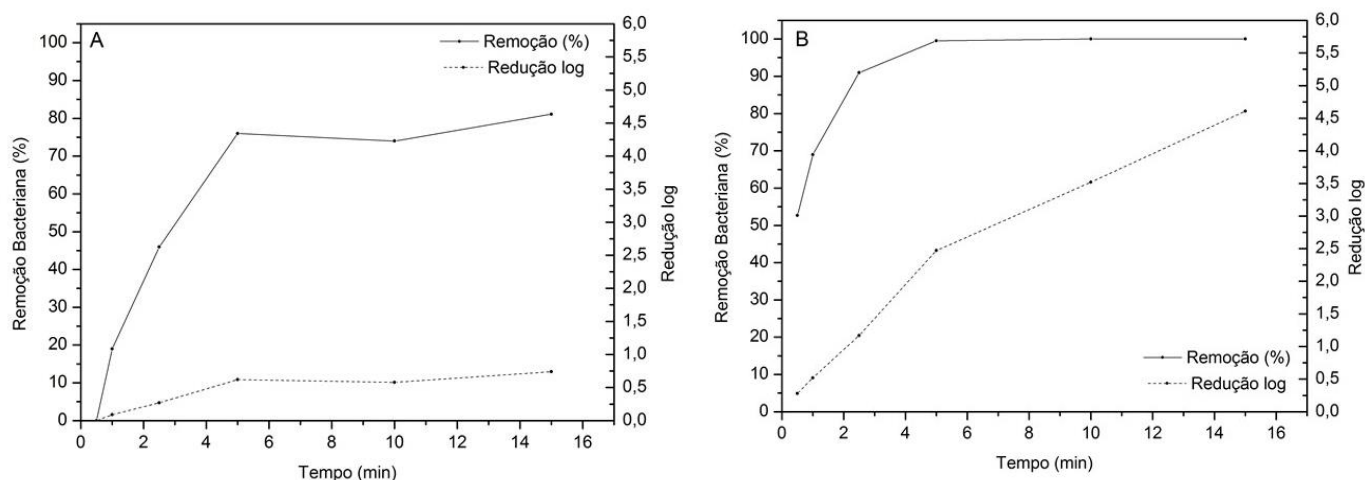


Figura 17- Cinética de remoção (%) e redução log da *Escherichia coli* quando em contacto com NPM's de (A) CuFeO, (B) CuFeO/CNT

Como é possível desde logo perceber, olhando apenas para os gráficos, as nanopartículas de CuFeO/CNT apresentam uma eficiência de remoção bacteriana muito superior às nanopartículas de CuFeO.

Analisando o gráfico A presente na Figura 17 é possível observar que a eficiência de remoção bacteriana máxima é alcançada para um tempo de contacto de 15 min e tem o valor de 81,1% correspondente a uma redução log de apenas 0,74. Para tempos de contacto mais reduzidos, como 1 min e 2,5 min, o gráfico mostra que a eficiência de remoção bacteriana tem

um grande aumento passando dos 19% de eficiência, para o tempo de contacto de 1 min, para 46% quando o tempo de contacto é de 2,5 min. No entanto, como é possível observar pelo gráfico da redução log para as mesmas nanopartículas, este aumento brusco na eficiência corresponde a um aumento muito baixo nos valores de redução log.

Para as NPM's de CuFeO/CNT é possível observar no gráfico (B) da Figura 17 que a redução log aumenta de forma quase linear até ao tempo de contacto máximo de 15 min. O valor de redução log máximo foi de 4,61 sendo este o valor mais alto registado para todos os ensaios com as nanopartículas sintetizadas. A eficiência de remoção bacteriana obtida para o tempo de contacto de 1 min foi de 69,0% correspondente a um valor de redução log de 0,52 sendo estas as NPM's que apresentam melhores eficiências de remoção bacteriana para tempos de contacto mais curtos.

Através dos ensaios realizados e pela consequente observação dos gráficos presentes nas Figuras 15 (B) e 17 (B), foi possível concluir que a presença de nanotubos de carbono na estrutura das nanopartículas magnéticas é relevante para a obtenção de altas eficiências de remoção bacteriana.

Como já referido anteriormente, os nanotubos de carbono apresentam fortes características antibacterianas sendo capazes de causar grandes danos na membrana celular das bactérias levando à sua morte [28,64]. Este material possui uma elevada área superficial como foi possível constatar nos ensaios de caracterização das NPM's, (secção 4.1.1) o que faz com que a capacidade de adsorção de substâncias químicas, físicas e biológicas ocorra com uma grande eficiência [64]. Assim, para NPM's que possuam na sua estrutura nanotubos de carbono as eficiências de remoção bacterianas serão mais altas quando comparado com a atuação das mesmas nanopartículas sem a incorporação dos nanotubos.

Face aos resultados obtidos para cada uma das nanopartículas, foi possível seleccionar aquelas que se revelaram mais eficientes na remoção bacteriana da *E.coli* sendo estas as de C-FeO@CVD750, CuFeO/CNT e 5% Ag/FeO. Para os ensaios seguintes, para além de seleccionar as nanopartículas com eficiências mais elevadas nos ensaios de cinética, procurou-se que a seleção fosse feita de modo a que todas as nanopartículas base estivessem representadas. Por essa razão, mesmo que as partículas de 5% Ag/FeO tenham mostrado resultados um pouco ambíguos decidiu-se continuar os estudos com estas nanopartículas com o objetivo de continuar a avaliar o seu comportamento em diferentes condições aplicadas em reator fechado.

4.2.2 Influência da concentração das nanopartículas magnéticas na remoção bacteriana

Estes ensaios foram realizados com o objetivo de avaliar a eficiência de remoção de *E.coli* com a variação da massa de NPM's para um tempo de contacto fixo. Escolheu-se fixar um tempo de contacto entre as partículas e a suspensão bacteriana de 1 min de forma a otimizar a concentração de NPM's necessárias para a obtenção de uma boa eficiência de remoção para este tempo de contacto.

Para a realização deste ensaio foram utilizadas apenas as NPM's seleccionadas tendo em conta os ensaios anteriores (C-FeO@CVD750, CuFeO/CNT e 5% Ag/FeO). Os ensaios foram realizados em duplicado e foram avaliadas 7 concentrações de NPM's diferentes como referido na secção 3.3.3.4.

Os resultados obtidos para as eficiências de remoção bacteriana, em percentagem e em redução log para cada uma das NPM's analisadas, encontram-se representados nos gráficos presentes na Figura 18.

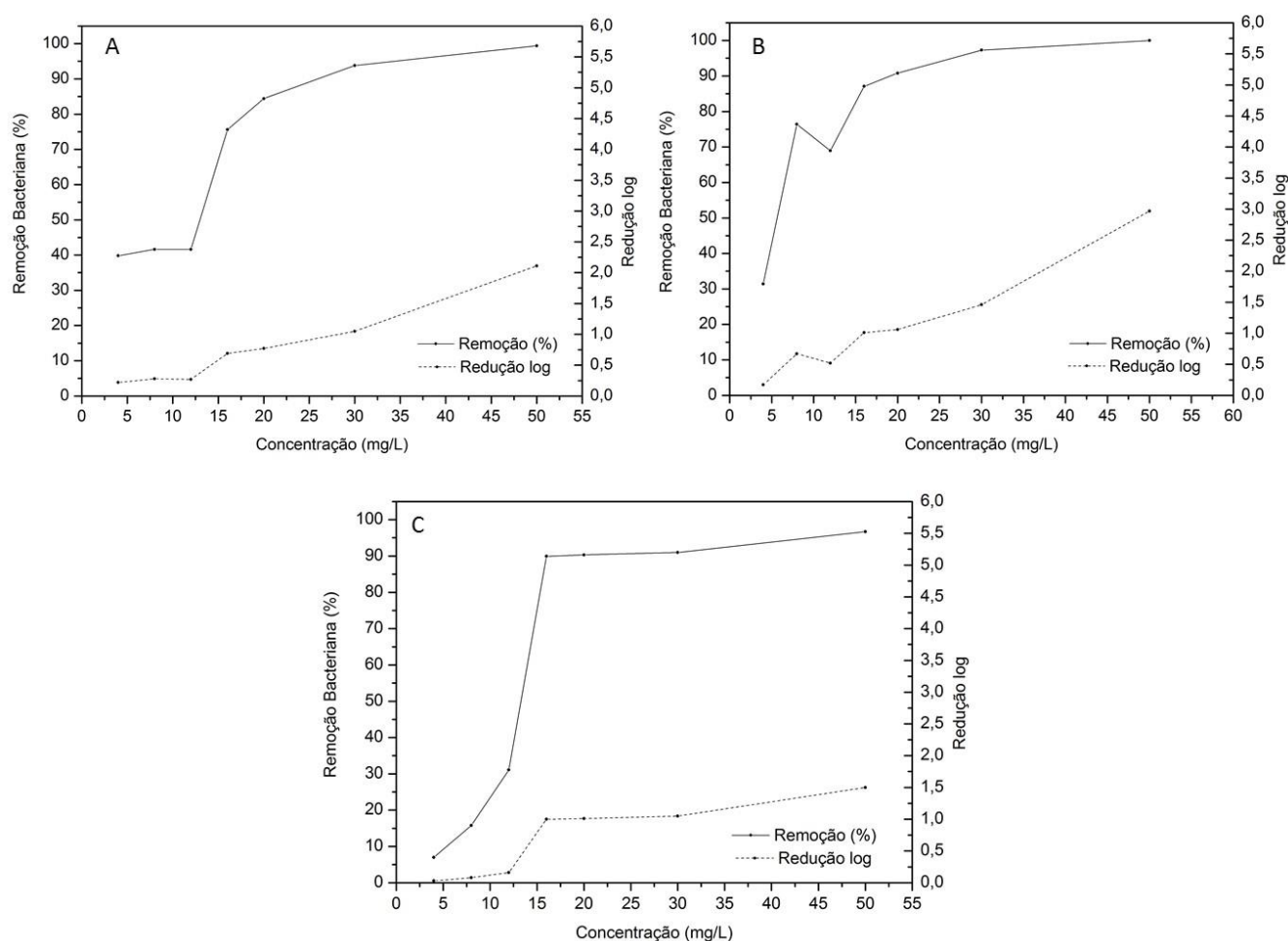


Figura 18- Remoção (%) e redução log de *E.coli* em função da concentração de NPM's para (A) C-FeO@CVD750, (B) CuFeO/CNT e (C) 5% Ag/FeO

A Figura 18 (A) apresenta a remoção bacteriana de *E.coli* quando em contacto com diferentes concentrações de nanopartículas de C-FeO@CVD750 onde é possível observar que existe um aumento significativo da eficiência de remoção bacteriana quando se passa de uma concentração de 12 mg NPM's/mL para 16 mg NPM's/mL. É possível também observar que a partir de uma concentração de NPM's de 30 mg/mL a eficiência de remoção não aumenta tão significativamente como na parte inicial do gráfico, para concentrações mais reduzidas de NPM's, começando a estabilizar perto do valor de remoção bacteriana máximo como já tinha sido reportado nos resultados obtidos por Huang et al. [47]. O valor de eficiência máximo foi alcançado para uma concentração 50 mg NPM's/mL e apresenta um valor de redução log de 2,11 (99,4 %). Pelo gráfico da redução log é possível observar que, mesmo utilizando uma concentração de NPM's de 50 mg/mL, o valor de redução log é relativamente baixo quando comparado com o da suspensão bacteriana inicial.

A Figura 18 (B) mostra o gráfico da remoção bacteriana da *E.coli* em função da concentração de nanopartículas de CuFeO/CNT onde é possível observar que, o maior aumento de eficiência de remoção acontece na transição de concentrações dos 4 mg NPM's/mL para os 8 mg NPM's/mL. A partir da concentração de 16 mg NPM's/mL o aumento da eficiência de remoção é mais gradual atingindo os 100% para uma concentração de 50 mg NPM's/mL correspondente a uma redução log de 2,97 tendo sido as NPM's que atingiram o maior valor de redução log para a concentração de 50 mg NPM's/mL.

O gráfico correspondente à remoção bacteriana e redução log para as nanopartículas magnéticas de 5% Ag/FeO está apresentado na Figura 18 (C). A eficiência de remoção de *E.coli* quando na presença de NPM's de 5% Ag/FeO sofreu um grande aumento na transição de concentrações dos 12 mg NPM's/mL para os 16 mg NPM's/mL correspondendo a um aumento de redução log de 0,16 para 1,00. A eficiência máxima atingida foi de 97 % para uma concentração de NPM's de 50 mg/mL correspondendo a um valor de redução log de 1,5.

