



**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**  
MINISTÉRIO DA ECONOMIA  
**INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

CARTA PATENTE Nº BR 102014008755-9

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

**(21) Número do Depósito:** BR 102014008755-9

**(22) Data do Depósito:** 10/04/2014

**(43) Data da Publicação Nacional:** 01/12/2015

**(51) Classificação Internacional:** B32B 15/16; B32B 23/16; C02F 1/46.

**(54) Título:** FILME BACTERICIDA, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO MESMO E MÉTODO DE TRATAMENTO DE EFLUENTE

**(73) Titular:** FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL, -. CGC/CPF: 88648761000103.  
Endereço: R. Francisco Getúlio Vargas 1130, Bloco A, Sala 301, Cid. Universitária, Caxias do Sul, RS, BRASIL(BR), 95070-560, Brasileira

**(72) Inventor:** FABIANA ZARPELON; MARCELO GIOVANELA; JANAINA DA SILVA CRESPO; CESAR AGUZZOLI.

**Prazo de Validade:** 20 (vinte) anos contados a partir de 10/04/2014, observadas as condições legais

**Expedida em:** 19/01/2021

Assinado digitalmente por:  
**Adriana Briggs de Aguiar**

Diretora Substituta de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados



## **Relatório Descritivo de Patente de Invenção**

### FILME BACTERICIDA, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO MESMO E MÉTODO DE TRATAMENTO DE EFLUENTE

#### **Campo da Invenção**

**[0001]**A presente invenção descreve um filme polimérico fino com multicamadas, obtido a partir de soluções de poli(hidroclorato de alilamina) (PAH) e poli(ácido acrílico) (PAA) com nanopartículas de prata (AgNPs) e reticulado com um agente reticulante, para o tratamento microbiológico de efluentes industriais para reuso. A presente invenção se situa nos campos da Química e da Nanotecnologia.

#### **Antecedentes da Invenção**

**[0002]**A nanotecnologia, ciência e tecnologia que foca as propriedades dos materiais em escala nanométrica, está se tornando um dos mais promissores campos de pesquisa da atualidade. Ela não possui uma tecnologia específica, mas interdisciplinar, baseada na física, química, biologia, engenharia, computação e medicina. A possibilidade de desenvolver novos materiais neste campo cria a expectativa de evolução acentuada em diversas áreas do conhecimento, das ciências humanas e exatas (Sahoo et al., 2007).

**[0003]**Em virtude do seu tamanho, os nanomateriais têm demonstrado possuir propriedades químicas, catalíticas, eletrônicas, magnéticas, mecânicas e ópticas distintas (Jortner e Rao, 2002). Em pouco mais de 15 anos, a “explosão” do nano tem levado ao desenvolvimento de uma vasta gama de novas tecnologias para aplicações domésticas e industriais, que vão desde a liberação controlada de medicamentos até novos métodos para o tratamento de águas contaminadas (Crane e Scott, 2012).

**[0004]**Neste contexto, os filmes automontados com polieletrólitos de cargas opostas ganharam um considerável interesse científico, devido às suas inúmeras aplicações (Ferreira et al., 2004; Cheng et al., 2005). Um dos

métodos mais utilizados para a fabricação desses materiais baseia-se na automontagem de multicamadas poliméricas diferenciadas por meio da técnica de camada por camada (do inglês “layer-by-layer” – LbL).

**[0005]**Essa técnica, que se difundiu rapidamente na literatura principalmente nesta última década (Decher, 1997), consiste basicamente em submergir um substrato apropriado (uma lâmina de vidro, por exemplo) em um béquer contendo a solução do polycation ou do poliânion por um determinado período de tempo. Uma vez em contato com a solução de depósito, as moléculas carregadas dos poli-íons adsorvem-se na superfície do substrato por interação eletrostática (Jesus, 2009). O substrato é, então, lavado para remover as moléculas que não foram satisfatoriamente adsorvidas. O sistema substrato/filme está agora carregado eletrostaticamente, o que permite a adsorção de uma nova camada carregada com carga oposta por meio da imersão em outra solução polimérica. Após a adsorção desta segunda camada, o substrato é novamente lavado e, ao término da deposição das camadas, o mesmo é seco ao ar.

**[0006]**Esses sistemas automontados são considerados um bom meio para nanopartículas, devido à facilidade de controle das propriedades dos mesmos, possibilitando a produção de materiais com características diferentes. A incorporação dessas espécies que possuem elevada área superficial pode afetar significativamente as propriedades dos filmes finos (Dubas et al., 2006; Li et al., 2006). Os materiais obtidos podem apresentar melhorias nas propriedades ópticas, térmicas, mecânicas, elétricas, magnéticas, entre outras (Decher, 1997; Qin et al., 2005). Além disso, as propriedades desses materiais dependem da maneira como a incorporação das nanopartículas é realizada, do seu tamanho e forma, da concentração e do tipo de interação com a matriz polimérica (Sówka et al., 2006). Uma classe de grande interesse para a preparação de nanocompósitos de matrizes poliméricas são as nanopartículas de metais nobres sintetizadas em meio aquoso (Crespilho et al., 2006). Essas nanopartículas têm despertado grande atenção em áreas como catálise (Qiu et

al., 2006), nanoeletrônica (Colvin et al., 1994; Dabbousi et al., 1995), meio ambiente (Jain e Pradeep, 2005; Yoon et al., 2008), e paralelamente no estudo de suas potencialidades na área médica (Lima, 2011).

**[0007]**A maioria destes estudos está relacionada às nanopartículas de prata (AgNPs), uma vez que as mesmas apresentam ação bactericida contra uma ampla faixa de micro-organismos como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus. O efeito bactericida da prata na forma iônica ( $\text{Ag}^+$ ) foi avaliado pela primeira vez pelo cientista suíço Karl Wihelm Von Naegelis, em 1983, contra células de algas (Damm et al., 2005). A utilização das AgNPs (Key e Maass, 2001), no entanto, tem sido relatada em documentos que datam do fim do século XVIII, sendo seu uso intensificado entre 1910 e 1920 (Gibbs, 1999).

**[0008]**Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema:

**[0009]**O documento US2012/107592 “ACTIVE POLYMERIC FILMS”, publicado em 03 de maio de 2012, revela em um primeiro aspecto, um filme compreendendo uma matriz de polímero permeável e, incorporado no interior do polímero, nanopartículas de uma substância inorgânica. Em um segundo aspecto, a presente invenção proporciona um método para a aplicação de uma película sobre uma superfície de um substrato adequado. O documento define também que o filme polimérico pode ser produzido a partir de dois polímeros diferentes e prevê a adição de nanopartículas de prata no filme polimérico como substância inorgânica. Entretanto, o documento descreve um filme para ser usado como revestimento de outros materiais e, além disso, não apresenta alternativas para impedir a solubilização do filme quando o mesmo está em uso.

**[0010]**O documento US2007/243237 “ANTIMICROBIAL THIN FILM COATING AND METHOD OF FORMING THE SAME”, publicado em 18 de outubro de 2007, revela um filme fino revestido de um polieletrólito complexo aplicado a um substrato, onde o filme adquire propriedades biocidas. O filme polimérico é

formado por um polieletrólito com carga positiva e por outro polieletrólito com carga negativa. Entretanto, não possui alternativas para impedir a solubilização do filme quando o mesmo está em uso.

**[0011]**O documento US2011038909 “SYSTEM AND METHOD FOR USING NANOPARTICLES FOR ANTIMICROBIAL ACTIVITY”, publicado em 17 de fevereiro de 2011, revela um revestimento com propriedades antimicrobianas e um método para formar o revestimento. A invenção relaciona um revestimento antimicrobiano ao qual pode incluir um filme polimérico e uma pluralidade de primeiras partículas, ao quais podem incluir o metal prata. Entretanto, o documento descreve um filme para ser usado como revestimento, além disso, não possui alternativas para impedir a solubilização do filme quando o mesmo está em uso.

**[0012]**Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

### **Sumário da Invenção**

**[0013]**A presente invenção vem resolver os problemas constantes no estado da técnica por meio da preparação e caracterização de filmes obtidos a partir de soluções de polieletrólitos fracos (poli(hidrocloreto de alilamina) – PAH, e poli(ácido acrílico) (PAA) com nanopartículas de prata e reticulados com um agente reticulante para reduzir a solubilidade dos filmes, visando o desenvolvimento de um novo material que pudesse ser utilizado e reutilizado como agente bactericida no tratamento microbiológico de efluentes industriais para reuso.

**[0014]**Em um primeiro aspecto, a presente invenção apresenta um filme bactericida compreendido por pelo menos uma camada do polieletrólito poli(hidrocloreto de alilamina) (PAH), pelo menos uma camada do polieletrólito poli(ácido acrílico) (PAA), nanopartículas de prata e pelo menos um agente

reticulante.

**[0015]**Em uma realização preferencial, o agente reticulante é o glutaraldeído.

**[0016]**Em uma realização preferencial, o glutaraldeído está em uma concentração de 1 a 5% (v/v).

**[0017]**Em um segundo aspecto, a presente invenção apresenta um processo de preparação do filme bactericida caracterizado pelas seguintes etapas:

a) deposição das multicamadas poliméricas através da imersão alternada de um substrato em soluções aquosas dos polieletrólitos poli(hidroclorato de alilamina) (PAH) e poli(ácido acrílico) (PAA);

b) imersão do filme fino polimérico em solução de nanopartículas de prata a uma temperatura que varia entre 15 a 30°C;

c) imersão em solução aquosa de um agente reticulante.

**[0018]**Em uma realização preferencial, a imersão alternada de um substrato em soluções aquosas de polieletrólitos PAH e PAA é por um período compreendido entre 5 e 30 min e 12 e 24 min, respectivamente, pela imersão em solução de nanopartículas de prata (b) por um período de 3 a 7 h e pelo período de imersão em solução aquosa de um agente reticulante (c) ser compreendido entre 13 a 47 min.

**[0019]**Em uma realização preferencial, o agente reticulante é o glutaraldeído

**[0020]**Em uma realização preferencial, o glutaraldeído está em uma concentração de 1 a 5% (v/v).

**[0021]**Em uma realização preferencial, o meio da solução de nanopartículas de prata tem um pH entre 3,0 e 6,0.

**[0022]**Em um terceiro aspecto, a presente invenção apresenta um método para tratamento de efluentes, compreendendo pelo menos uma etapa de contato do filme com o efluente a ser tratado.

**[0023]**Em uma realização preferencial, o efluente é um efluente industrial, água ou combinações dos mesmos.

**[0024]**Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão

descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

### **Breve Descrição das Figuras**

**[0025]** Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente são apresentadas as seguintes figuras:

**[0026]** A Figura 1 mostra os espectros de absorção molecular na região do UV-Vis das AgNPs em pH = 3,0 e em pH = 6,0.

**[0027]** A Figura 2 mostra a representação das AgNPs estabilizadas por citrato de sódio em: (a) pH = 6,0 e (b) pH = 3,0.