Aquando a realização dos ensaios com as nanopartículas de 5% Ag/FeO foi possível verificar que, na transição de concentrações de 12 mg NPM's/mL para 16 mg NPM's/mL, as colónias de *E.coli* mostravam-se em stress apresentando modificações na morfologia. A contabilização de colónias para este caso foi feita apenas para aquelas que apresentavam um tamanho habitual não sendo contabilizadas as que apresentavam tamanhos menores. As imagens das placas de PCA com as colónias de *E.coli* após o contacto com 30 e 50 mg de NPM's/mL podem ser observadas no Anexo A2. A explicação para este fenómeno é o mesmo explicado na secção 4.2.1 vindo estes ensaios confirmar o efeito de stress oxidativo que os iões de prata provocam nas bactérias.

Desta forma, segundo os resultados obtidos, não se consideram que as nanopartículas magnéticas de 5% Ag/FeO sejam as mais eficientes para aplicar na remoção bacteriana, uma vez que não há garantia de que estas sejam completamente funcionais para a eliminação das bactérias.

Tendo em conta todos os ensaios realizados com a *E.coli* foi possível fixar as condições mais promissoras para a realização dos ensaios em reator fechado e para os ensaios com a bactéria gram-positiva *S.aureus* e, mais tarde, para os ensaios em contínuo, estando estas presentes na Tabela 13.

Tabela 13- Condições experimentais e NPM's ideais para a remoção bacteriana tendo em conta os resultados obtidos nos ensaios em reator fechado

NPM's	C-FeO@CVD750 CuFeO/CNT 5% Ag/FeO
Tempo de contacto	1 min
Concentração de NPM's	50 mg/ml

4.2.3 Comparação dos resultados obtidos para *Escherichia coli* (gram-negativa) com *Staphylococcus aureus* (gram-positiva)

Para a realização destes ensaios foram utilizadas as condições presentes na Tabela 13 sendo estas as consideradas mais promissoras para a remoção bacteriana.

De forma a confirmar o comportamento das NPM's na presença de uma bactéria diferente, os ensaios foram realizados em duplicado para todas as NPM's sintetizadas.

A bactéria *Staphylococcus aureus* é gram-positiva e é caracterizada por apresentar células de forma esférica (cocos). Esta bactéria está presente na pele e membranas mucosas dos seres humanos sendo estes os principais “reservatórios” deste tipo de organismo, no entanto, pode ser uma das grandes responsáveis por causar doenças e infeções, como bacteremia e endocardite infecciosa, caso consiga entrar na corrente sanguínea ou nos tecidos internos, sendo importante o seu controlo de forma a evitar a propagação de infeções e doenças principalmente na pele e trato respiratório [22].

Nas Figura 19 e 20 encontram-se os gráficos das eficiências de remoção bacteriana e redução log, respetivamente, das NPM's quando em contacto com uma suspensão bacteriana de *S.aureus*.

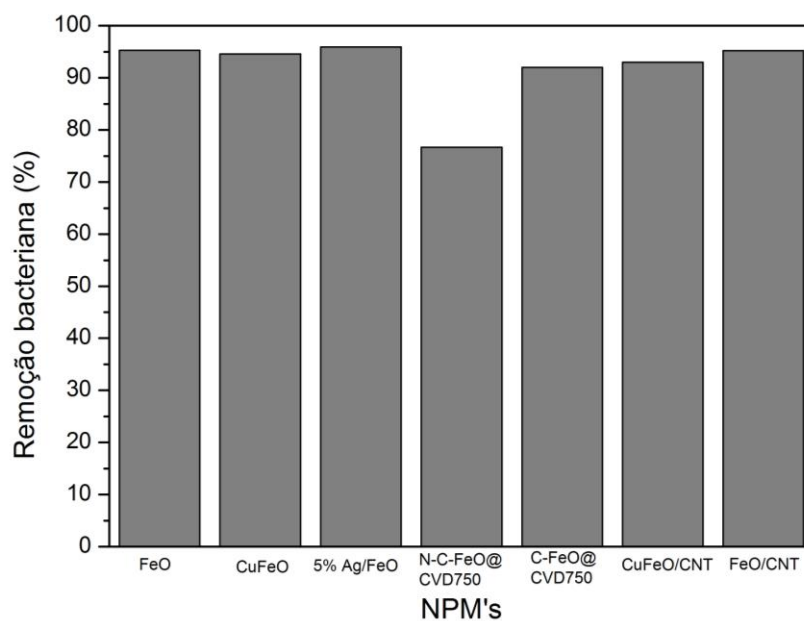


Figura 19-Resultados da eficiência de remoção bacteriana (%) para os ensaios com a bactéria *S.aureus*

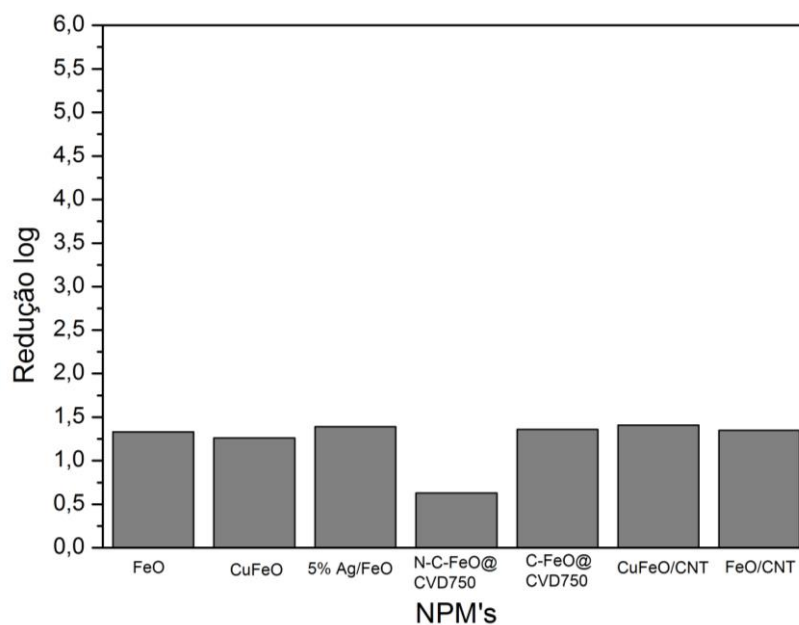


Figura 20- Resultados da redução log para os ensaios com a bactéria *S.aureus*

A comparação dos valores obtidos para os ensaios com a *E.coli* apenas foi possível para as NPM's de C-FeO@CVD750, CuFeO/CNT e 5% Ag/FeO e os resultados encontram-se presentes na Tabela 14.

Tabela 14- Resultados de remoção bacteriana e redução log obtidos para as NPM's de C-FeO@CVD750, CuFeO/CNT e 5% Ag/FeO quando em contacto com uma suspensão bacteriana de *E.coli* e *S.aureus* (tempo de contacto de 1 min e concentração de NPM's de 50 mg/ml)

	<u>Suspensão <i>E.coli</i></u>		<u>Suspensão <i>S.aureus</i></u>	
	% Remoção bacteriana	Redução log	% Remoção bacteriana	Redução log
C-FeO@CVD750	99,4	2,11	92,0	1,36
CuFeO/CNT	100	2,97	93,0	1,41
5% Ag/FeO	96,7	1,5	95,9	1,39

Para as NPM's de FeO, CuFeO e N-C-FeO@CVD750 é possível observar pelos gráficos que os valores de redução logarítmicos de bactérias foram bastante baixos apesar das elevadas percentagens de remoção bacteriana.

Através dos valores presentes na Tabela 14 é possível verificar que existe uma pequena perda de eficiência das NPM's quando comparado com os valores obtidos nos ensaios com a suspensão bacteriana de *E.coli*. As nanopartículas que apresentaram uma menor discrepância nos valores obtido para as duas suspensões foram as de 5% Ag/FeO

Desta forma, tendo em conta os resultados obtidos nos ensaios realizados em reator fechado, foram seleccionadas as NPM's de CuFeO/CNT e C-FeO@CVD750 como sendo as mais promissoras para a remoção bacteriana, tanto de *E.coli* como de *S.aureus*, tendo sido estas as únicas utilizadas nos ensaios em reator contínuo. Apesar de para a suspensão bacteriana de *S.aureus* as NPM's de C-FeO@CVD750 não terem apresentado os resultados mais promissores estas foram das mais eficientes aquando os ensaios em reator fechado para a suspensão bacteriana de *E.coli* e por essa razão decidiu-se prosseguir com a sua utilização. No que diz respeito às nanopartículas de 5% Ag/FeO, apesar de apresentarem bons resultados para a *S.aureus*, mostraram resultados muito ambíguos para os ensaios realizados com a *E.coli* pelo que se decidiu não avançar com estas nanopartículas magnéticas para os ensaios em contínuo.

4.3 ENSAIOS EM CONTÍNUO

Os ensaios em contínuo foram realizados para as partículas que se mostraram mais promissoras aquando a realização dos ensaios em reator fechado sendo avaliadas aquelas que mostraram boas eficiências tanto na remoção de *E.coli* como de *S.aureus*. As nanopartículas seleccionadas foram as de C-FeO@CVD750 e CuFeO@CNT e foram realizados, ao todo, 7 ensaios como definido no procedimento nas secções 3.4.1 e 3.4.2 (6 ensaios com a presença de NPM's e 1 ensaio de controlo).

O ensaio de controlo realizado na ausência de nanopartículas magnéticas no reator revelou a existência de diminuição de densidade bacteriana na suspensão recolhida na saída do reator. Uma das razões que pode ter levado à diminuição de densidade bacteriana, mesmo na ausência de NPM's, está relacionada com a existência de uma membrana na entrada e saída da coluna que podem ter aprisionado algumas bactérias resultando na diminuição da densidade bacteriana. Os resultados obtidos para o ensaio de controlo encontram-se apresentados na Figura 21.

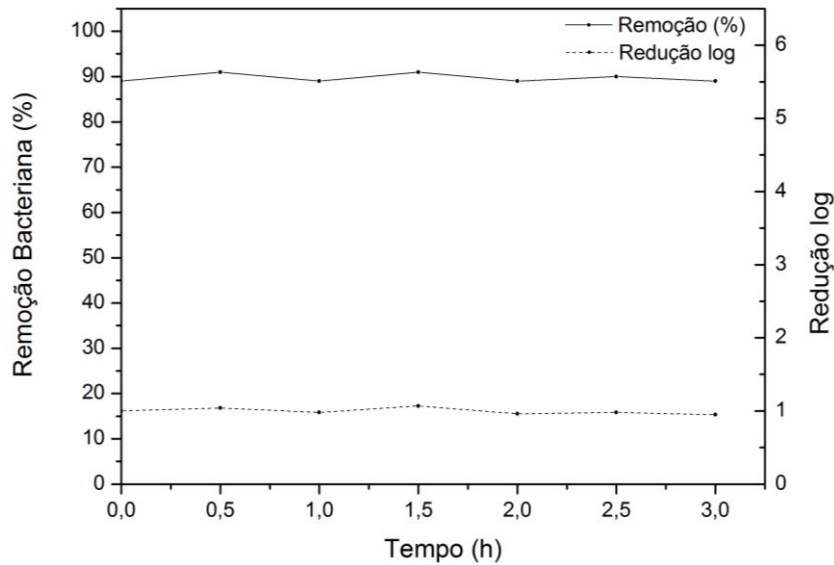


Figura 21- Ensaio de controlo realizado na ausência de NPM's na coluna

Os gráficos com os resultados de todos os ensaios realizados em contínuo na presença de nanopartículas magnéticas encontram-se nas Figuras 22 a 24.

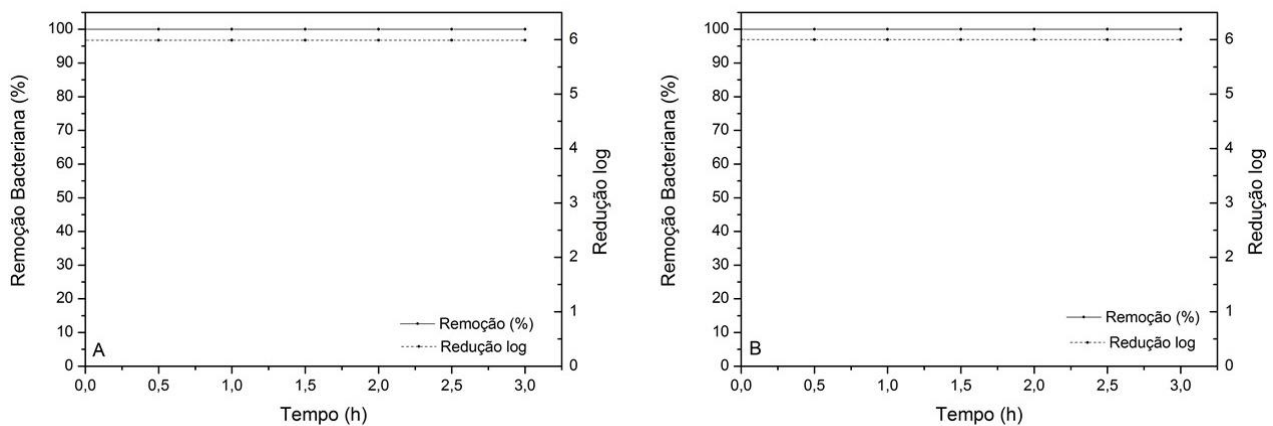


Figura 22- Eficiência de remoção (%) e redução log de *E.coli* para as nanopartículas de (A) C-FeO@CVD750 e (B) CuFeO/CNT no reator em contínuo

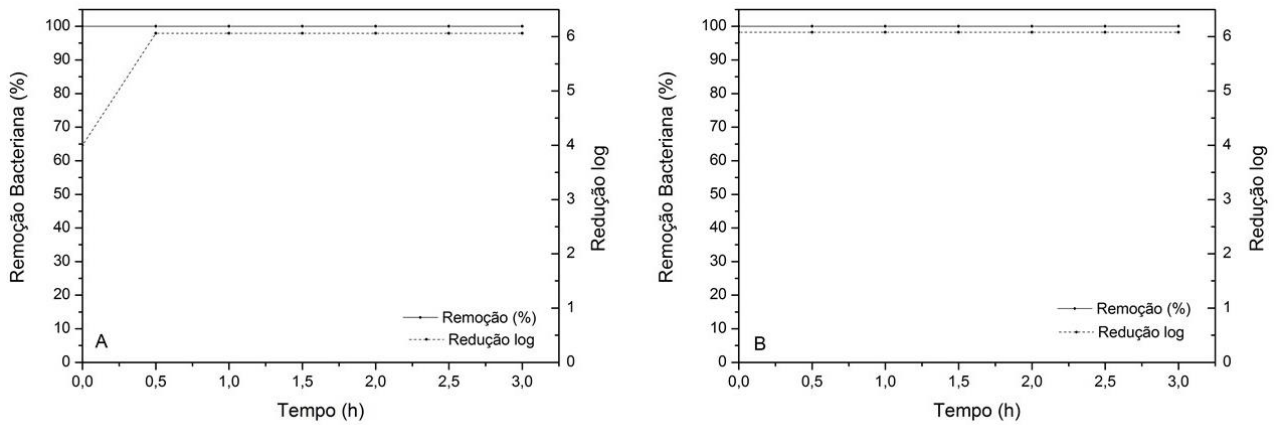


Figura 23- Eficiência de remoção (%) e redução log de *S. aureus* para as nanopartículas de (A) C-FeO@CVD750 e (B) CuFeO/CNT no reator em contínuo

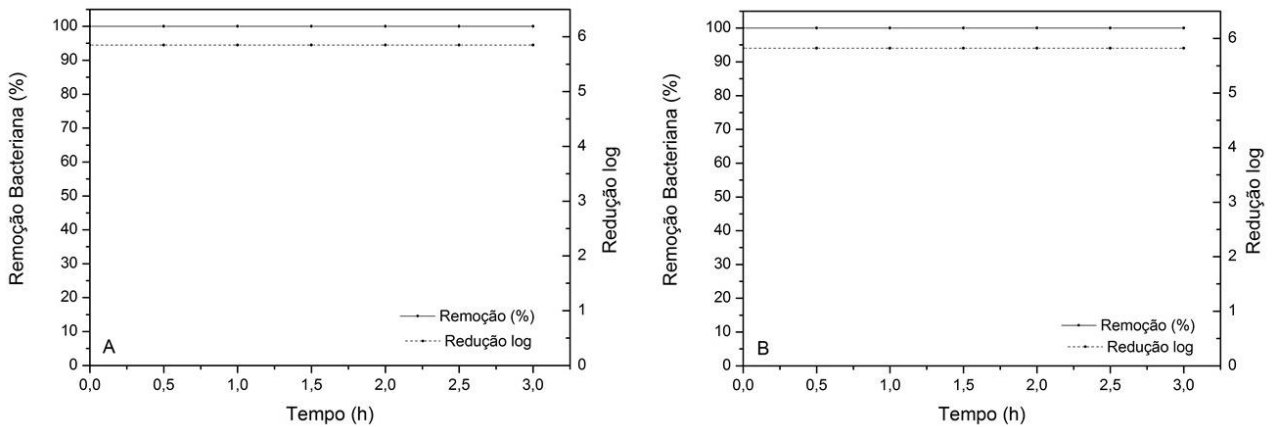


Figura 24- Eficiência de remoção (%) e redução log de uma suspensão mista (*E. coli*+*S. aureus*) para as nanopartículas de CuFeO/CNT em reator contínuo para tempos de contacto de (A) 1 min e (B) 30 s

Como é possível observar na Figura 22 as eficiências de remoção registadas para todos os ensaios com as duas NPM's (C-FeO@CVD750 e CuFeO/CNT) foram de 100% sendo as eficiências de redução log também máximas o que significa que não foi possível obter contagens nas placas de espalhamento dos ensaios realizados.

Através dos resultados obtidos com a *S. aureus* (Figura 23) é possível verificar que a eficiência de remoção para esta bactéria é ligeiramente menor do que para a *E. coli* como já se tinha verificado na secção 4.2.3 durante a realização dos ensaios em reator fechado. Esta conclusão baseia-se na observação do gráfico presente na Figura 23 (A) onde no início do tratamento se registam valores de redução log ligeiramente abaixo do valor máximo atingido durante o restante tempo de tratamento.

De realçar que, para os ensaios com a *E.coli* e *S.aureus*, as NPM's se mantêm estáveis durante pelo menos 3 h, correspondente a 180 tempos de passagem, não se verificando qualquer desativação das partículas durante esse tempo.

Para os ensaios realizados com uma suspensão mista (Figura 24) é possível observar que, para um tempo de contacto de 1 min, se obtêm eficiências de remoção elevadas (5,85 log) ao longo de todo o ensaio apesar da presença dos dois tipos de bactérias. Verifica-se assim que não ocorre uma remoção preferencial de uma bactéria em detrimento da outra sendo ambas removidas completamente da suspensão. Confirmou-se também que as partículas são estáveis durante pelo menos 360 tempos de passagem (30 s) sendo a eficiência de remoção máxima mesmo para tempos de contacto mais curtos (Figura 24 (B)).

Face aos resultados obtidos, é possível observar que apesar de existir uma diminuição de densidade bacteriana da suspensão inicial quando atravessa o reator na ausência de NPM's (Figura 21), é possível a remoção total das bactérias quando estas são incluídas no processo de tratamento. Assim, é possível concluir que as nanopartículas utilizadas nos ensaios em contínuo foram eficazes na remoção bacteriana da suspensão utilizada para tempos de contacto reduzidos (1 min e 30 s), indicando que em condições reais podem ser utilizadas continuamente durante longos períodos sem comprometerem a eficácia do tratamento.

4.4 ENSAIOS DE LIXIVIAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Durante a realização dos ensaios em contínuo, foi possível verificar que as NPM's de C-FeO@CVD750 lixiviavam durante o processo. Desta forma, foram realizados ensaios de lixiviação para averiguar se os metais presentes nas NPM's lixiviavam quando em contacto com a suspensão bacteriana testada. No Anexo 4 está presente uma imagem que permite a comparação da cor entre duas suspensões tratadas com as NPM's de C-FeO@CVD750 e CuFeO/CNT.

As condições experimentais que se utilizaram para a obtenção da solução a analisar foram as que se revelaram mais promissoras para a remoção bacteriana tendo em conta os ensaios em reator fechado, exceto o tempo de contacto que foi de 3 h de forma a simular os ensaios em contínuo. As partículas utilizadas nestes ensaios foram as de C-FeO@CVD750 e CuFeO/CNT.

Os resultados obtidos encontram-se representados na Tabela 15.

Tabela 15- Resultados dos ensaios de lixiviação para as NPM's de C-FeO@CVD750 e CuFeO/CNT

NPM's	Concentração NPM's (mg/ml)	Tempo de contacto	Concentração (mg/L)	
			Fe	Cu
<u>C-FeO@CVD750</u>	50	3 h	27,9	-
<u>CuFeO/CNT</u>			4,26	1,32

Pela análise dos valores presentes na Tabela 15 é possível concluir que as nanopartículas de C-FeO@CVD750 lixiviavam quando em contacto com a suspensão bacteriana. Sendo o objetivo deste trabalho a aplicação de nanomateriais para a desinfecção de água para consumo humano procura-se que a técnica aplicada não introduza qualquer tipo de alteração física ou química na água. Desta forma, as NPM's de C-FeO@CVD750 não seriam as mais adequadas visto que libertam uma grande concentração de ferro para a água.

4.5 ENUMERAÇÃO DAS CÉLULAS VIVAS E MORTAS - ANÁLISES COM O KIT LIVE/DEAD

Os ensaios com o kit Live/Dead foram realizados para as nanopartículas mais promissoras na remoção bacteriana, estando estas em contacto com as duas suspensões bacterianas estudadas (*E.coli* e *S.aureus*). O tempo de contacto da suspensão bacteriana com as NPM's foi de 1 min para uma concentração de 50 mg NPM's/mL, sendo estas as condições estabelecidas como as mais favoráveis.

Para a realização deste ensaio utilizou-se a suspensão que esteve diretamente em contacto com as NPM's, não tendo sido necessário diluir a suspensão. O ensaio de controlo das duas suspensões bacterianas foi também realizado, não só como controlo da suspensão de trabalho, mas, também, como para avaliar a remoção das bactérias antes e após o tratamento.

É de salientar que as imagens recolhidas são apenas representativas da eficiência de remoção dos ensaios em reator fechado, sendo o objetivo verificar se de facto as células bacterianas morrem, ou não, na presença das nanopartículas.

4.5.1 Ensaio com a suspensão bacteriana de *E.coli*

As Figuras seguintes mostram as imagens obtidas através do microscópio de fluorescência para as amostras recolhidas após o tratamento da suspensão bacteriana de *E.coli*, em reator fechado, para os catalisadores C-FeO@CVD750, CuFeO@CNT e 5% Ag/FeO.