**[0028]** A Figura 3 mostra a imagem de MET das AgNPs em: (a) pH = 3,0 e (b) pH = 6,0. O inset em (b) representa o histograma da distribuição de tamanhos das AgNPs.

**[0029]** A Figura 4 mostra o fluxograma esquemático da preparação dos filmes.

**[0030]** A Figura 5 mostra a imagem do teste de difusão em ágar do filme (PAH<sub>8,0</sub>/PAA<sub>4,0</sub>)<sub>20</sub>, imerso por 1 h em solução de AgNPs em pH = 6,0 e reticulado com glutaraldeído.

**[0031]** A Figura 6 mostra a imagem do teste de difusão em ágar do filme (PAH<sub>4,0</sub>/PAA<sub>4,0</sub>)<sub>20</sub> imerso por 1 h em solução de AgNPs em pH = 3,0 e reticulado com glutaraldeído.

**[0032]** A Figura 7 mostra o resultado do ensaio microbiológico para o filme (PAH<sub>8,0</sub>/PAA<sub>4,0</sub>)<sub>20</sub> com AgNPs em pH = 6,0 e reticulado com glutaraldeído: (a) imersão por 1 h; (b) imersão por 2 h; (c) imersão por 4 h em solução de AgNPs contra *Escherichia coli*; (d) imersão por 1 h; (e) imersão por 2 h; (f) imersão por 4 h em solução de AgNPs contra *Staphylococcus aureus*.

**[0033]** A Figura 8 mostra os espectros de absorção molecular na região do UV-Vis dos filmes (PAH<sub>8,0</sub>/PAA<sub>4,0</sub>)<sub>20</sub>, imersos em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído.

**[0034]** A Figura 9 mostra (a) os espectros de absorção molecular na região do UV-Vis dos filmes (PAH<sub>4,0</sub>/PAA<sub>4,0</sub>)<sub>20</sub> imersos em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído. (b) Detalhe de (a) para

melhor visualização dos picos.

**[0035]**A Figura 10 mostra (a) o perfil de concentração de prata dos filmes  $(PAH_{8,0}/PAA_{4,0})_{20}$ , imersos em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído. (b) Detalhe de (a) para melhor visualização do filme polimérico e das AgNPs.

**[0036]**A Figura 11 mostra (a) o perfil de concentração de prata dos filmes  $(PAH_{4,0}/PAA_{4,0})_{20}$  imersos em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído. (b) Detalhe de (a) para melhor visualização do filme polimérico. (c) Detalhe de (a) para melhor visualização das AgNPs.

**[0037]**A Figura 12 mostra a conformação das cadeias poliméricas dos polieletrólitos nos pHs utilizados para a deposição dos filmes desenvolvidos neste trabalho.

**[0038]**A Figura 13 mostra a densidade areal dos filmes  $(PAH_{8,0}/PAA_{4,0})_{20}$  e  $(PAH_{4,0}/PAA_{4,0})_{20}$  imersos em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído.

**[0039]**A Figura 14 mostra a imagem de MET do filme  $(PAH_{8,0}/PAA_{4,0})_{20}$ , imerso em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 4 h e reticulado com glutaraldeído. O inset ao lado representa o histograma da distribuição de tamanhos das AgNPs no filme analisado.

**[0040]**A Figura 15 mostra a influência do tempo de contato dos filmes  $(PAH_{8,0}/PAA_{4,0})_{20}$ , imersos em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 4 h e reticulados com glutaraldeído, na remoção de coliformes totais do efluente industrial.

**[0041]**A Figura 16 mostra a influência do tempo de contato do filme  $(PAH_{8,0}/PAA_{4,0})_{20}$ , imerso em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 4 h e reticulado com glutaraldeído, na remoção de coliformes totais do efluente industrial em uma primeira utilização e na reutilização.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

**[0042]**A presente invenção se refere a um filme bactericida compreendido por pelo menos uma camada polimérica de poli(hidrocloreto de alilamina) (PAH),



por pelo menos uma camada polimérica de polieletrólito poli(ácido acrílico) (PAA), nanopartículas de prata e pelo menos um agente reticulante.

**[0043]** Em um segundo aspecto, a presente invenção apresenta um processo de preparação do filme bactericida caracterizado pelas seguintes etapas:

- a) deposição das multicamadas poliméricas através da imersão alternada de um substrato em soluções aquosas de poli(hidroclorato de alilamina) (PAH) e polieletrólito poli(ácido acrílico) (PAA);
- b) imersão dos filmes finos poliméricos em solução de nanopartículas de prata a uma temperatura que varia entre 15 a 30°C;
- c) imersão em solução aquosa de um agente reticulante.

**[0044]** Em um terceiro aspecto, a presente invenção apresenta um método para tratamento de efluentes compreendendo pelo menos uma etapa de contato do filme bactericida com os efluentes a serem tratados.

**[0045]** O agente reticulante vem a solucionar o problema da solubilidade do filme em meio aquoso. Ao adicionar o agente reticulante ao filme, ele diminui a solubilidade do filme quando em contato com um fluido. Além disso, o filme da presente invenção foi testado experimentalmente com diferentes valores de pH das soluções de nanopartículas de prata de maneira a obter um filme aprimorado. Assim, o filme da presente invenção pode ser usado para tratamento de efluentes, água e água de reuso, pois apresenta um pH adequado e pelo menos um agente reticulante, como por exemplo o glutaraldeído, o qual evita a solubilização do filme e permite a sua reutilização no tratamento dos efluentes.

**[0046]** A seguir são definidos alguns dos termos que são apresentados ao longo do pedido de patente.

#### Filme bactericida

**[0047]** No contexto do presente desenvolvimento, o termo “Filme bactericida” deve ser entendido como matéria condensada distribuída em uma geometria planar constituída de camadas dos polieletrólitos poli(hidroclorato de alilamina) (PAH) e polieletrólito poli(ácido acrílico) (PAA).

#### Camada do polieletrólito PAH

**[0048]** No contexto do presente desenvolvimento, o termo “Camada do polieletrólito PAH” deve ser entendido como camadas do polímero poli(hidrocloreto de alilamina) (PAH).

#### Camada do polieletrólito PAA

**[0049]** No contexto do presente desenvolvimento, o termo “Camada do polieletrólito PAA” deve ser entendido como camadas do polímero poli(ácido acrílico) (PAA).

#### Agente reticulante

**[0050]** No contexto do presente desenvolvimento, o termo “Agente reticulante” deve ser entendido como um agente que reticula o filme, com a finalidade de reduzir a solubilidade dos polieletrólitos em solução aquosa. Pode-se citar como um exemplo de agente reticulante o glutaraldeído.

#### Imersão alternada de um substrato

**[0051]** No contexto do presente desenvolvimento, o termo “Imersão alternada de um substrato” deve ser entendido como a automontagem de multicamadas poliméricas diferenciadas por meio da técnica de camada por camada (Layer-By-Layer). Esse processo consiste basicamente em submergir um substrato apropriado (uma lâmina de vidro, por exemplo) em um béquer contendo a solução do polycation ou do polianion por um determinado período de tempo.

#### Meio da solução

**[0052]** No contexto do presente desenvolvimento, o termo “Meio da solução” deve ser entendido como a solução na qual um determinado soluto está disperso ou dissolvido.

### **Exemplo 1. Realização Preferencial**

**[0053]** Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

**[0054]** O presente projeto trata de um filme polimérico fino com multicamadas

obtido a partir de soluções de poli(hidroclorato de alilamina) (PAH) e poli(ácido acrílico) (PAA) com nanopartículas de prata (AgNPs) e reticulados com um agente reticulante, como por exemplo glutaraldeído, para o tratamento microbiológico de efluentes industriais para reuso.

#### Síntese das AgNPs

**[0055]**As AgNPs foram sintetizadas em meio aquoso através da redução química de íons  $\text{Ag}^+$  por boroidreto de sódio, na presença de citrato de sódio tribásico dihidratado (como agente estabilizante), sob agitação e ao abrigo da luz, a 23°C. Este procedimento foi realizado com base no método proposto por Jana et al. (2001).

**[0056]**Inicialmente, 250 mL de nitrato de prata 0,25 mmol/L foram adicionados a 250 mL de citrato de sódio tribásico dihidratado 0,25 mmol/L por 30 s, sob agitação magnética vigorosa. Imediatamente após a mistura dessas duas soluções, uma alíquota de 10 mL de boroidreto de sódio 1,00 mmol/L foi adicionada a esse sistema (Pinto et al., 2010). Em seguida, o sistema foi mantido sob agitação por mais 1 min e a solução resultante (de tonalidade amarelo-ouro) foi imediatamente utilizada para a incorporação das AgNPs nos filmes.

**[0057]**A fim de se avaliar o efeito do pH da solução de AgNPs na incorporação das nanopartículas nos filmes, e conseqüentemente na atividade bactericida, a solução contendo as AgNPs foi dividida em duas partes iguais, mantendo-se o pH de uma das partes em torno de 6,0 e reduzindo-se o pH da outra metade para 3,0.

#### UV-Vis das soluções de AgNPs

**[0058]**As soluções contendo as AgNPs (em pH = 3,0 e pH = 6,0) foram analisadas em um espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution 60, na faixa de comprimento de onda situada entre 200 e 800 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 10 mm.

**[0059]**As soluções coloidais de AgNPs obtidos em pH = 3,0 e pH = 6,0 (Figura 1) evidenciaram a presença de uma única banda de absorção centrada em 395 nm e 393 nm, respectivamente.

**[0060]**A absorvância da solução coloidal de prata em pH = 3,0 é maior, pois ao reduzir o pH da solução, a densidade de carga negativa (citrato) presente ao redor das nanopartículas também é reduzida, conforme ilustra a Figura 2. Dessa forma, as mesmas ficam mais susceptíveis à interação com a radiação UV, o que faz com que a absorvância seja maior do que em pH = 6,0.

#### MET das soluções de AgNPs

**[0061]**As soluções contendo as AgNPs foram previamente diluídas em água deionizada (1 gota da solução coloidal de prata em 20 mL desse solvente), utilizando um ultrassom (Unique USC 1400) por 30 min. Em seguida, uma gota dessa nova solução foi depositada sobre um grid de cobre com filme de Formvar (300 mesh) e deixada secar por 48 h.

**[0062]**A Figura 3 apresenta as imagens de MET das AgNPs em pH = 3,0 e pH = 6,0. Como pode ser observado, as AgNPs encontram-se menos aglomeradas em pH = 6,0 do que em pH = 3,0. Isto ocorre porque, à medida que a concentração de íons  $H_3O^+$  aumenta (menor valor de pH), a densidade de carga sobre os íons citrato diminui, fazendo com que as AgNPs fiquem menos estabilizadas (Bao et al., 2005) e conseqüentemente mais aglomeradas. Além disso, as nanopartículas de ambas as soluções apresentaram formato esférico e o diâmetro médio das AgNPs em pH = 6,0 foi de aproximadamente 28 nm, como pode ser observado no histograma da distribuição de tamanhos da Figura 3b.