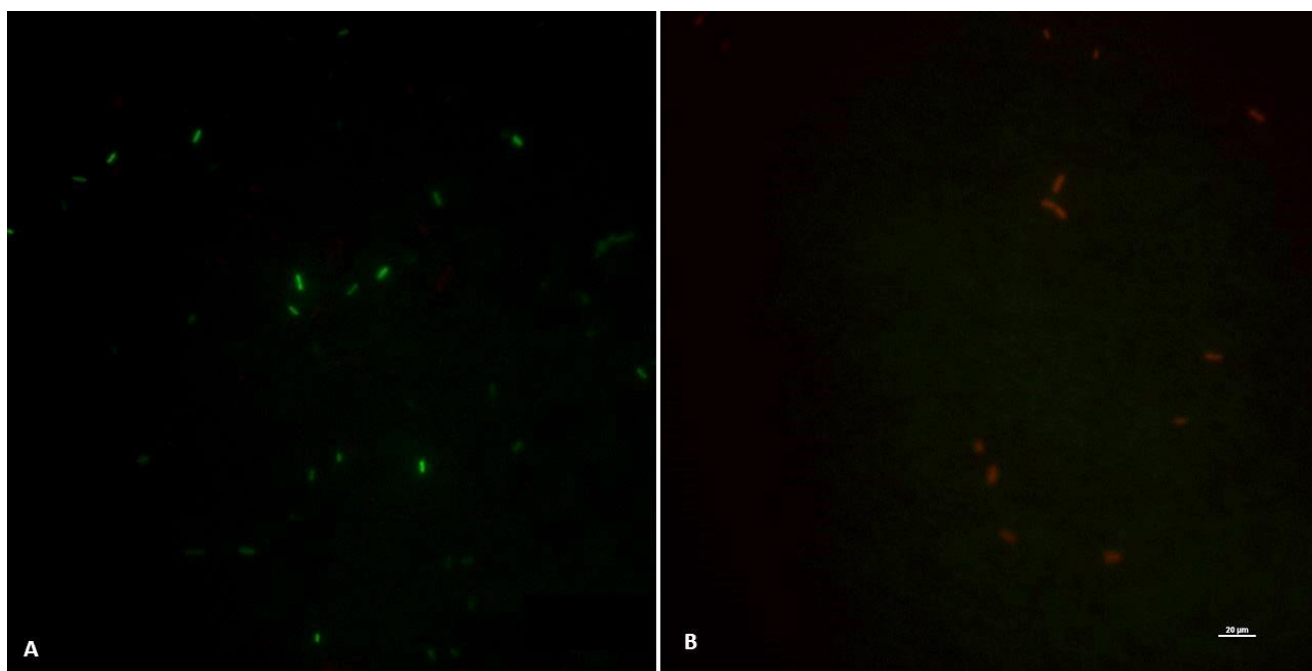


Figura 25- Imagens obtidas no microscópio de fluorescência para a suspensão bacteriana de *E.coli* antes (A) e após o tratamento com nanopartículas magnéticas de C-FeO@CVD750

A Figura 25 é uma representação das células bacterianas antes e após o tratamento com as nanopartículas magnéticas de C-FeO@CVD750. Como é possível observar pela Figura 25 (A), que representa uma imagem do controlo da suspensão bacteriana de *E.coli* utilizada nos ensaios, existe uma quantidade significativa de células vivas (coradas de verde) quando em comparação com a Figura 27 (B), que representa a suspensão bacteriana após o tratamento com as NPM's.

É possível verificar que houve remoção bacteriana quando a suspensão foi colocada em contacto com as nanopartículas magnéticas de C-FeO@CVD750. No entanto, não é possível afirmar que todas as células bacterianas foram mortas pois, uma vez que durante a realização do ensaio L/D para além de não existirem células coradas de verde (células vivas), verificou-se que a densidade bacteriana de células mortas era muito menor do que a que foi possível observar no ensaio de controlo. Desta forma, é possível que muitas das bactérias presentes na suspensão não sejam eliminadas, mas fiquem agregadas nas NPM's durante a sua ação o que não garante, de todo, a sua morte, mas sim a sua remoção da suspensão.

Uma das dificuldades observadas durante a realização dos ensaios com o kit L/D foi a presença de nanopartículas na amostra recolhida para o ensaio o que, muitas vezes, dificultava a observação das células bacterianas de forma nítida. Mesmo utilizando um íman para a separação das nanopartículas da suspensão era muito difícil garantir a separação total devido à reduzida granulometria das NPM's utilizadas durante os ensaios.

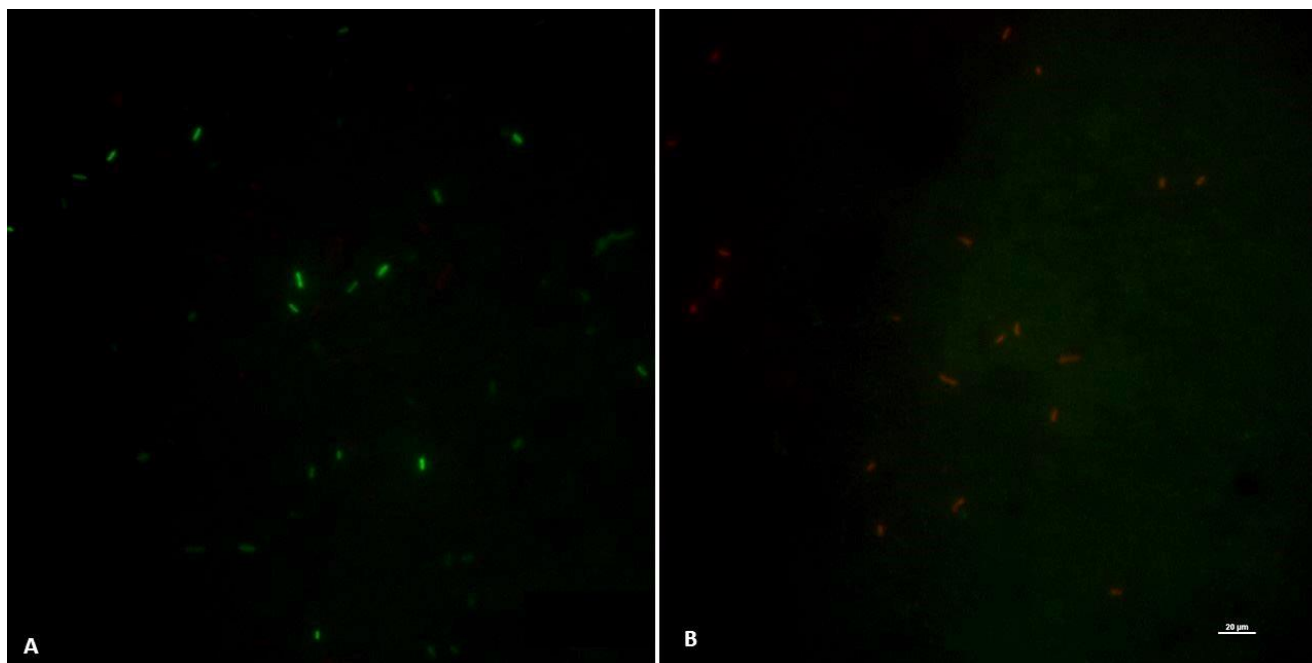


Figura 26- Imagens obtidas no microscópio de fluorescência para a suspensão bacteriana de *E.coli* antes (A) e após o tratamento com nanopartículas magnéticas de 5% Ag/FeO

A Figura 26 representa a comparação da suspensão bacteriana antes (A) e após (B) o tratamento com nanopartículas magnéticas de 5%Ag/FeO. Mais uma vez, não foi possível a observação de células coradas de verde (células vivas) e a densidade bacteriana de células mortas era muito menor do que aquela que era possível observar no ensaio de controlo. No entanto, durante a realização do ensaio, foi possível analisar, no microscópio de fluorescência, todo o filtro com a suspensão analisada e foi possível observar que a densidade de células mortas na suspensão que esteve em contacto com as NPM's de 5% Ag/FeO era bastante superior à densidade de células mortas observada na suspensão que esteve em contacto com as NPM's de C-FeO@CVD750. A explicação para este fenómeno poderá estar relacionada com o efeito antibacteriano que a prata tem nas células bacterianas que leva à rutura da membrana das mesmas provocando a sua morte [63,45]. Desta forma, é possível que se observem mais células mortas na suspensão bacteriana que esteve em contacto com as NPM's de 5% Ag/FeO, no entanto, a densidade bacteriana continua a ser muito inferior o que leva a crer que as bactérias possam ter sido adsorvidas pelas NPM's.

Uma forma de averiguar o que de facto acontece às células bacterianas em suspensão seria a realização de ensaios por microscopia eletrónica de varrimento (SEM), com a devida preparação da amostra, para averiguar se as bactérias se encontram agregadas às nanopartículas magnéticas.

As nanopartículas de CuFeO/CNT também foram utilizadas para a realização dos ensaios com o kit Live/Dead, no entanto, devido à impossibilidade de remoção completa das NPM's da suspensão, não foi possível a observação das células bacterianas com o microscópio de fluorescência pois as nanopartículas sobrepunham-se às células bacterianas observando-se apenas um manto prateado representativo das NPM's.

4.5.2 ENSAIOS COM A SUSPENSÃO BACTERIANA DE *S.AUREUS*

Para a suspensão bacteriana de *S.aureus* foram realizados ensaios com as nanopartículas de C-FeO@CVD750 e CuFeO@CNT.

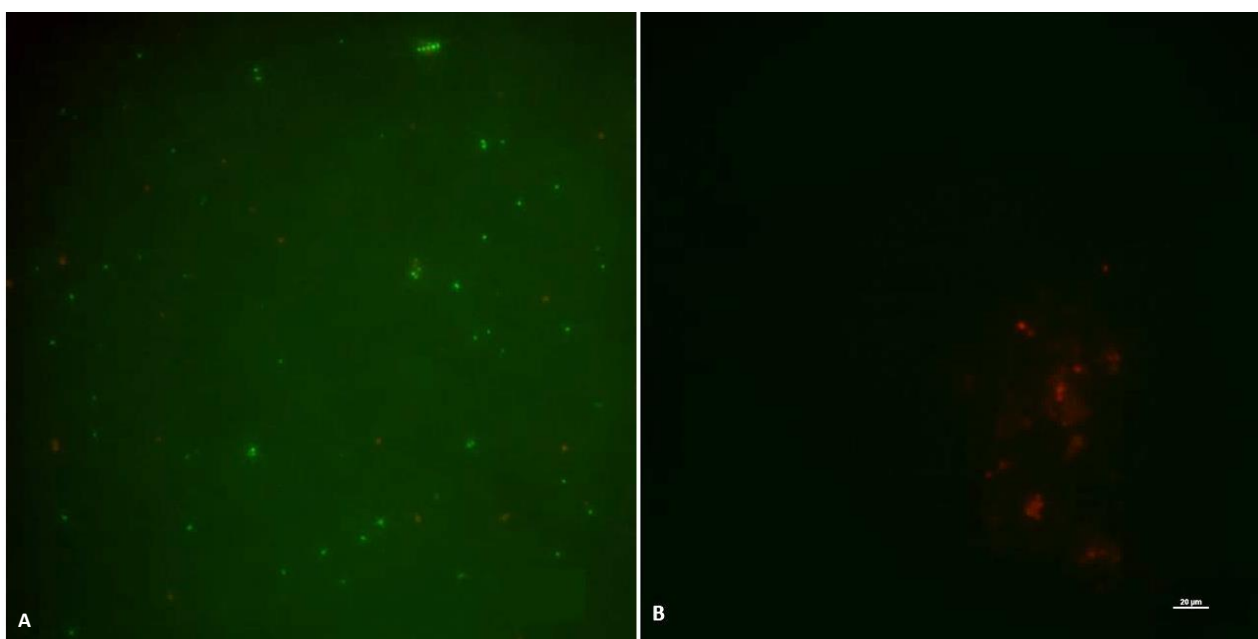


Figura 27- Imagens obtidas no microscópio de fluorescência para a suspensão bacteriana de *S.aureus* antes (A) e após (B) o tratamento com nanopartículas magnéticas de C-FeO@CVD750

A Figura 27 (A) representa o controlo da suspensão bacteriana de *S.aureus* observando-se uma grande densidade de células coradas de verde e muito poucas coradas de vermelho. Comparando esta Figura com a Figura 27 (B), que representa a suspensão bacteriana após o tratamento com as nanopartículas magnéticas de C-FeO@CVD750 é possível, mais uma vez, observar células mortas, no entanto, como anteriormente observado, em muita menor densidade do que no ensaio de controlo realizado. Mais uma vez, a causa para esta diminuição de densidade bacteriana após o tratamento pode estar relacionada com a adsorção das bactérias às nanopartículas.

A observação de células bacterianas após o tratamento com partículas de C-FeO@CVD750 foi muito difícil devido à existência de partículas na suspensão utilizada no ensaio.

À semelhança do que aconteceu com o ensaio realizado com as nanopartículas de CuFeO/CNT com a suspensão de *E.coli*, também para este caso, com a suspensão bacteriana de *S.aureus*, não foi possível a obtenção de imagens perceptíveis devido à presença de nanopartículas que se sobrepunham às células bacterianas.

4.6 ANÁLISES DE MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO (SEM)

Tendo em conta a perda de densidade bacteriana observada nos ensaios com o kit Live/Dead, realizaram-se ensaios de microscopia eletrónica de varrimento com o objetivo de averiguar se existiria adsorção das células bacterianas às NPM's durante o processo de tratamento. Foram recolhidas imagens das NPM's consideradas mais eficientes antes e após o tratamento das duas suspensões bacterianas utilizadas (*E.coli* e *S.aureus*). As imagens obtidas encontram-se apresentadas nas Figuras 28 a 30.

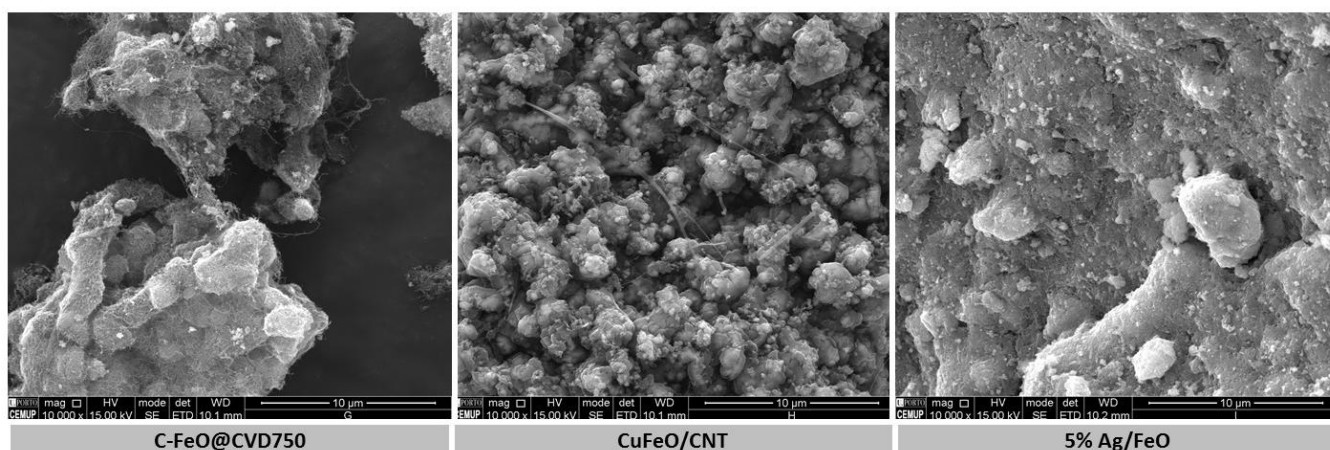


Figura 28- Imagens obtidas através de análise SEM para as NPM's de C-FeO@CVD750, CuFeO/CNT e 5% Ag/FeO antes do contacto com as suspensões bacterianas

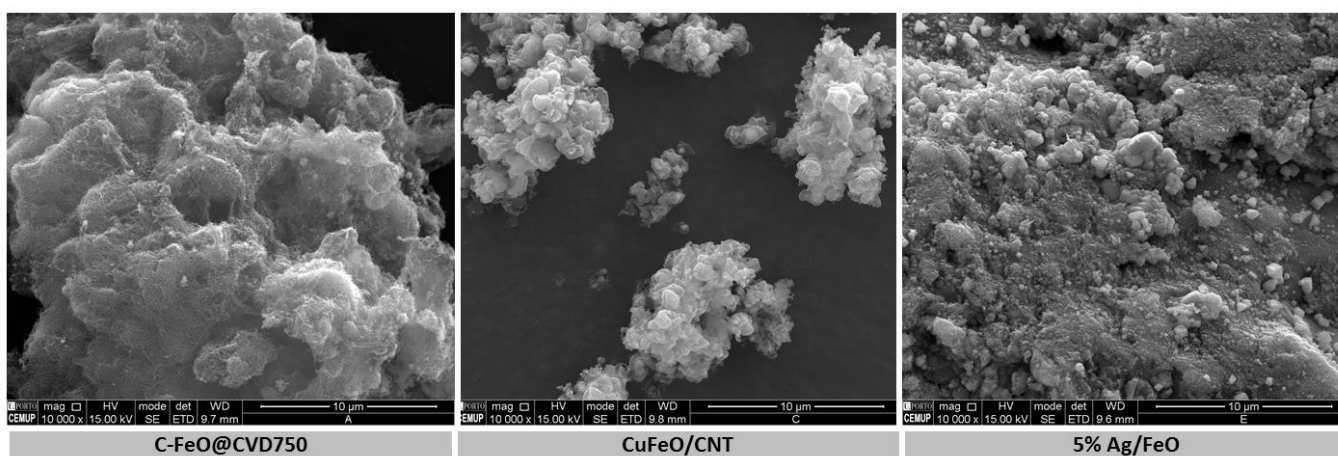


Figura 29- Imagens obtidas através de análise SEM para as NPM's de C-FeO@CVD750, CuFeO/CNT e 5% Ag/FeO após o contacto com a suspensão bacteriana de *E.coli*

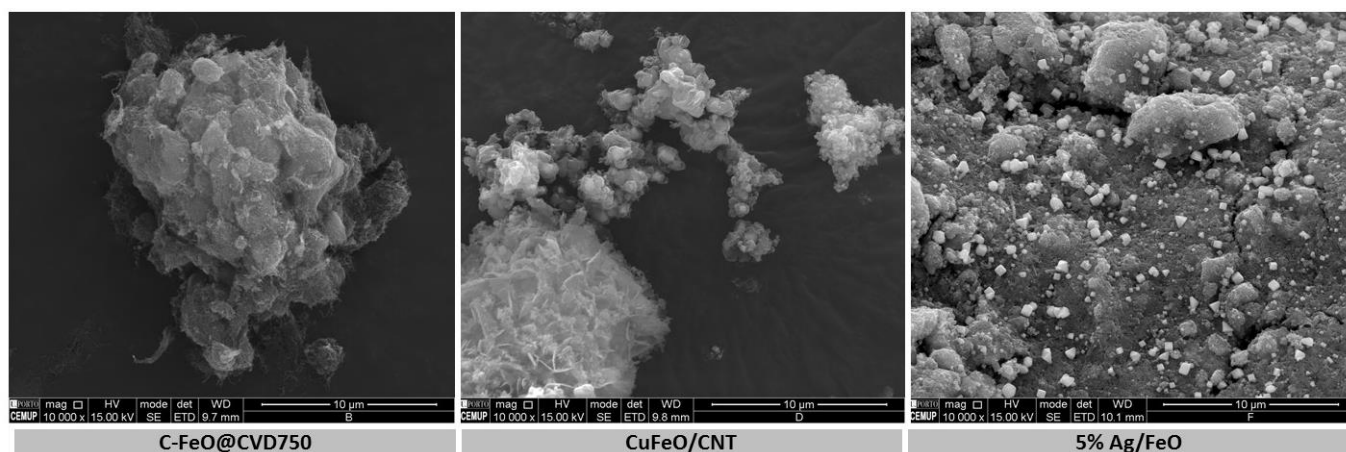


Figura 30- Imagens obtidas através de análise SEM para as NPM's de C-FeO@CVD750, CuFeO/CNT e 5% Ag/FeO após o contacto com a suspensão bacteriana de *S.aureus*

Nas imagens obtidas não foi possível observar nenhuma bactéria adsorvida às NPM's, não sendo por isso possível avaliar se as células bacterianas aderem ou não às NPM's. Tendo em conta os resultados obtidos em reator fechado, para as condições utilizadas nestes ensaios (tempo de contacto de 1 min e concentração de NPM's de 50 mg/ml) seria de esperar que a suspensão após o tratamento apresentasse uma densidade bacteriana na ordem dos $10^3 / 10^4$ UFC/ml pelo que, o facto de não ser possível a observação de nenhuma bactéria mesmo na membrana utilizada para a preparação das NPM's para a análise, constitui uma grande incoerência sendo praticamente impossível não se observar uma maior densidade bacteriana, mesmo que não estejam adsorvidas às nanopartículas. Desta forma, os ensaios de SEM deveriam ser repetidos com uma nova preparação das NPM's e com controlos de cada uma das suspensões bacterianas utilizadas de forma a ser possível obter resultados mais credíveis e concluir sobre a adsorção das células bacterianas às NPM's

No entanto, comparando as imagens obtidas antes e após o tratamento com as NPM's é possível concluir que a sua aplicação não leva a alterações na estrutura das nanopartículas excluindo o caso específico observado para as NPM's de 5% Ag/FeO que, após o tratamento, apresentam as partículas de prata mais expostas. Este efeito deverá estar relacionado com uma possível lixiviação do óxido de ferro durante o processo de tratamento.

5 CONCLUSÃO

Tendo em conta os resultados experimentais obtidos podem ser estabelecidas as seguintes conclusões quanto ao trabalho realizado:

- Foram sintetizados 8 materiais com propriedades distintas;
- De uma forma geral, todas as NPM's apresentaram elevados valores de eficiência de remoção bacteriana. No entanto, apesar de se obter valores de eficiência de remoção de 100 %, estes não correspondiam a valores de redução log máximos pelo que as bactérias não eram completamente eliminadas;
- De entre todas as NPM's sintetizadas, as que se revelaram mais eficientes, após a realização dos ensaios cinéticos em reator fechado, tendo em conta os valores de redução log obtidos e a eficiência das mesmas para tempos de contacto mais curtos foram, as NPM's de C-FeO@CVD750, CuFeO/CNT e 5% Ag/FeO. No entanto, para tempos de contacto superiores a 5 min foram observadas alterações na morfologia das colónias de *E.coli* que estiveram em contacto com as NPM's de 5% Ag/FeO mostrando sinais representativos do stress oxidativo que a presença destas nanopartículas podem provocar nas bactérias;
- Os ensaios de avaliação da influência da concentração das nanopartículas magnéticas foram realizados para o tempo de contacto de 1 min para as três nanopartículas que se revelaram mais promissoras (C-FeO@CVD750, CuFeO/CNT e 5% Ag/FeO) após a realização dos ensaios cinéticos e, permitiram concluir que as NPM's de CuFeO/CNT são as mais eficazes na remoção bacteriana atingindo uma eficiência de 100 % para uma concentração de 50 mg NPM's/mL. Esta eficiência corresponde a um valor de redução log de 2,97 sendo o valor mais alto atingido para estes ensaios.
- Para os ensaios de influência da concentração de NPM's com as partículas de 5% Ag/FeO foi possível, mais uma vez, observar alterações na morfologia das colónias para concentração iguais ou superiores a 16 mg NPM's/mL;

- Foram realizados ensaios utilizando as nanopartículas magnéticas sintetizadas com uma suspensão da bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* observando-se, de uma forma geral para todas as NPM's, uma pequena perda de eficiência de remoção bacteriana quando comparados os resultados obtidos nas mesmas condições, para a suspensão bacteriana de *E.coli*;

- Nos ensaios em contínuo foi possível obter valores de eficiência de remoção bacteriana de 100 % correspondentes a valores de redução log máximos. No entanto, para o ensaio de controlo realizado para o reator em modo contínuo foi possível observar uma perda de densidade bacteriana após a suspensão atravessar o sistema. Uma das justificações para esta perda de densidade pode estar relacionada com a existência de membranas na entrada e saída do reator que podem ser responsáveis pela captura de algumas bactérias da suspensão quando esta atravessa o sistema. Contudo, mesmo observando-se uma perda de densidade bacteriana, todas as outras bactérias que são capazes de atravessar o sistema, quando na presença de NPM's no reator, são eliminadas/retidas não estando presentes na solução à saída do sistema. Foi, também, possível observar que as NPM's são estáveis mantendo a atividade e a eficácia do tratamento após 180 (1 min) e 360 (30 s) tempos de passagem.

- Os ensaios com o kit Live/Dead permitiram concluir que, depois de a suspensão bacteriana estar em contacto com as nanopartículas durante 1 min existe uma diminuição de densidade bacteriana na suspensão final o que sugere que as bactérias tenham ficado adsorvidas às nanopartículas. No entanto, mesmo registando-se esta diminuição de densidade, foi possível observar que todas as células bacterianas estavam mortas depois do contacto com as NPM's.

- Com o objetivo de averiguar se após o tratamento as células bacterianas ficavam adsorvidas às NPM's, realizaram-se análises de microscopia eletrónica de varrimento que se revelaram inconclusivas pois não foi possível a observação de nenhuma bactéria adsorvida às NPM's nem nas membranas utilizadas na preparação das mesmas. Tendo em conta a densidade bacteriana da suspensão utilizada (10^6 UFC/ml) é praticamente impossível não se observar a presença de bactérias nas imagens.