#### Preparação e caracterização dos filmes com AgNPs

**[0063]**Os filmes foram depositados em lâminas de vidro para os testes microbiológicos e para a caracterização por espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (UV-Vis), em poliestireno para

análise de MET, e em silício para as análises de espectroscopia de emissão óptica por descarga luminescente (GD-OES) e espectrometria de retroespalhamento Rutherford (RBS).

#### Limpeza dos substratos

**[0064]** Os substratos utilizados para a deposição dos filmes foram inicialmente esfregados, um a um, com algodão e detergente, sendo posteriormente colocados em um ultrassom (Unique USC 1400) contendo Extran neutro a 10% (v/v) por 10 min. Em seguida, os mesmos foram sonificados por 3 min em uma solução de NaOH 1,0 mol/L, e novamente em acetona por mais 10 min. Ao término de cada etapa, os substratos foram enxaguados abundantemente com água destilada. Para a secagem, os mesmos foram colocados em uma estufa (Nova Ética 420-1D) a 50°C, por um período de 1 h.

#### Preparação dos filmes com AgNPs

**[0065]** A montagem dos filmes foi feita em um equipamento NanoStracto Sequence, de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 4. Os substratos de vidro foram inicialmente imersos em uma solução aquosa de PAH na concentração de  $1,0 \times 10^{-2}$  mol/L (baseada na massa molar do polímero) durante 15 min sendo, em seguida, retirados da solução e lavados por imersão em água deionizada durante 2, 1 e 1 min, consecutivamente. Na sequência, os mesmos foram imersos em outra solução aquosa de PAA de mesma concentração, durante 15 min, sendo lavados em água deionizada.

**[0066]** As multicamadas foram obtidas a partir de soluções aquosas compostas por  $(\text{PAH}_x/\text{PAA}_{4,0})_{20}$ , onde x e 4,0 são os valores de pH das soluções do polycation e do poliânion durante a montagem dos filmes, respectivamente; e 20 é o número de camadas. Os filmes foram preparados para duas combinações de experimentos:  $(\text{PAH}_{4,0}/\text{PAA}_{4,0})_{20}$  e  $(\text{PAH}_{8,0}/\text{PAA}_{4,0})_{20}$ . A escolha do pH das soluções e da quantidade de camadas foi feita com base em trabalhos anteriores (Machado et al., 2011), em que se observou que para filmes produzidos com os mesmos polieletrólitos, e em condições semelhantes, nanopartículas de ouro concentravam-se preferencialmente na

superfície dos mesmos.

**[0067]**Após a preparação, os filmes foram imersos nas soluções de AgNPs (em pH = 3,0 e pH = 6,0) por um período de 1 h, sendo em seguida enxaguados em água deionizada durante 30 s. A incorporação das AgNPs foi realizada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, assim como a secagem dos mesmos, por um período de 24 h.

**[0068]**Visando minimizar a solubilidade dos filmes em meio aquoso, os mesmos foram reticulados através da imersão em uma solução aquosa de glutaraldeído 2,5% (v/v) por 30 min, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, sendo em seguida enxaguados em água deionizada durante 30 s e secos ao ar e ao abrigo da luz por um período de 24 h. Ao término da etapa de preparação, os filmes apresentaram uma área de aproximadamente 14,3 cm<sup>2</sup>.

#### Teste de difusão em ágar

**[0069]**Os ensaios microbiológicos foram realizados em placas de Petry com ágar nutriente (HIMEDIA) e ágar estoque. A eficácia antimicrobiana foi testada sobre a inibição do crescimento de *Escherichia coli* (ATCC – 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC – 25923).

**[0070]**As amostras das culturas dessas duas bactérias foram inicialmente diluídas em uma solução salina peptonada 0,1% (m/v). Em seguida, foram adicionadas alçadas de cada micro-organismo em tubos separados, cada um contendo uma solução salina, até se obter uma turvação compatível à escala 0,5 de McFarland, de densidade celular bacteriana em torno de  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

**[0071]**As suspensões das duas bactérias foram então espalhadas de forma homogênea no meio de cultura de cada placa de Petry para que os filmes pudessem ser depositados na parte superior do ágar, sendo posteriormente incubados em uma estufa bacteriológica (Quimis Q-317B) a uma temperatura de 37°C, por um período de 48 h.

**[0072]**Após o período de incubação, as placas de Petry foram analisadas com o objetivo de se avaliar a inibição do crescimento bacteriano nas amostras,

através da formação de halos ao redor, sob e sobre os filmes.

**[0073]**Os ensaios microbiológicos preliminares foram realizados em ágar estoque, utilizando-se apenas a cultura de *Escherichia coli*, e um tempo de imersão nas soluções coloidais de prata (em pH = 3,0 e pH = 6,0) de 1 h. Os filmes avaliados nestes primeiros ensaios encontram-se listados na Tabela 1. Após a finalização destes primeiros testes, foram realizados novos ensaios microbiológicos utilizando-se apenas o último filme, tendo em vista que o mesmo apresentou o melhor resultado em termos de inibição com relação aos demais filmes avaliados. Para esses novos ensaios, o tempo de difusão das AgNPs nos filmes foi de 1, 2 e 4 h; o ágar utilizado foi o do tipo nutriente; e os micro-organismos testados foram a *Escherichia coli* e o *Staphylococcus aureus*.

**[0074]**Os ágares estoque e nutriente são utilizados como meios de cultura em geral. O ágar estoque é composto por peptona bacteriológica, extrato de levedura, extrato de carne, cloreto de sódio, fosfato de sódio dibásico e ágar. Para a preparação desse meio de cultura deve-se pesar os constituintes em um recipiente adequado e adicionar o volume correspondente de água, deixar a mistura em repouso por 15 min e, em seguida, aquecer a mesma até a completa dissolução. Em seguida, o pH é ajustado para  $7,4 \pm 0,2$  e a solução é distribuída em frascos identificados. Por fim, o meio de cultura é autoclavado a  $121 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 15 min. A preparação do ágar nutriente é realizada de forma análoga a do ágar estoque, sendo este composto basicamente pelos mesmos componentes do ágar estoque, porém em concentrações diferentes, com exceção do fosfato de sódio dibásico que não é utilizado na mistura. A validade de ambos os ágares é de três meses.

**Tabela 1.** Descrição dos filmes utilizados nos ensaios microbiológicos.

Filme	AgNPs	pH da solução de AgNPs	Reticulação com glutaraldeído
(PAH <sub>4,0</sub> /PAAH <sub>4,0</sub> ) <sub>20</sub>	Não	-	Não
(PAH <sub>4,0</sub> /PAAH <sub>4,0</sub> ) <sub>20</sub>	Não	-	Sim
(PAH <sub>4,0</sub> /PAAH <sub>4,0</sub> ) <sub>20</sub>	Sim	3,0	Não
(PAH <sub>4,0</sub> /PAAH <sub>4,0</sub> ) <sub>20</sub>	Sim	3,0	Sim
(PAH <sub>4,0</sub> /PAAH <sub>4,0</sub> ) <sub>20</sub>	Sim	6,0	Não
(PAH <sub>4,0</sub> /PAAH <sub>4,0</sub> ) <sub>20</sub>	Sim	6,0	Sim
(PAH <sub>8,0</sub> /PAAH <sub>4,0</sub> ) <sub>20</sub>	Não	-	Não
(PAH <sub>8,0</sub> /PAAH <sub>4,0</sub> ) <sub>20</sub>	Não	-	Sim
(PAH <sub>8,0</sub> /PAAH <sub>4,0</sub> ) <sub>20</sub>	Sim	3,0	Não
(PAH <sub>8,0</sub> /PAAH <sub>4,0</sub> ) <sub>20</sub>	Sim	3,0	Sim
(PAH <sub>8,0</sub> /PAAH <sub>4,0</sub> ) <sub>20</sub>	Sim	6,0	Não
(PAH <sub>8,0</sub> /PAAH <sub>4,0</sub> ) <sub>20</sub>	Sim	6,0	Sim

**[0075]** Uma vez que a área de contato dos substratos de vidro com o ágar é muito pequena, devido à fina espessura das mesmas, os halos formados nas placas de Petry são discretos (Figura 5), tendo em vista que provavelmente não ocorreu a lixiviação de prata neste teste (Li et al., 2006).

**[0076]** Os filmes (PAH<sub>8,0</sub>/PAA<sub>4,0</sub>)<sub>20</sub> imersos em solução de AgNPs a pH = 3,0 não apresentaram atividade bactericida, pois nessas condições as AgNPs estão menos estabilizadas pelos ânions citrato, o que acaba dificultando a incorporação das mesmas nos filmes finos (Machado et al., 2011).

**[0077]** A atividade bactericida também é pouco evidenciada nos filmes (PAH<sub>4,0</sub>/PAA<sub>4,0</sub>)<sub>20</sub>, pois nessas condições os grupos  $-NH_3^+$  do PAH estão totalmente interligados eletrostaticamente com os grupos  $-COO^-$  do PAA, não restando grupos  $-NH_3^+$  livres para promover interações com as cargas negativas da solução coloidal de prata (Decher e Schlenoff, 2002; Choi e Rubner, 2005), o que reduz a incorporação das AgNPs nos filmes finos. Na Figura 6 pode-se visualizar a formação de um pequeno halo ao redor do slide que contém o filme (PAH<sub>4,0</sub>/PAA<sub>4,0</sub>)<sub>20</sub> imerso por 1 h em solução de AgNPs em pH = 3,0. Porém, o resultado não foi o esperado, uma vez que houve um crescimento considerável da colônia de bactérias embaixo da lâmina de vidro,



levando ao deslocamento da mesma.

**[0078]** Finalmente, os ensaios microbiológicos mostraram igualmente que o tempo de incorporação das AgNPs interfere diretamente na atividade bactericida dos filmes. Um maior tempo de imersão em solução coloidal de prata potencializa a ação bactericida, devido a uma maior incorporação de nanopartículas. O teste realizado após a difusão das AgNPs por 4 h apresentou uma maior transparência em relação àqueles de 1 e 2 h, tanto para *Escherichia coli* (Figuras 7a, 7b e 7c) como para *Staphylococcus aureus* (Figuras 7d, 7e e 7f), praticamente não evidenciando crescimento de nenhuma cepa bacteriana sob e sobre o slide.

#### Caracterização dos filmes com AgNPs

**[0079]** Os filmes com AgNPs foram caracterizados por meio das técnicas de espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (UV-Vis), espectroscopia de emissão óptica por descarga luminescente (GD-OES), espectrometria de retroespalhamento Rutherford (RBS) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). As amostras foram identificadas com a sigla ABC, onde A e B representam os valores de pH das soluções de PAH e PAA durante a montagem dos filmes, respectivamente; e C é a quantidade de horas de imersão dos filmes em solução de AgNPs.

#### UV-Vis

**[0080]** Os filmes foram analisados em um espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution 60 na faixa de comprimento de onda situada entre 200 e 800 nm. As análises foram realizadas somente para os filmes  $(\text{PAH}_{4,0}/\text{PAA}_{4,0})_{20}$  e  $(\text{PAH}_{8,0}/\text{PAA}_{4,0})_{20}$ , imersos em solução de prata em pH = 6,0 por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído (Figuras 8 e 9). O branco foi medido com uma lâmina de vidro contendo apenas os filmes de PAH/PAA reticulados com glutaraldeído.

**[0081]** Os espectros de absorção molecular na região do UV-Vis dos filmes  $(\text{PAH}_{8,0}/\text{PAA}_{4,0})_{20}$  imersos em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído (Figura 8) mostram a presença de uma única

banda de absorção centrada em 423, 427 e 433 nm, respectivamente. A presença da banda de absorção característica da prata em torno de 400 nm (Revina et al., 2001; Pal et al., 2007) evidencia a incorporação de AgNPs nos filmes produzidos.

**[0082]**A absorvância do filme imerso em solução de AgNPs por 4 h apresentou a maior intensidade, conforme era esperado. No entanto, a absorvância do filme imerso em solução de bactérias AgNPs por 2 h apresentou intensidade menor do que a do filme que foi imerso em solução de AgNPs por 1 h.

**[0083]**Ao permanecer por apenas 1 h na solução de prata, ocorre a incorporação superficial das AgNPs no filme, não havendo tempo para as nanopartículas migrarem para as camadas mais internas. Na imersão por 2 h, as AgNPs iniciam a migração nas camadas do filme, mas como a última camada depositada (PAA) é também carregada negativamente, ocorre a repulsão entre as cargas de mesmo sinal e as AgNPs acabam sendo repelidas pelo filme reduzindo, inclusive, sua incorporação na superfície. Quando a imersão é de 4 h, as AgNPs migram para as camadas mais internas chegando até a camada de PAH, que é carregada positivamente, e ocorrem interações entre as AgNPs e os grupos  $-\text{NH}_3^+$  livres do PAH, ocasionando assim uma maior incorporação de prata nos filmes.

**[0084]**Os espectros de absorção molecular na região do UV-Vis dos filmes  $(\text{PAH}_{4,0}/\text{PAA}_{4,0})_{20}$  imersos em solução de AgNPs em  $\text{pH} = 6,0$  por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído (Figura 9), apresentam uma banda em 450, 483 e 465 nm, respectivamente. Embora essas bandas não sejam tão bem definidas como para o filme  $(\text{PAH}_{8,0}/\text{PAA}_{4,0})_{20}$ , as mesmas encontram-se igualmente na região de absorção característica da prata, o que sugere que a incorporação das AgNPs também aconteceu. A menor intensidade de absorção visualizada nos espectros da Figura 9, em comparação aos da Figura 8, comprovam que ocorreu uma menor incorporação das AgNPs nos filmes em que ambos os polieletrólitos apresentam  $\text{pH} = 4,0$ . Esse comportamento é explicado, uma vez que nesse  $\text{pH}$  os grupos  $-\text{NH}_3^+$  e  $-\text{COO}^-$  estão totalmente

interligados eletrostaticamente não restando grupos  $\text{-NH}_3^+$  no PAH para promover a interação com as AgNPs (Choi e Rubner, 2005). Ainda, nessa condição de pH, os filmes formados são mais finos do que em pHs distintos (8,0/4,0), pois as cadeias do PAH estão em uma conformação mais linear do que em pH superior. Dessa forma, a superfície para a incorporação das AgNPs é reduzida, o que justifica a não formação de halos de inibição nos ensaios microbiológicos.

### GD-OES

**[0085]**A análise de GD-OES foi utilizada para verificar a presença de Ag nos filmes. A análise permite identificar em profundidade todos os elementos químicos que constituem o material. As medidas foram realizadas em um equipamento Horiba GD Profiler 2 do Laboratório de Propriedades Nanomecânicas da UCS. Anteriormente à análise das amostras, o equipamento foi calibrado com alumínio.

**[0086]**A cada nova medida foi efetuada a limpeza do anodo do equipamento. O tempo de ensaio para cada amostra foi de 30 s. As análises foram realizadas somente para os filmes  $(\text{PAH}_{4,0}/\text{PAA}_{4,0})_{20}$  e  $(\text{PAH}_{8,0}/\text{PAA}_{4,0})_{20}$ , imersos em solução de prata em pH = 6,0 por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído.

**[0087]**Os perfis de concentração de prata, bem como do filme polimérico nas amostras produzidas, estão representados nas Figuras 10 e 11.

**[0088]**Na Figura 10a, o filme polimérico pode ser visualizado no tempo de sputtering de 1,0 a 5,0 s. Após 5,0 s, ocorre a identificação do substrato de silício e a tensão do filme polimérico diminui. Comparando as Figuras 10a e 11a, pode-se concluir que o filme produzido em pHs distintos (8,0/4,0) possui maior espessura em relação ao filme produzido em pHs iguais (4,0/4,0), o que é corroborado pela Figura 12 que representa a conformação dos polieletrólitos no filme. Ao analisar a Figura 11a, pode-se verificar que o filme polimérico aparece no tempo de sputtering de 0,8 a 2,0 s, momento em que o silício (substrato utilizado na deposição do filme) aparece, evidenciando que a partir

deste tempo não há mais filme polimérico, restando apenas o substrato. Com relação à camada de prata presente nas amostras, as Figuras 10b e 11b mostram que para ambos os filmes  $(\text{PAH}_{8,0}/\text{PAA}_{4,0})_{20}$  e  $(\text{PAH}_{4,0}/\text{PAA}_{4,0})_{20}$  a camada de prata formada concentra-se em sua maior parte na superfície do filme. Para o sistema em que os pHs são iguais, verifica-se que a tensão da prata apresenta valores maiores para o filme que ficou 4 h imerso em solução de prata, seguido dos filmes imersos por 2 e 1 h, respectivamente. Já para o sistema em que os pHs dos polieletrólitos são distintos (8,0/4,0), observa-se o mesmo comportamento apresentado pela técnica de UV-Vis. A maior tensão de prata é apresentada pelo filme imerso por 4 h, seguido pelos filmes imersos por 1 e 2 h, respectivamente. Comparando-se as tensões de prata apresentadas nas Figuras 10b e 11c, que são um detalhe das Figuras 10a e 11a, respectivamente, torna-se evidente que nos filmes para o sistema  $(\text{PAH}_{8,0}/\text{PAA}_{4,0})_{20}$  ocorreu maior incorporação de AgNPs do que nos filmes para o sistema  $(\text{PAH}_{4,0}/\text{PAA}_{4,0})_{20}$  pois em pHs iguais, a protonação dos polieletrólitos propicia a interação entre os grupos funcionais do PAH e PAA, diminuindo a densidade de carga no filme, o que dificulta a incorporação das AgNPs.

### RBS

**[0089]**Essa técnica foi utilizada para estimar a concentração (em átomos/cm<sup>2</sup>) e a distribuição das AgNPs nos filmes.

**[0090]**As medidas foram realizadas em um acelerador de íons tipo Tandem de 3,0 MeV, utilizando um feixe de íons monoenergético de He<sup>+</sup> de 2,0 MeV e um ângulo de detecção de retroespalhamento de 165°, no Laboratório de Implantação Iônica do Instituto de Física da UFRGS.

**[0091]**As análises foram realizadas somente para os filmes  $(\text{PAH}_{4,0}/\text{PAA}_{4,0})_{20}$  e  $(\text{PAH}_{8,0}/\text{PAA}_{4,0})_{20}$ , imersos em solução de prata em pH = 6,0 por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído.

**[0092]**A Figura 13 apresenta a concentração de átomos de prata por cm<sup>2</sup> dos filmes  $(\text{PAH}_{8,0}/\text{PAA}_{4,0})_{20}$  e  $(\text{PAH}_{4,0}/\text{PAA}_{4,0})_{20}$  imersos em solução de AgNPs em

pH = 6,0 por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído. As amostras do sistema (PAH<sub>4,0</sub>/PAA<sub>4,0</sub>)<sub>20</sub> apresentaram uma menor quantidade de átomos de prata em cada tempo de imersão, quando comparadas às amostras do sistema (PAH<sub>8,0</sub>/PAA<sub>4,0</sub>)<sub>20</sub>, corroborando com as análises de UV-Vis e GD-OES. A única exceção observada foi para a amostra 442. A explicação para este resultado é que quando os polieletrólitos PAH e PAA estão combinados em multicamadas, em pHs iguais (4,0/4,0), não existem grupos funcionais livres para interagir com as cargas negativas das AgNPs. Dessa forma, as AgNPs não conseguem entrar nas multicamadas dos filmes, mas também não são repelidas. Assim, a incorporação das AgNPs ocorre de forma cumulativa: quanto maior o tempo de imersão, maior será a quantidade de prata incorporada. Para o sistema em que os pHs do PAH e do PAA são distintos (8,0/4,0), na imersão por 2 h, as AgNPs são repelidas pelos grupos ácidos do PAA (última camada depositada).

**[0093]** Os valores para a densidade areal das AgNPs em cada amostra evidenciam que a maior incorporação de AgNPs ocorreu para o filme (PAH<sub>8,0</sub>/PAA<sub>4,0</sub>)<sub>20</sub> com AgNPs em pH = 6,0, através da imersão por 4 h em solução coloidal de prata e reticulado com glutaraldeído. Esses resultados justificam a maior eficiência bactericida observada com o aumento do tempo de incorporação da solução de AgNPs.

#### MET

**[0094]** Essa técnica foi utilizada para avaliar a distribuição e o tamanho das AgNPs nos filmes automontados de PAH/PAA. As análises foram realizadas apenas com o filme (PAH<sub>8,0</sub>/PAA<sub>4,0</sub>)<sub>20</sub>, imerso em solução de prata em pH = 6,0 por 4 h e reticulado com glutaraldeído. A Figura 14 mostra apenas a secção transversal do filme (PAH<sub>8,0</sub>/PAA<sub>4,0</sub>)<sub>20</sub>, imerso em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 4 h e reticulado com glutaraldeído.

**[0095]** Como pode ser observado, as AgNPs encontram-se distribuídas de maneira aleatória (não uniforme) e estão ligeiramente mais “concentradas” na superfície do filme analisado. Além disso, a imagem de MET revela a presença de alguns aglomerados de nanopartículas (pontos maiores e mais escuros) e

que as AgNPs possuem formato esférico e um diâmetro médio de aproximadamente 30 nm, que é similar ao tamanho das AgNPs em pH = 6,0.

**[0096]**As amostras foram inicialmente embutidas em resina epóxi e curadas em uma estufa a 60°C, por um período de 24 h. Em seguida, as amostras foram trimadas com uma faca de vidro e, em seguida, secções transversais ultrafinas foram obtidas usando uma navalha de diamante Diatome com 45°, à temperatura ambiente. As secções ultrafinas de cerca de 80 nm de espessura foram coletadas e imediatamente depositadas sobre grids de cobre (200 mesh), sendo posteriormente analisadas em um microscópio eletrônico de transmissão FEI Morgagni 268D com tensão de aceleração de 80 kV.