6 PERSPETIVAS FUTURAS

Tendo em conta os resultados obtidos é possível definir alguns procedimentos para que seja possível o avanço dos estudos relativos a esta tecnologia:

- Tendo em conta que a granulometria das nanopartículas magnéticas é um fator importante para a eficiência bacteriana a realização de ensaios com NPM's de granulometria mais reduzida poderia demonstrar resultados interessantes;
- Otimização do processo de síntese das nanopartículas de N-C-FeO@CVD750 que foram as que mostraram mais discrepâncias nos resultados dos ensaios de caracterização tendo em conta a literatura;
- Otimização das nanopartículas de 5% Ag/FeO de forma a obter resultados de remoção bacteriana mais coerentes com estas, como por exemplo, aumentar o teor de prata presente nas partículas;
- Realização de ensaios com suspensões com diferentes bactérias e diferentes concentrações das mesmas;
- Realização de testes de toxicidade com o objetivo de averiguar a viabilidade da água tratada;
- Comparação da performance obtida para as NPM's mais promissoras com a eficiência registada para a remoção bacteriana com o carvão ativado comercial;
- Ensaios com mistura de diferentes nanopartículas magnéticas de modo a averiguar a eficiência de remoção bacteriana;
- Realização de ensaios em reator contínuo com maior duração de forma a averiguar até que ponto se registam eficiência de remoção bacteriana máximas correspondentes a valores de redução logarítmicos de bactérias máximos e de forma a testar a durabilidade e estabilidade das NPM's;

- Realização de uma avaliação de custo de preparação do material utilizado no tratamento;
- Aplicação da técnica em sistemas com maiores dimensões e utilizando amostras de água reais de forma a averiguar se os resultados promissores obtidos nos ensaios laboratoriais se confirmam num sistema real;
- Realização de estudos relativos à reutilização do material utilizado no tratamento. Averiguar de que forma a regeneração do material pode ser realizada e quais os custos associados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Qu X, Alvarez PJJ. *Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment. Water Res.* 2013;47(12): p.3931-3946.
2. Gehrke I, Geiser A, Somborn-Schulz A. *Innovations in nanotechnology for water treatment. Nanotechnol Sci Appl.* 2015;8: p.1-17.
3. Shannon MA, Bohn PW, Elimelech M, Georgiadis JG, Mariñas BJ, Mayes AM. *Science and technology for water purification in the coming decades. Nature.* 2008;452(7185): p. 301-310.
4. Ashbolt NJ. *Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. Toxicology.* 2004;198(1-3): p. 229-238.
5. Cabral JPS. Water microbiology. *Bacterial pathogens and water. Int J Environ Res Public Health.* 2010;7(10): p. 3657-3703.
6. Lewis DL, Gattie DK. *Pathogen risks from applying sewage sludge to land. Environ Sci Technol.* 2002;1(13): p. 287-293.
7. EPA. *Water Treatment Manual : Disinfection.* The Environmental Protection Agency-Ireland; 2013: p. 1-200.
8. Brandt MJ, Johnson KM, Elphinston AJ, Ratnayaka DD. *Disinfection of Water.*; 2017.
9. Meyer ST. *O Uso de Cloro na Desinfecção de Águas , a Formação de Trihalometanos e os Riscos Potenciais à Saúde Pública. Cad Saúde Públ.* 1994;10(1): p. 99-110.
10. Sun YX, Wu QY, Hu HY, Tian J. *Effects of operating conditions on THMs and HAAs formation during wastewater chlorination. J Hazard Mater.* 2009;168(2-3): p. 1290-1295.
11. Daniel LA. *Métodos Alternativos de Desinfecção da Água.* 2001: p. 1-139.
12. Biryukov AS, Gavrikov VF, Nikiforova LO, Shcheglov VA. *New Physical Methods of Disinfection of Water.* 2005;26(1): p. 13-25.
13. Constanza Cortés RM. *Genotoxicity of disinfection byproducts and disinfected waters: A review of recent literature. In: Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. ; 2017: p. 1-12.*
14. Du Y, Lv XT, Wu QY, et al. *Formation and control of disinfection byproducts and toxicity during reclaimed water chlorination: A review. J Environ Sci.* 2017;58: p. 51-63.
15. Snowden-swan L, Snowden-swan L, Piatt J. *Disinfection Technologies for Potable Water and Wastewater Treatment : Alternatives to Chlorine Gas Disinfection Technologies for Potable Water and Wastewater Treatment : Alternatives to Chlorine Gas.*; 1998;2: p. 1-408.
16. USEPA. *Ultraviolet Light Disinfection Technology in Drinking Water Application - An*

- Overview. 1996;(September): p. 1-266.
17. O'Connor K. *Evaluation of ultraviolet (UV) technologies for wastewater*. 2004: p. 1-128.
 18. Hamed Sobhani HS. *Effects of number of low-pressure ultraviolet lamps on disinfection performance of a water reactor*. *J Water Process Eng*. 2017;20: p. 97-105.
 19. Madaeni S. S. *The application of membrane technology for water disinfection*. *Water Res*. 1999;33(2): p. 301-308.
 20. Li Q, Mahendra S, Lyon DY, et al. *Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications*. *Water Res*. 2008;42(18): p. 4591-4602.
 21. Tiwari DK, Behari J, Sen P. *Application of Nanoparticles in Waste Water Treatment*. *Carbon Nanotub*. 2008;3(3): p. 417-433.
 22. Ofori I, Maddila S, Lin J, Jonnalagadda SB. *Ozone initiated inactivation of Escherichia coli and Staphylococcus aureus in water: Influence of selected organic solvents prevalent in wastewaters*. *Chemosphere*. 2018;206: p. 43-50.
 23. Amin MT, Alazba a a, Manzoor U. *A review on removal of pollutants from water / wastewater using different types of nanomaterials*. *Adv Mater Sci Eng*. 2014;
 24. Savage N, Diallo MS. *Nanomaterials and water purification: Opportunities and challenges*. *J Nanoparticle Res*. 2005;7(4-5): p. 331-342.
 25. Al-Jumaili A, Alancherry S, Bazaka K, Jacob M V. *Review on the antimicrobial properties of Carbon nanostructures*. *Materials (Basel)*. 2017;10(9): p. 1-26.
 26. Hong H, Widener C, Hong H, Christensen G, Widener C. *Carbon nanotube grease and sustainable manufacturing Costing models for capacity optimization in Industry 4 . 0 : Trade-off between used capacity and operationa*. *Procedia Manuf*. 2018;21(2017): p. 623-629.
 27. Zuo L. Carbon Nanotubes: The future of the Planet's Freshwater. <https://ysjournal.com/carbon-nanotubes-the-future-of-the-planets-freshwater/>. Published 2018. Accessed April 3, 2018.
 28. Das R, Abd Hamid SB, Ali ME, Ismail AF, Annuar MSM, Ramakrishna S. *Multifunctional carbon nanotubes in water treatment: The present, past and future*. *Desalination*. 2014;354: p. 160-179.
 29. Sustainable Nano a blog by the C for SN. Carbon Nanotubes: the Next Generation of Global Water Purification? <http://sustainable-nano.com/author/ecaudill/>. Accessed April 3, 2018.
 30. Anthony DB, Sui X, Kellersztein I, et al. *Continuous carbon nanotube synthesis on charged carbon fibers Nanostructured Hierarchical Assemblies and Composites (NanoHAC) Group*

- , Department of Chemistry , Imperial College London , South Kensington Campus , London SW7 2AZ , UK Polymer and Composite. *Compos Part A*. 2018.
31. Das R, Ali ME, Hamid SBA, Ramakrishna S, Chowdhury ZZ. *Carbon nanotube membranes for water purification: A bright future in water desalination*. *Desalination*. 2014;336(1): p. 97-109.
 32. Abbasi E, Aval SF, Akbarzadeh A, et al. *Dendrimers: Synthesis, applications, and properties*. *Nanoscale Res Lett*. 2014;9(1): p. 1-10.
 33. Raval HD, Gohil JM. Nanotechnology in water treatment: an emerging trend. *Int J Nucl Desalin*. 2010;4(2): p. 1-184.
 34. Segneanu AE, Orbeci C, Lazau C, et al. Natural zeolites in water treatment- how effective is their use. *Web Sci*. 2013: p. 1-29.
 35. Wang S, Peng Y. *Natural zeolites as effective adsorbents in water and wastewater treatment*. *Chem Eng J*. 2010;156(1): p. 11-24.
 36. Delkash M, Ebrazi Bakhshayesh B, Kazemian H. *Using zeolitic adsorbents to cleanup special wastewater streams: A review*. *Microporous Mesoporous Mater*. 2015;214: p. 224-241.
 37. B. Dong, a, b S. Belkhair, c M. Zarrou, a L. Fisher, c J. Verran, c L. Tosheva,*c R. Retoux d J-P, Mintova*a G and S. *Silver confined within zeolite EMT nanoparticles: preparation and antibacterial properties*. 2012: p. 1-6.
 38. Jiraroj D, Tungasmita S, Tungasmita DN. *Silver ions and silver nanoparticles in zeolite A composites for antibacterial activity*. *Powder Technol*. 2014;264: p. 418-422.
 39. Siamak Zavareh, Zahra Farrokhzad FD. *Modification of zeolite 4A for use as an adsorbent for glyphosate and as an antibacterial agent for water*. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety*. ; 2018: p. 1-18.
 40. Yang Y, Zhang C, Hu Z. *Impact of metallic and metal oxide nanoparticles on wastewater treatment and anaerobic digestion*. *Environ Sci Process Impacts*. 2013;15(1): p. 39-48.
 41. Slavin YN, Asnis J, Häfeli UO, Bach H. *Metal nanoparticles: Understanding the mechanisms behind antibacterial activity*. *J Nanobiotechnology*. 2017;15(1): p. 1-20.
 42. Parekh A 1942-. *Use of magnetic nanoparticles for wastewater treatment*. 2013;(2008). <http://dspace.mit.edu/handle/1721.1/82337>.
 43. Singh S, Barick KC, Bahadur D. *Surface engineered magnetic nanoparticles for removal of toxic metal ions and bacterial pathogens*. *J Hazard Mater*. 2011;192(3): p. 1539-1547.
 44. Kaur R, Hasan A, Iqbal N, Alam S, Saini MK, Raza SK. *Synthesis and surface engineering of magnetic nanoparticles for environmental cleanup and pesticide residue analysis: A review*. *J Sep Sci*. 2014;37(14): p. 1805-1825.

45. Wang L, Hu C. *The antimicrobial activity of nanoparticles : present situation and prospects for the future*. 2017: p. 1227-1249.
46. Jin Y, Liu F, Shan C, Tong M, Hou Y. *Efficient bacterial capture with amino acid modified magnetic nanoparticles*. *Water Res*. 2014;50: p. 124-134.
47. Huang YF, Wang YF, Yan XP. *Amine-functionalized magnetic nanoparticles for rapid capture and removal of bacterial pathogens*. *Environ Sci Technol*. 2010;44(20): p. 7908-7913.
48. Abdolmaleki A, Mallakpour S, Mahmoudian M, Sabzalain MR. *A new polyamide adjusted triazinyl- b -cyclodextrin side group embedded magnetic nanoparticles for bacterial capture*. *Chem Eng J*. 2017;309: p. 321-329.
49. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. *The Bacterial Cell Envelope*. 2010: p. 1-16.
50. Fett R, Drunkler D. *Polímeros de ciclodextrina: Características, formação de complexos de inclusão e aplicações industriais*. 1999;(46): p. 21-32.
51. El-Boubbou K, Gruden C, Huang X. *Magnetic Glyco-nanoparticles: A Unique Tool for Rapid Pathogen Detection, Decontamination, and Strain Differentiation*. *J Am Chem Soc*. 2007;129(44): p. 13392-13393.
52. Murata K, Zhang D. *Applicability of LIVE / DEAD BacLight Stain with Glutaraldehyde Fixation for the Measurement of Bacterial Cell Concentration and Viability in the Air*. 2013: p. 1755-1767.
53. Pereira L, Dias P, Soares OSGP, Ramalho PSF, Pereira MFR, Alves MM. *Synthesis, characterization and application of magnetic carbon materials as electron shuttles for the biological and chemical reduction of the azo dye Acid Orange 10*. *Appl Catal B Environ*. 2017;212: p. 175-184.
54. Creighton JR, Ho P. *Chapter 1 Introduction to Chemical Vapor Deposition (CVD)*. In: *Chemical Vapor Deposition*. ; 2001: p. 1-13.
55. Peigney A, Laurent C, Flahaut E, Bacsa RR, Rousset A. *Specific surface area of carbon nanotubes and bundles of carbon nanotubes*. *Carbon N Y*. 2001;39(4): p. 507-514.
56. Masotti A, Caporali A. *Preparation of magnetic carbon nanotubes (Mag-CNTs) for biomedical and biotechnological applications*. *Int J Mol Sci*. 2013;14(12): p. 24619-24642.
57. Tristão JC, Oliveira AAS, Ardisson JD, Dias A, Lago RM. *Facile preparation of carbon coated magnetic Fe₃O₄ particles by a combined reduction/CVD process*. *Mater Res Bull*. 2011;46(5): p. 748-754.
58. Oliveira LCA, Rios RVRA, Fabris JD, Garg V, Sapag K, Lago RM. *Activated carbon/iron oxide magnetic composites for the adsorption of contaminants in water*. *Carbon N Y*. 2002;40(12): p. 2177-2183.