**[0097]**A preparação dos filmes para a análise de MET, bem como a aquisição das imagens, foi realizada no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

O software Origin 7.5 foi utilizado para graficar os histogramas de distribuição de tamanhos das AgNPs, sendo que o tamanho das mesmas foi determinado com o auxílio do software Image Tool for Windows. Para a construção desse histograma foram realizadas aproximadamente 200 contagens.

#### Tratamento microbiológico de efluente industrial para reuso

##### Contagem de coliformes totais

**[0098]**A contagem de coliformes totais foi realizada no Laboratório de Análise e Pesquisa em Alimentos (LAPA) da UCS, de acordo com a Instrução Normativa nº62 de 26 de agosto de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2003).

**[0099]**O método baseia-se na inoculação das diluições desejadas das amostras sob teste em ágar cristal violeta vermelho neutro bile (VRBA), e posterior contagem das colônias suspeitas. O ágar cristal violeta vermelho neutro bile apresenta em sua composição sais biliares e cristal violeta, responsáveis pela inibição de micro-organismos Gram-positivos e vermelho neutro (um indicador de pH) que revela a fermentação da lactose pelos micro-organismos presentes.

### Utilização dos filmes com AgNPs no tratamento de um efluente industrial

**[0100]** A avaliação da eficiência bactericida, frente a um efluente industrial para reuso, foi realizada utilizando-se apenas o filme (PAH<sub>8,0</sub>/PAA<sub>4,0</sub>)<sub>20</sub>, imerso em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 4 h e reticulado com glutaraldeído.

**[0101]** O filme (PAH<sub>8,0</sub>/PAA<sub>4,0</sub>)<sub>20</sub> foi escolhido para ser utilizado no tratamento de um efluente industrial para reuso pelo fato de ter apresentado o melhor resultado em termos de eficiência bactericida nos testes de difusão em ágar, bem como por ter incorporado a maior quantidade de prata, de acordo com os resultados de caracterização já discutidos anteriormente. Em um primeiro ensaio, os filmes produzidos foram imersos em 250 mL de efluente industrial para reuso em diferentes tempos de contato. No final do tratamento, procedeu-se à contagem dos coliformes totais em cada um dos ensaios realizados. A influência do tempo de contato dos filmes no percentual de remoção de coliformes totais pode ser visualizada na Figura 15. É possível observar que após 5 min ocorreu uma redução de aproximadamente 27% dos coliformes presentes na amostra inicial (efluente sem tratamento). Após 15 min, mais da metade dos micro-organismos haviam sido eliminados e, após 360 min, em torno de 89,6% dos coliformes foram removidos. A Figura 16 mostra o percentual de remoção dos coliformes em cada tempo, bem como os resultados da remoção na reutilização em um segundo ensaio. Como pode ser observado, os valores de remoção no segundo ensaio (Figura 16) são muito semelhantes aos encontrados no primeiro ensaio (Figura 15). No segundo ensaio, verificou-se que quando os filmes foram reutilizados, a remoção de coliformes foi maior do que na primeira utilização, uma vez que a quantidade de prata lixiviada é superior àquela da primeira utilização.

**[0102]** No primeiro ensaio, os substratos de vidro contendo esse filme foram inicialmente colocados em erlenmeyers de 500 mL (um por frasco). Em seguida, os mesmos foram recobertos com 250 mL de um efluente industrial que apresentava uma contagem total de coliformes de 900 UFC/mL, pH igual a

7,1 e os parâmetros físico-químicos apresentados na Tabela 2. Na sequência, os erlenmeyers foram agitados em uma mesa orbital a 180 rpm por intervalos de tempo de 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240 e 360 min, respectivamente. Ao término deste procedimento, as amostras de efluente foram acondicionadas em frascos âmbar, previamente sanitizados e esterilizados, e encaminhados ao LAPA para uma nova contagem.

**Tabela 2.** Parâmetros físico-químicos do efluente industrial utilizado no primeiro ensaio do tratamento de efluente industrial para reuso.

Parâmetro	Quantidade (mg/L)
Cobre total	0,0068
Cromo total	0,018
DBO	16
DQO	54,9
Fósforo total	0,28
Nitrogênio amoniacal	2,33
Nitrogênio total Kjeldahl	3,79
Óleos e graxas minerais	<1
Sólidos sedimentáveis	<0,1
Sólidos suspensos totais	19
Zinco total	0,09

**[0103]** Visando avaliar também a possível reutilização desses filmes, foi realizado um segundo ensaio, porém considerando-se apenas os tempos em que foram observados os maiores percentuais de redução de coliformes totais no primeiro ensaio (ou seja, em 5, 10, 15, 30 e 120 min, respectivamente). O efluente utilizado para a realização deste segundo ensaio possuía uma contagem de coliformes totais de 1300 UFC/mL, pH igual a 6,7 e os parâmetros físico-químicos descritos na Tabela 3.

**[0104]** Os substratos de vidro utilizados neste segundo ensaio foram reaproveitados, sendo colocados, após a lavagem com água deionizada e imediatamente ao término de cada tempo, em um novo erlenmeyer contendo o



efluente industrial sem tratamento, pelo mesmo tempo e sob as mesmas condições descritas anteriormente.

**Tabela 3.** Parâmetros físico-químicos do efluente industrial utilizado no segundo ensaio do tratamento de efluente industrial para reuso.

Parâmetro	Quantidade (mg/L)
Cobre total	0,013
Cromo total	0,0036
DBO	16
DQO	543,1
Fósforo total	0,067
Nitrogênio amoniacal	0,49
Nitrogênio total Kjeldahl	2,62
Óleos e graxas minerais	<1
Sólidos sedimentáveis	<0,1
Sólidos suspensos totais	6
Zinco total	0,113

#### Quantificação de prata no efluente industrial

**[0105]**A prata lixiviada durante o tratamento do efluente industrial com o filme (PAH<sub>8,0</sub>/PAA<sub>4,0</sub>)<sub>20</sub> foi quantificada por meio da técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), utilizando o método 3120B do Standard Methods 22st (Standard, 2012). O limite de detecção do método é de 0,001 mg/L.

**[0106]**A quantificação de prata presente no filme (PAH<sub>8,0</sub>/PAA<sub>4,0</sub>)<sub>20</sub>, anteriormente ao tratamento do efluente, foi igualmente realizada. Para tanto, efetuou-se a dissolução desse filme em HNO<sub>3</sub> 65% (v/v) por 24 h.

**[0107]**A Tabela 4 apresenta os resultados referentes à concentração de prata no efluente industrial para reuso, no primeiro ensaio realizado, após o tratamento do mesmo com o filme (PAH<sub>8,0</sub>/PAA<sub>4,0</sub>)<sub>20</sub>, imerso em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 4 h e reticulado com glutaraldeído. Como pode ser observado, o efluente bruto não possui prata na sua composição e, além disso, os filmes produzidos nesse trabalho possuem atividade bactericida sobre os

coliformes, tanto através do contato como pela lixiviação da prata no efluente, uma vez que no tempo de 5 min apesar de não ocorrer lixiviação de prata, 26,7% dos coliformes foram removidos. Nos tempos seguintes, a lixiviação ocorreu, mas foi pequena chegando ao máximo de 0,003 mg/L após 360 min de tratamento, o que representa apenas 3% da quantidade máxima de prata permitida por lei em efluentes para reuso (Brasil, 2011).

**[0108]** A quantificação total de prata presente nos filmes produzidos foi realizada para verificar o percentual de prata que é lixiviado em cada teste, bem como para avaliar a possibilidade de reutilização dos filmes em novos tratamentos de efluentes. A quantidade de prata presente em um filme não utilizado foi de 0,058 mg/L.

**Tabela 4.** Concentração de prata no efluente industrial para reuso após o tratamento com o filme (PAH<sub>8,0</sub>/PAA<sub>4,0</sub>)<sub>20</sub>.

Tempo (min)	Quantidade de prata (mg/L)
0	<L.D.*
5	<L.D.
10	0,001
15	0,001
30	0,002
45	0,002
60	0,002
120	0,002
240	0,002
360	0,003

\*L.D.: Limite de detecção do método

**[0109]** No primeiro ensaio realizado verificou-se que apenas 5% da prata total do filme foi lixiviada após 360 min. Dessa forma realizou-se um segundo ensaio, utilizando apenas os tempos em que foram observados os maiores percentuais de redução de coliformes totais.

**[0110]** Além de uma primeira utilização, os filmes foram reutilizados para avaliar a eficiência bactericida, bem como a quantidade de prata lixiviada no efluente

tratado em um processo de reutilização.

**[0111]** Os resultados da Tabela 5 mostram que na reutilização dos filmes houve maior lixiviação de prata do que na primeira utilização. Isso se deve ao fato de que no ensaio em que os substratos foram reutilizados, o filme encontra-se inchado devido ao contato com o efluente, o que provavelmente facilita esse processo. Dessa forma, para um mesmo tempo de imersão dos filmes no efluente, a remoção dos coliformes foi superior quando os filmes foram reutilizados.

**Tabela 5.** Concentração de prata no efluente industrial para reuso na primeira utilização e na reutilização dos filmes.

Tempo (min)	Quantidade de prata (mg/L)	
	Primeira utilização	Reutilização
0	<L.D.*	<L.D.
5	<L.D.	<L.D.
10	0,002	0,002
30	0,002	0,003
120	0,002	0,003

\*L.D.:Limite de detecção do método.

**[0112]** Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

### Reivindicações

#### FILME BACTERICIDA, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO MESMO E MÉTODO DE TRATAMENTO DE EFLUENTE

1. Filme bactericida **caracterizado** por compreender pelo menos uma camada do polieletrólito poli(hidrocloreto de alilamina) (PAH), pelo menos uma camada do polieletrólito poli(ácido acrílico) (PAA), nanopartículas de prata e pelo menos um agente reticulante.
2. Filme, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo agente reticulante ser o glutaraldeído.
3. Filme, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo glutaraldeído estar em uma concentração de 1 a 5% (v/v).
4. Processo de preparação do filme bactericida, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** por compreender as seguintes etapas:
  - a) deposição das multicamadas poliméricas através da imersão alternada de um substrato em soluções aquosas dos polieletrólitos poli(hidrocloreto de alilamina) (PAH) e polieletrólito poli(ácido acrílico) (PAA);
  - b) imersão do filme fino polimérico em solução de nanopartículas de prata a uma temperatura que varia entre 15 a 30°C; e
  - c) imersão em solução aquosa de um agente reticulante.
5. Processo, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pela imersão alternada de um substrato em soluções aquosas dos polieletrólitos PAH e PAA ser por um período compreendido entre 5 e 30 min e 12 e 24 min, respectivamente, pela imersão em solução de nanopartículas de prata (b) por um período de 3 a 7 h, e pela imersão em solução aquosa de um agente reticulante (c) ser por um período compreendido entre 13 a 47 min.
6. Processo, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo agente reticulante ser o glutaraldeído.
7. Processo, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo glutaraldeído estar em uma concentração de 1 a 5% (v/v).

8. Processo, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo meio da solução de nanopartículas de prata compreender pH entre 3,0 e 6,0.

9. Método de tratamento de efluente, **caracterizado** por compreender pelo menos uma etapa de contato do filme, conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, com o efluente a ser tratado.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo efluente ser efluente industrial, água ou combinações dos mesmos.

## FIGURAS

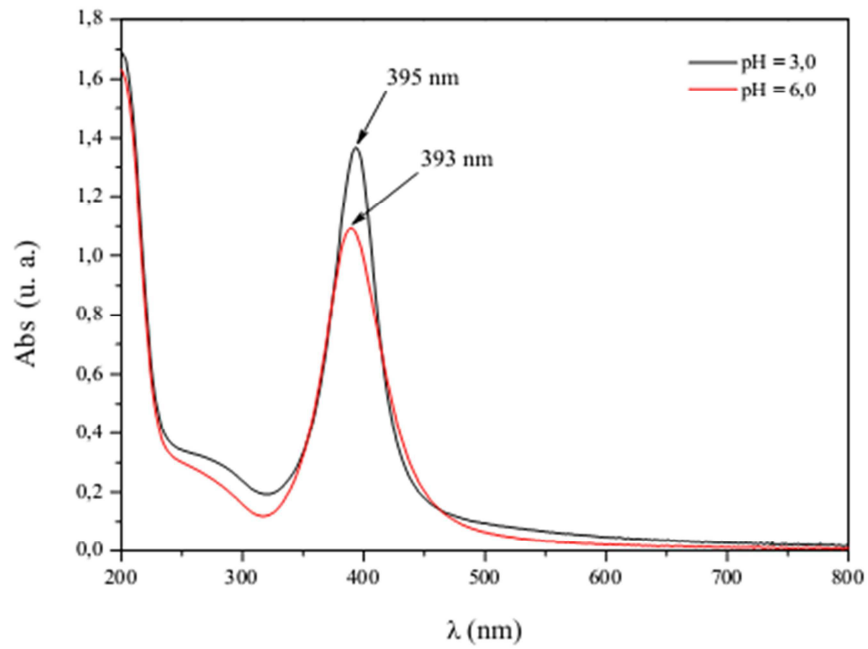


Figura 1

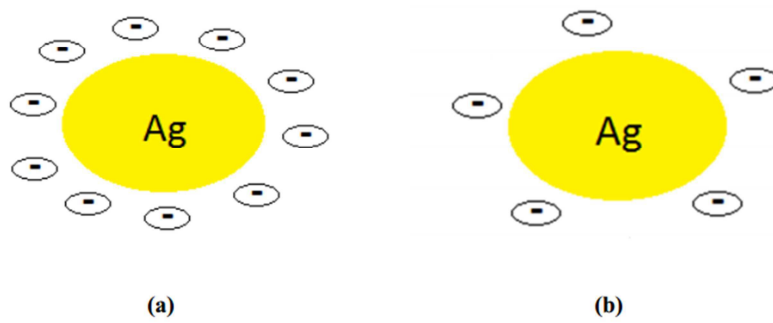
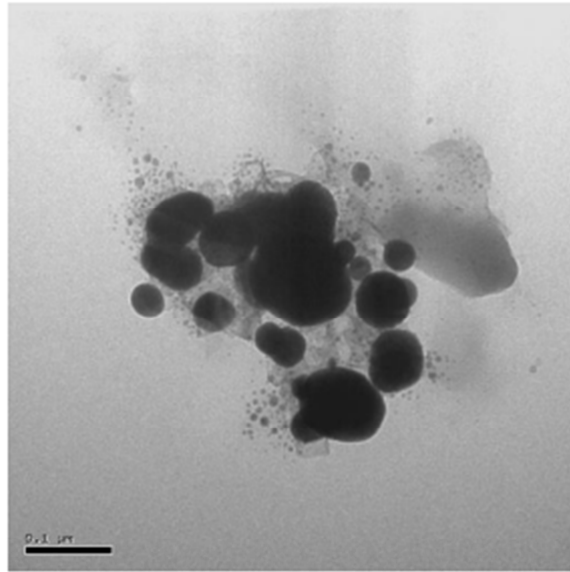
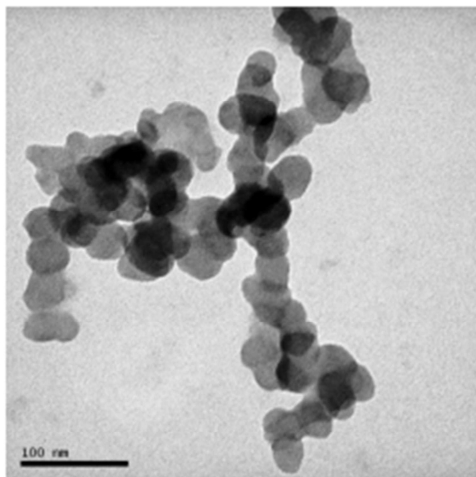


Figura 2



(a)



(b)