59. Halim MYA, Tan WL, Abu Bakar NHH, Bakar MA. *Surface characteristics and catalytic activity of copper deposited porous silicon powder. Materials (Basel)*. 2014;7(12): p. 7737-7751.
60. Zhang J, Li Y, Zhang Y, et al. *Effect of Support on the Activity of Ag-based Catalysts for Formaldehyde Oxidation. Sci Rep*. 2015;5: p. 1-10.
61. Rioseco F, Radovic L, García X, Gordon A, Pecchi G. *Effect of Ag addition on the thermal stability and catalytic properties of LaFeO₃ perovskite. J Chil Chem Soc*. 2010;55(1): p. 44-49.
62. Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. *A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. J Biomed Mater Res*. 2000;52(4): p. 662-668.
63. Zheng K, Setyawati MI, Leong DT, Xie J. *Antimicrobial silver nanomaterials. Coord Chem Rev*. 2018;357: p. 1-17.
64. Liu X, Zhang S, Pan B. *Potential of Carbon Nanotubes in Water Treatment. Intech Open*. 2012.

ANEXOS

A1. Dimensionamento do reator em contínuo

A2. Ensaio com as nanopartículas 5% Ag/FeO

A3. Valores das UFC's e log dos ensaios realizados em reator fechado e em contínuo

A4. Ensaio em contínuo com as NPM's de C-FeO@CVD750 e CuFeO/CNT

A1. DIMENSIONAMENTO DO REATOR EM CONTÍNUO

Os cálculos efetuados têm como objetivo determinar o caudal que iria circular na coluna de forma a que o tempo de contacto da suspensão bacteriana com as partículas seja de 1 min como aconteceu nos ensaios em reator fechado. Estabeleceu-se que o leito teria um comprimento de 0,5 cm. Desta forma, o volume do leito foi calculado através das especificações presentes na coluna.

$$V_{\text{Leito}} = 0,78454 \text{ cm}^2 \times 0,5 \text{ cm} = 0,3927 \text{ cm}^3$$

Sendo o tempo de contacto da suspensão bacteriana com as partículas de 1 min, recorreu-se à equação seguinte para determinar o caudal que seria necessário para garantir estas condições.

$$\text{Tempo de contacto } (\tau) = \frac{V_{\text{Leito}}}{Q} \leftrightarrow Q = \frac{0,3927}{1} = 0,3927 \approx 0,4 \text{ mL/min}$$

De seguida, procurou-se ajustar o caudal, em rpm, da bomba peristáltica de forma a conseguir fazer circular o caudal pretendido pela coluna. Para isso, com a ajuda de uma proveta e de um cronómetro ajustou-se o caudal que, para este caso, corresponde a 5 rpm.

A massa de nanopartículas magnéticas utilizada para este cenário foi de 40 mg.

Aquando da realização dos ensaios com as diferentes nanopartículas verificou-se que para o caso das nanopartículas com nanotubos não era possível estabelecer um leito de 0,5 cm devido à densidade de partículas, desta forma, procurou-se ajustar o comprimento do leito de forma a manter um tempo de contacto da suspensão com as nanopartículas de 1 min. Assim, para um leito de 1 cm e tempo de contacto de 1 min o caudal necessário é de:

$$V_{\text{Leito}} = 0,78454 \text{ cm}^2 \times 1 \text{ cm} = 0,78454 \text{ cm}^3$$

$$\text{Tempo de contacto } (\tau) = \frac{V_{\text{Leito}}}{Q} \leftrightarrow Q = \frac{0,78454}{1} = 0,78457 \approx 0,8 \text{ mL/min}$$

Correspondente a uma velocidade, em rpm, na bomba peristáltica de 12 rpm.

Para a aplicação de um tempo de contacto mais curto para as partículas mais promissoras (CuFeO@CNT) fixou-se um leito de 1 cm e estabeleceu-se um tempo de contacto entre a suspensão bacteriana e as NPM's de 30 s. Desta forma, o caudal necessário para garantir estas condições é de:

$$V_{\text{Leito}} = 0,78454 \text{ cm}^2 \times 1 \text{ cm} = 0,78454 \text{ cm}^3$$

$$\text{Tempo de contacto } (\tau) = \frac{V_{\text{Leito}}}{Q} \leftrightarrow Q = \frac{0,78454}{0,5} = 1,56908 \approx 1,6 \text{ mL/min}$$

Correspondente a uma velocidade, em rpm, na bomba peristáltica de 22,5 rpm.

A2. ENSAIOS COM AS NANOPARTÍCULAS 5% Ag/FeO

As Figuras seguintes mostram a alteração na morfologia das colónias de *E.coli* quando em contacto com as nanopartículas de 5% Ag/FeO. Assinalado a vermelho encontram-se as colónias deformadas e que não possuem a morfologia habitual das colónias de *E.coli* quando em contacto com outro tipo de nanopartículas magnéticas. A verde encontram-se representadas colónias com o tamanho observado habitualmente.

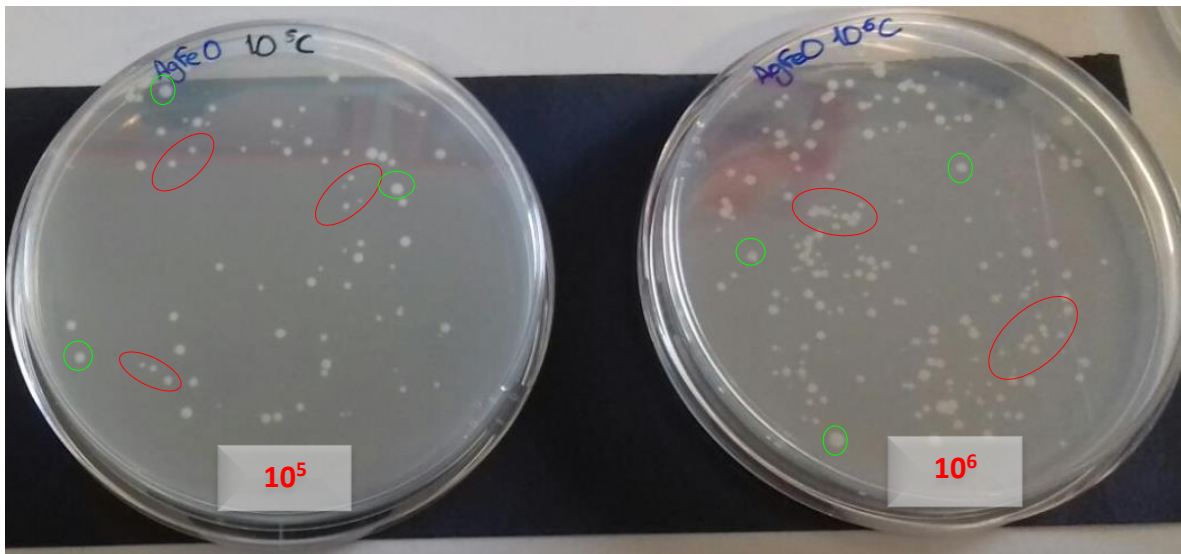


Figura 31- Placas de PCA com os espalhamentos referentes aos ensaios realizados com as NPM's de 5% Ag/FeO para os ensaios em reator fechado de comparação das nanopartículas magnéticas

A Figura 30 corresponde às placas de PCA para as duas diluições mais baixas nos primeiros ensaios realizados em que as nanopartículas magnéticas de 5% Ag/FeO estiveram em contacto com a suspensão bacteriana durante 15 minutos.

A placa 10^6 corresponde ao espalhamento de suspensão que esteve diretamente em contacto com as NPM's no Erlenmeyer e, como é possível observar, é nessa placa que se podem observar mais colónias com morfologias alteradas.

As Figuras seguintes (31 e 32) são correspondentes a ensaios de variação da concentração de NPM's sendo notório um aumento do número de colónias deformadas com o aumento da concentração de nanopartículas magnéticas em contacto com a suspensão bacteriana.

Através da observação dos diferentes cenários é possível concluir que as bactérias não reagem de forma normal à presença de nanopartículas constituídas por prata e que estas provocam um estado de “stress” nas bactérias que leva à alteração da sua morfologia.

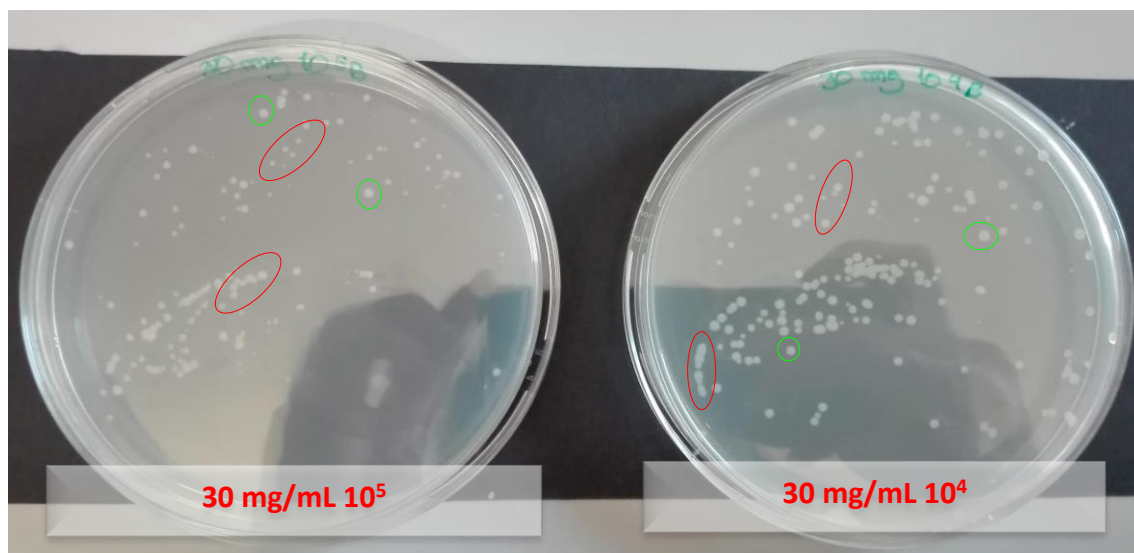


Figura 32- Placas de PCA com os espalhamentos referentes aos ensaios realizados com as NPM's de 5% Ag/FeO para os ensaios em reator fechado de influência da concentração das nanopartículas magnéticas