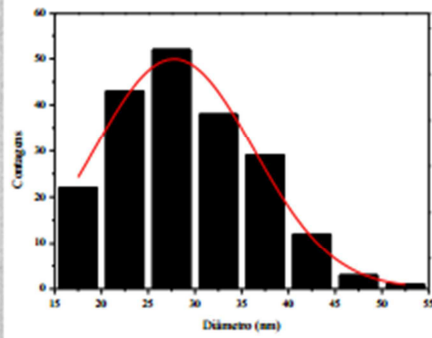


Figura 3

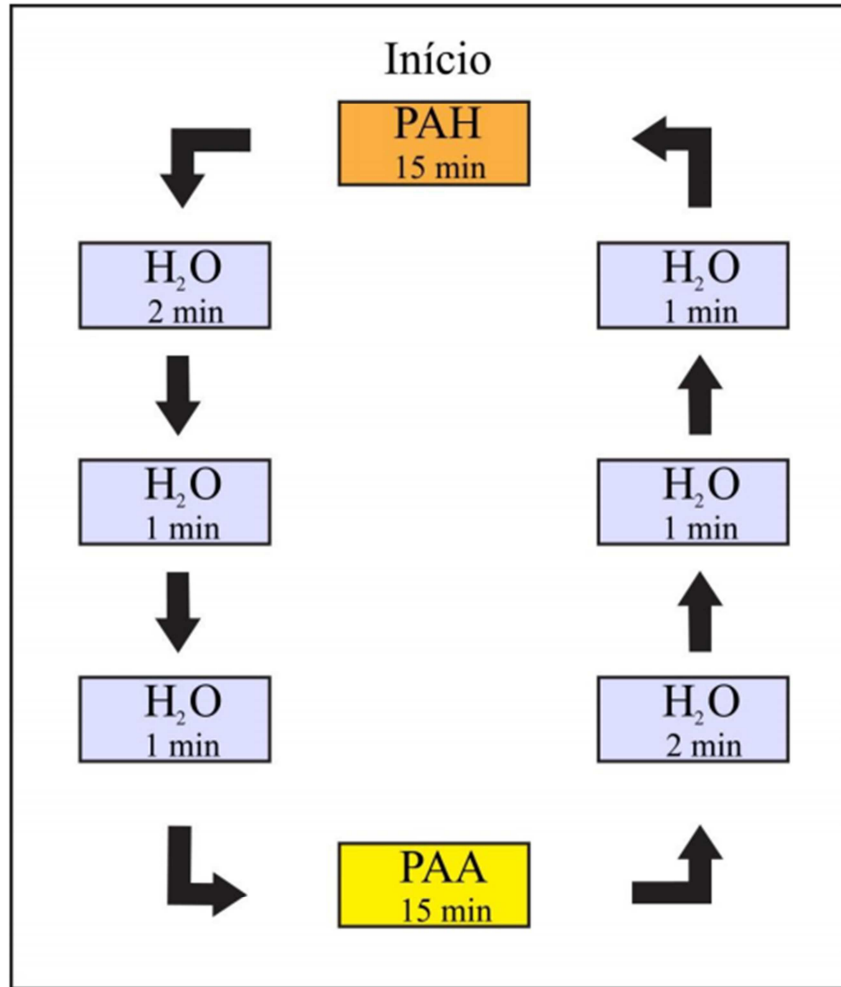


Figura 4

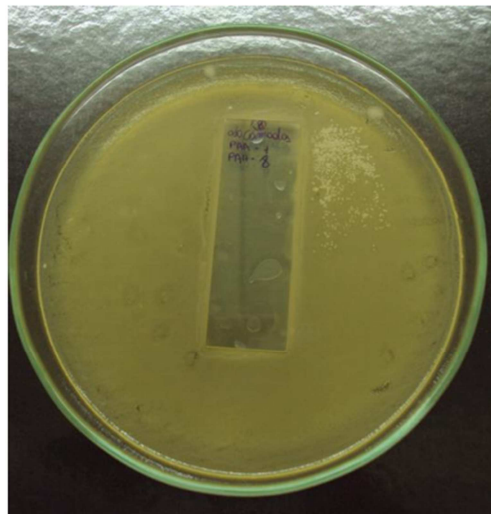




Figura 5

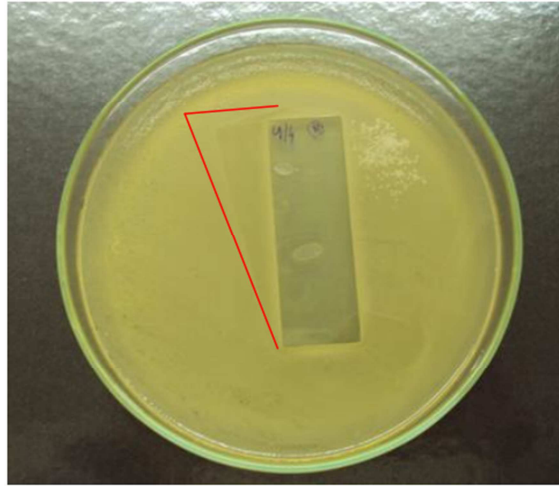


Figura 6

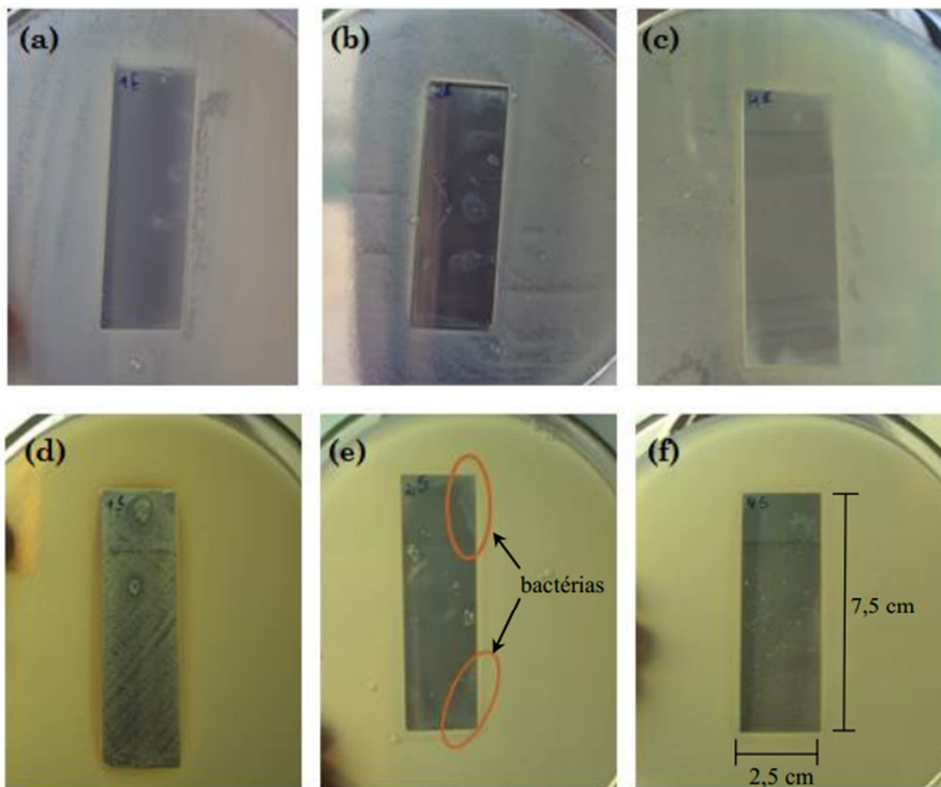


Figura 7

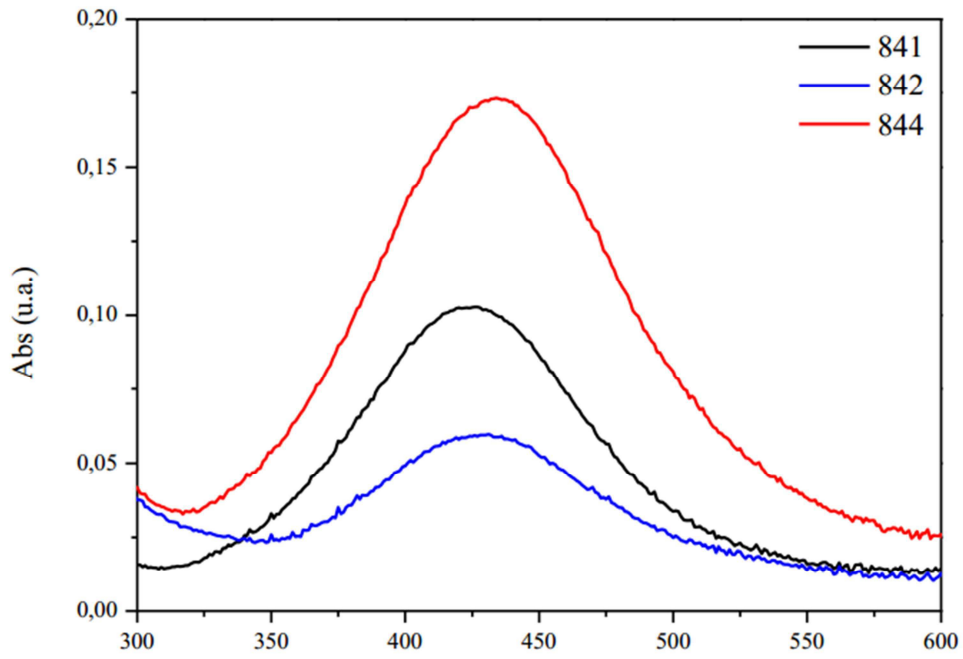


Figura 8

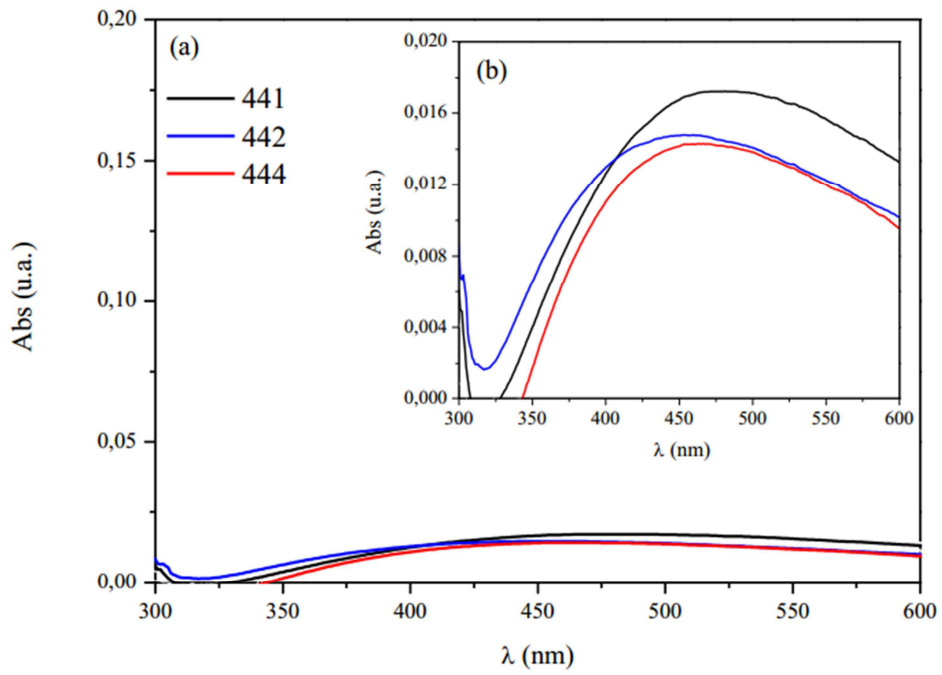


Figura 9

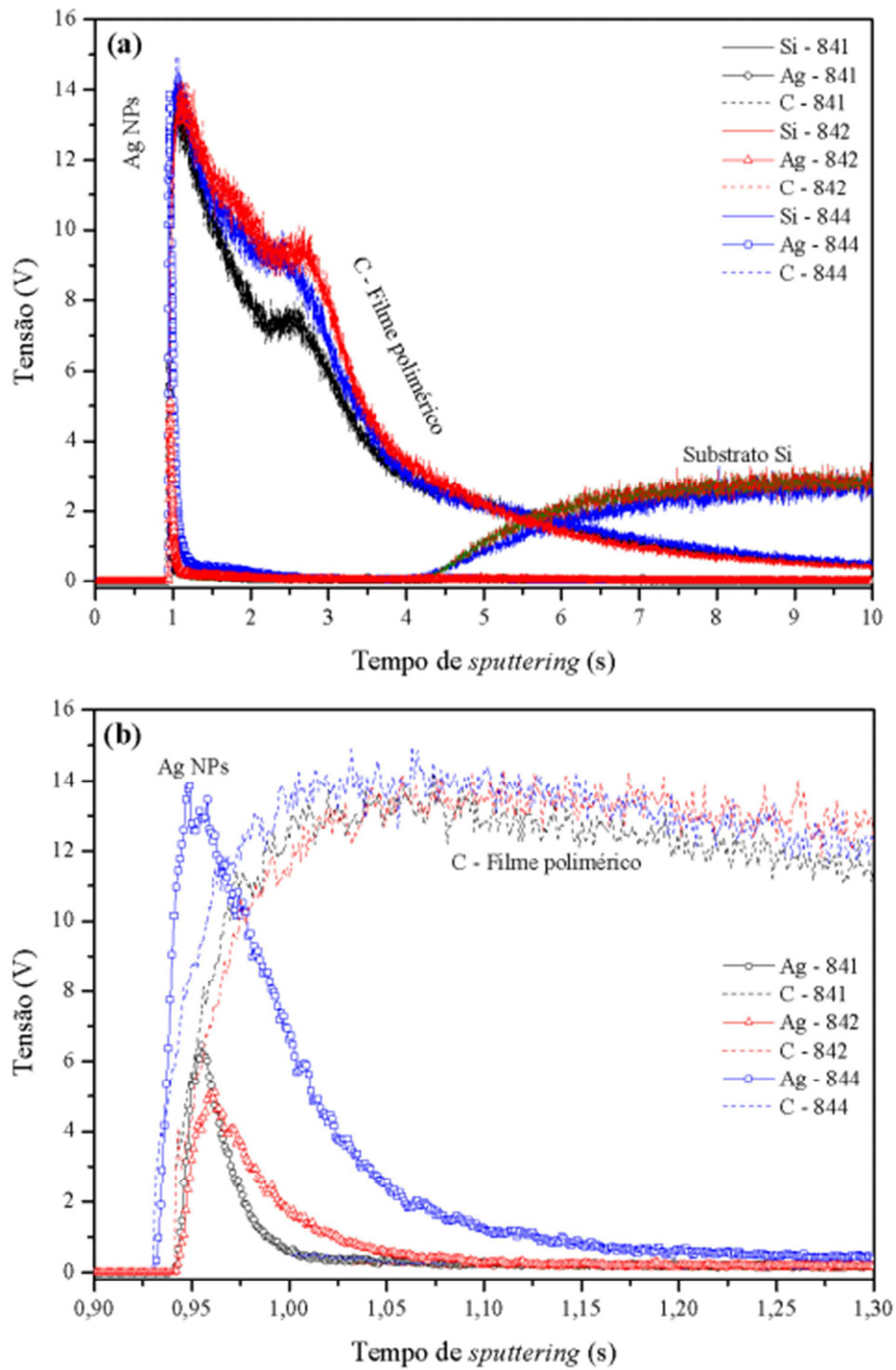
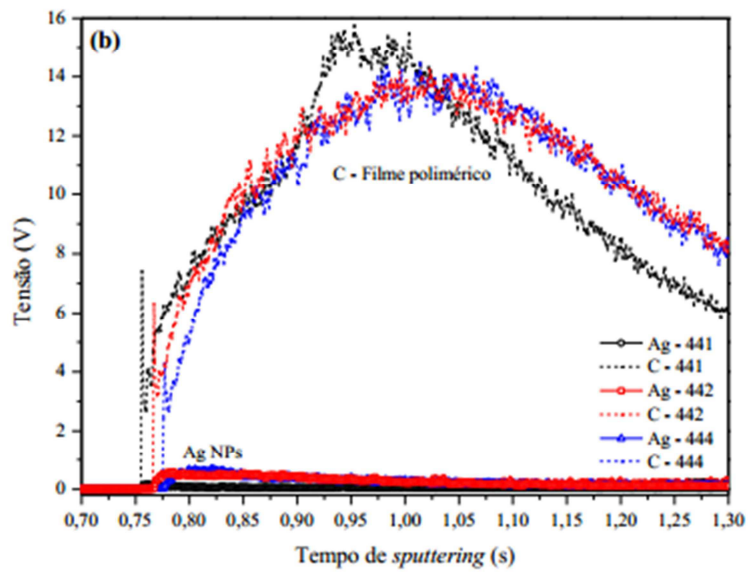
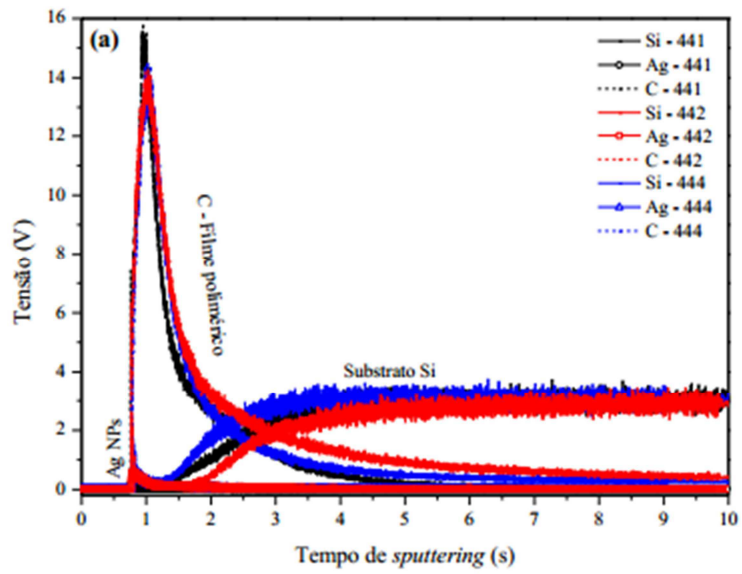