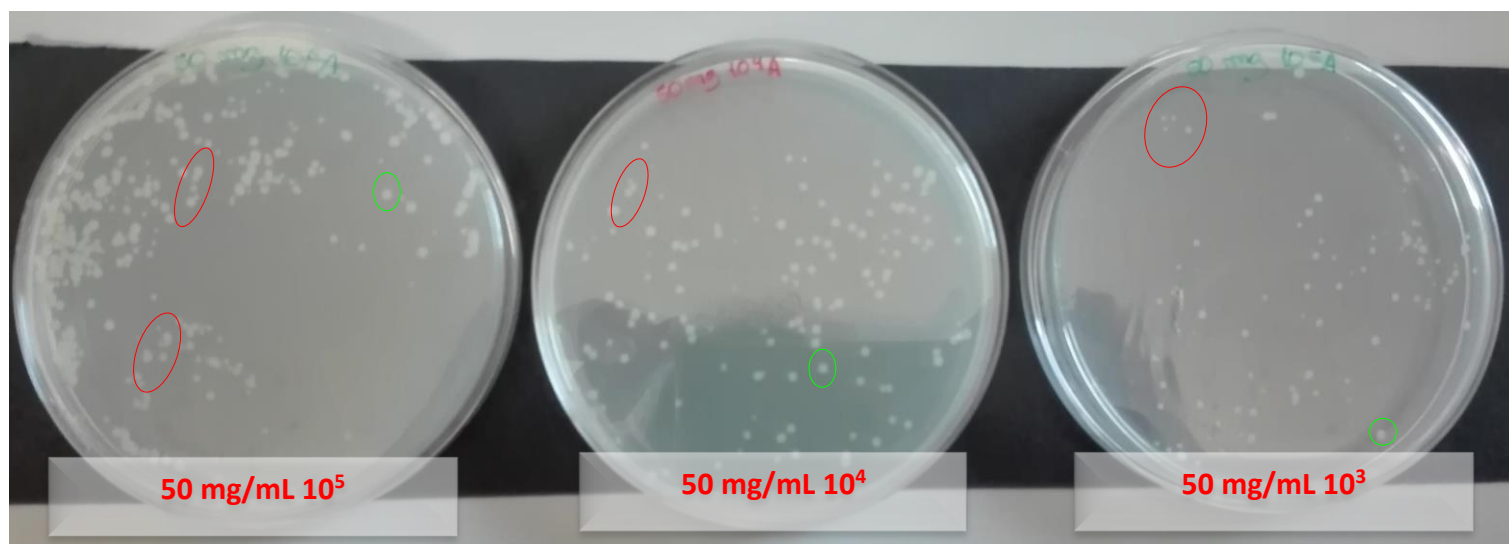


Figura 33- Placas de PCA com os espalhamentos referentes aos ensaios realizados com as NPM's de 5% Ag/FeO para os ensaios em reator fechado de influência da concentração das nanopartículas magnéticas

A3. VALORES DAS UFC'S E LOG DOS ENSAIOS REALIZADOS

Tabela 16- Valores de UFC/mL e logarítmicos antes e após o tratamento para os ensaios de comparação de NPM's com *E.coli* e respectivos desvios médios entre réplicas

COMPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS					
NPM's	Desvios médios entre réplicas (%)	12 mg NPM's/mL 15 min			
		Antes do tratamento		Após o tratamento	
		UFC/mL	Log	UFC/mL	Log
<u>FeO</u>	2,47	1,05E+06	6,02	1,50E+05	5,16
<u>CuFeO</u>	5,28	1,13E+06	6,05	2,06E+05	5,30
<u>5% Ag/FeO</u>	0,12	1,12E+06	6,05	1,53E+03	2,71
<u>C-FeO@CVD750</u>	0,43	1,13E+06	6,05	3,04E+03	2,80
<u>N-C-FeO@CVD750</u>	0,45	1,09E+06	6,04	1,13E+04	3,99
<u>FeO/CNT</u>	0,31	1,13E+06	6,05	3,07E+03	3,07
<u>CuFeO/CNT</u>	0,00	1,14E+06	6,06	3,73E+01	1,45

Tabela 17- Valores de UFC/mL e logarítmicos antes e após o tratamento para os ensaios de cinética com *E.coli*

ENSAIOS DE CINÉTICA DA <i>E.COLI</i> NA PRESENÇA DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS												
NPM's	Antes do tratamento		Após o tratamento									
			30 s		1 min		2,5 min		5 min		10 min	
	UFC's/mL	Log	UFC's/mL	Log	UFC's/mL	Log	UFC's/mL	Log	UFC's/mL	Log	UFC's/mL	Log
<u>FeO</u>	9,90E+05	5,99	8,40E+05	5,92	6,05E+05	5,77	3,78E+05	5,54	1,69E+05	5,22	7,65E+04	4,83
<u>CuFeO</u>	9,30E+05	5,97	9,30E+05	0,00	7,50E+05	5,88	5,00E+05	5,70	2,26E+05	5,35	2,44E+05	5,39
<u>5% Ag/FeO</u>	1,09E+06	6,05	7,88E+05	5,90	7,53E+05	5,87	4,73E+05	5,67	8,77E+04	4,94	6,13E+02	2,10
<u>C-FeO@CVD750</u>	9,77E+05	5,97	6,58E+05	5,81	5,70E+05	5,75	4,44E+04	4,54	5,43E+03	3,61	2,07E+02	2,08
<u>N-C-FeO@CVD750</u>	9,42E+05	6,13	1,24E+06	6,09	1,22E+06	6,09	5,40E+05	5,73	1,43E+05	5,15	4,75E+04	4,68
<u>FeO/CNT</u>	1,05E+05	6,02	6,760E+05	5,82	6,75E+05	5,83	2,02E+05	5,31	3,93E+04	4,03	1,45E+03	3,16
<u>CuFeO/CNT</u>	9,42E+05	5,99	5,57E+05	5,72	2,93E+05	5,43	7,79E+04	4,78	3,99E+03	3,49	5,03E+02	2,43

Tabela 18- Desvios médios entre réplicas para os ensaios cinéticos com a suspensão bacteriana de *E.coli*

ENSAIOS DE CINÉTICA DA <i>E. COLI</i> NA PRESENÇA DE NPM's - DESVIO MÉDIO ENTRE RÉPLICAS (%)					
NPM's	0,5 min	1 min	2,5 min	5 min	10 min
<u>FeO</u>	7,5	8,4	13,6	2,6	4,1
<u>CuFeO</u>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<u>5% Ag/FeO</u>	9,2	0,7	2,2	1,4	0,0
<u>C-FeO@CVD</u>	7,4	0,5	3,9	0,4	0,0
<u>N-C-FeO@CVD</u>	5,1	0,1	3,9	2,1	0,3
<u>FeO@CNT</u>	13,7	12,4	1,8	3,1	0,0
<u>CuFeO@CNT</u>	6,1	6,9	6,0	0,4	0,0

Tabela 19- Valores de UFC/mL e logarítmicos antes e após o tratamento para os ensaios de influência de concentração de NPM's

ENSAIOS DE INFLUÊNCIA DE CONCENTRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS														
NPM's	<u>Antes do tratamento</u>		<u>Após o tratamento</u>											
			4 mg NPM's/mL		8 mg NPM's/mL		16 mg NPM's/mL		20 mg NPM's/mL		30 mg NPM's/mL		50 mg NPM's/mL	
	<i>UFC's/mL</i>	<i>Log</i>	<i>UFC's/mL</i>	<i>Log</i>	<i>UFC's/mL</i>	<i>Log</i>	<i>UFC's/mL</i>	<i>Log</i>	<i>UFC's/mL</i>	<i>Log</i>	<i>UFC's/mL</i>	<i>Log</i>	<i>UFC's/mL</i>	<i>Log</i>
<u>5% Ag/FeO</u>	8,45E+05	5,93	7,88E+05	5,89	7,15E+05	5,85	4,00E+04	4,93	4,08+04	4,91	3,93E+04	2,92	9,60E+03	4,43
<u>C-FeO@CVD750</u>	7,58E+05	5,88	4,55E+05	5,66	4,00E+05	5,60	1,57E+05	5,19	1,29E+05	5,11	9,75E+04	4,83	6,48E+03	3,77
<u>CuFeO/CNT</u>	8,87E+05	5,95	6,07E+05	5,78	2,07E+05	5,28	1,12E+05	4,93	7,78E+04	4,89	3,26E+04	4,40	9,40E+02	2,97

Tabela 20 - Desvios médios entre réplicas para os ensaios de influência de concentração de NPM's com a suspensão bacteriana de *E.coli*

ENSAIOS DE INFLUÊNCIA DE CONCENTRAÇÃO DE NPM's - DESVIO MÉDIO ENTRE RÉPLICAS (%)						
NPM's	4 mg NPM's/mL	8 mg NPM's/mL	16 mg NPM's/mL	20 mg NPM's/mL	30 mg NPM's/mL	50 mg NPM's/mL
<u>5% Ag/FeO</u>	2,7	5,0	0,3	0,8	1,2	0,8
<u>C-FeO@CVD</u>	3,2	1,4	1,4	3,6	4,2	0,6
<u>CuFeO/CNT</u>	10,9	9,6	6,7	1,8	0,9	0,0

Tabela 21- Valores de UFC/mL e logarítmicos antes e após o tratamento para os ensaios com *S.aureus*

COMPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA A <i>S.AUREUS</i>					
NPM's	Desvios médios entre réplicas (%)	50 mg NPM's/mL 1 min			
		<u>Antes do tratamento</u>		<u>Após o tratamento</u>	
		<i>UFC/mL</i>	<i>Log</i>	<i>UFC/mL</i>	<i>Log</i>
<u>FeO</u>	0,0	188E+06	6,27	8,75E+04	4,94
<u>CuFeO</u>	0,0	1,88E+06	6,27	1,02E+05	5,01
<u>5% Ag/FeO</u>	0,0	1,88E+06	6,27	7,70E+04	4,89
<u>C-FeO@CVD750</u>	6,8	1,91E+06	6,28	1,56E+05	4,92
<u>N-C-FeO@CVD750</u>	0,0	1,91E+06	6,28	4,55E+05	5,66
<u>FeO/CNT</u>	1,8	1,91E+06	6,28	9,20E+04	4,93
<u>CuFeO/CNT</u>	5,9	1,91E+06	6,28	1,38E+05	4,87

Tabela 22 - Valores de UFC/mL e logarítmicos antes e após o tratamento para os ensaios em contínuo

ENSAIOS EM CONTÍNUO																
NPM's	<u>Antes do tratamento</u>		<u>Após o tratamento</u>													
			T0		T1		T2		T3		T4		T5		T6	
	UFC's/mL	Log	UFC's/mL	Log	UFC's/mL	Log	UFC's/mL	Log	UFC's/mL	Log	UFC's/mL	Log	UFC's/mL	Log	UFC's/mL	Log
<u>C-FeO@CVD750</u> (<i>E.coli</i>)	9,63E+05	5,99	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
<u>CuFeO/CNT</u> (<i>E.coli</i>)	1,01E+06	6,00	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
<u>C-FeO@CVD750</u> (<i>S.aureus</i>)	1,16E+06	6,06	1,00E+02	2,00	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
<u>CuFeO/CNT</u> (<i>S.aureus</i>)	1,21E+06	6,08	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
<u>Suspensão mista</u> (1 min)	7,10E+05	5,85	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
<u>Suspensão mista</u> (30 s)	6,65E+05	5,82	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-

A4. ENSAIOS EM CONTÍNUO COM AS NPM'S DE C-FeO@CVD750 E CuFeO/CNT

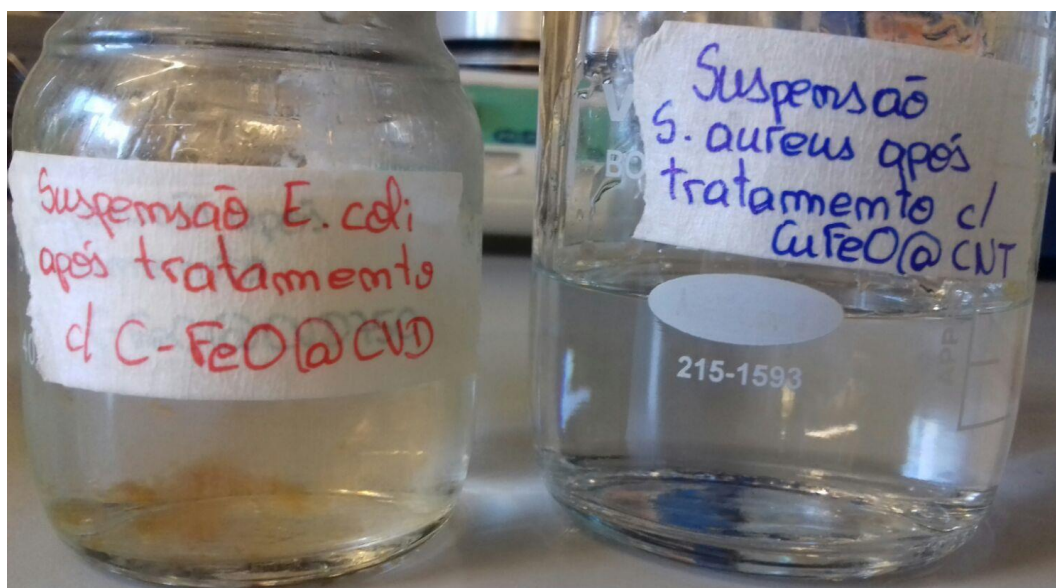


Figura 34- Suspensões bacterianas após tratamento com as NPM's de C-FeO@CVD750 e CuFeO/CNT em reator contínuo