Figura 10



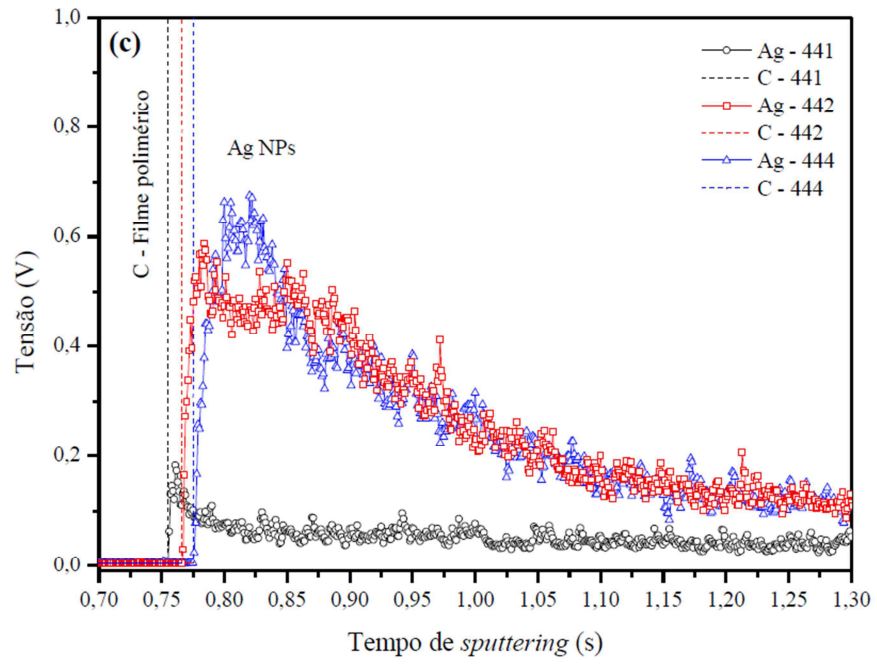


Figura 11

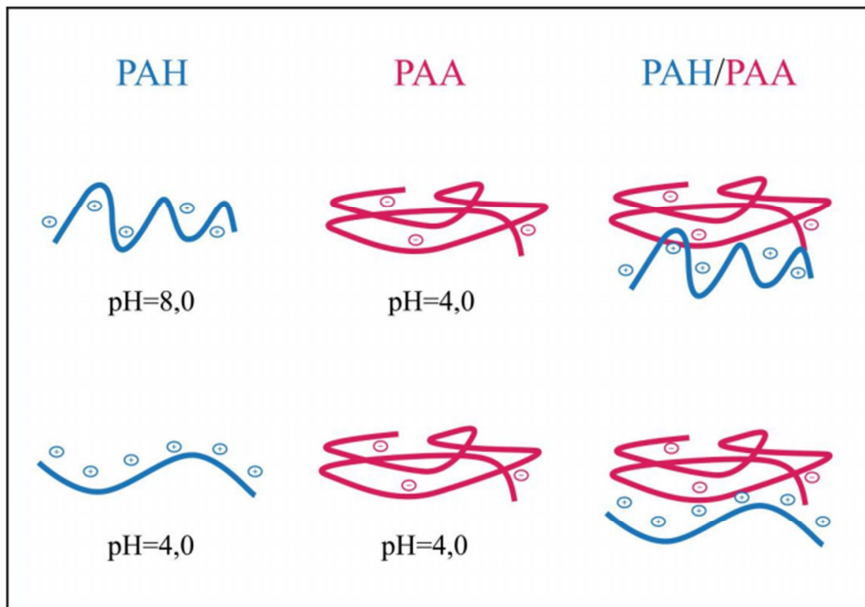


Figura 12

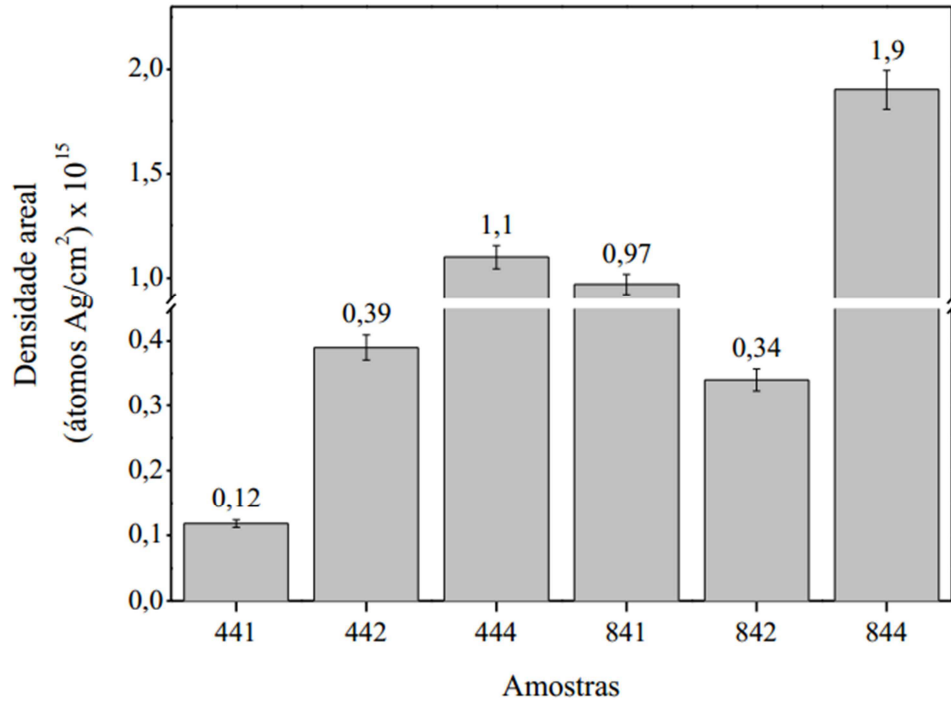


Figura 13

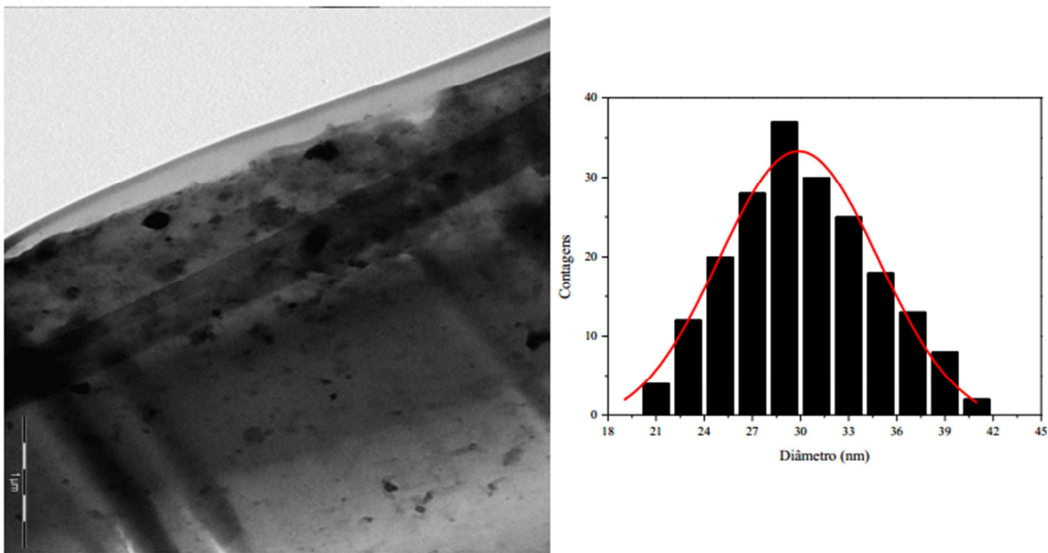


Figura 14

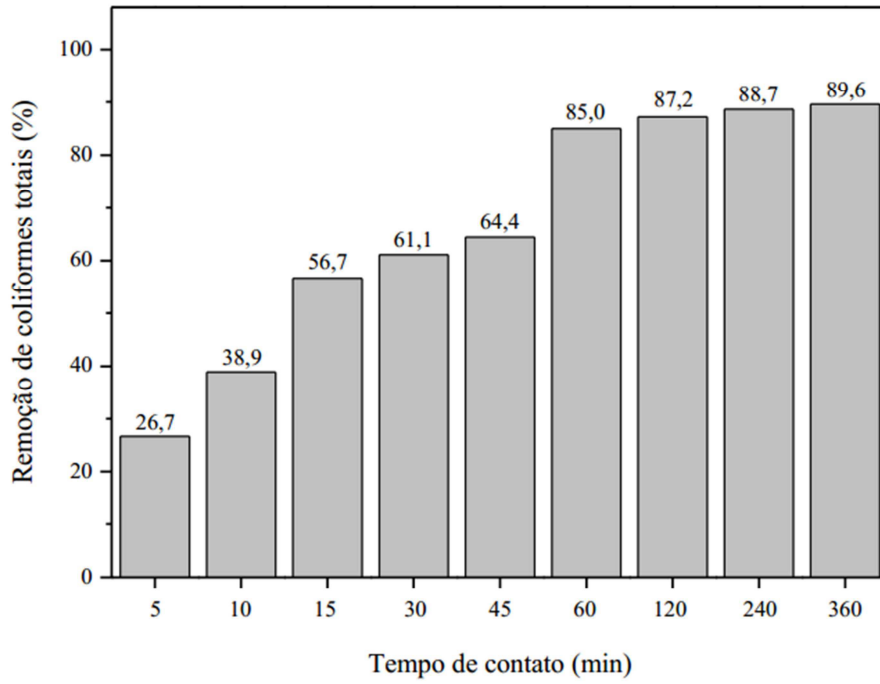


Figura 15

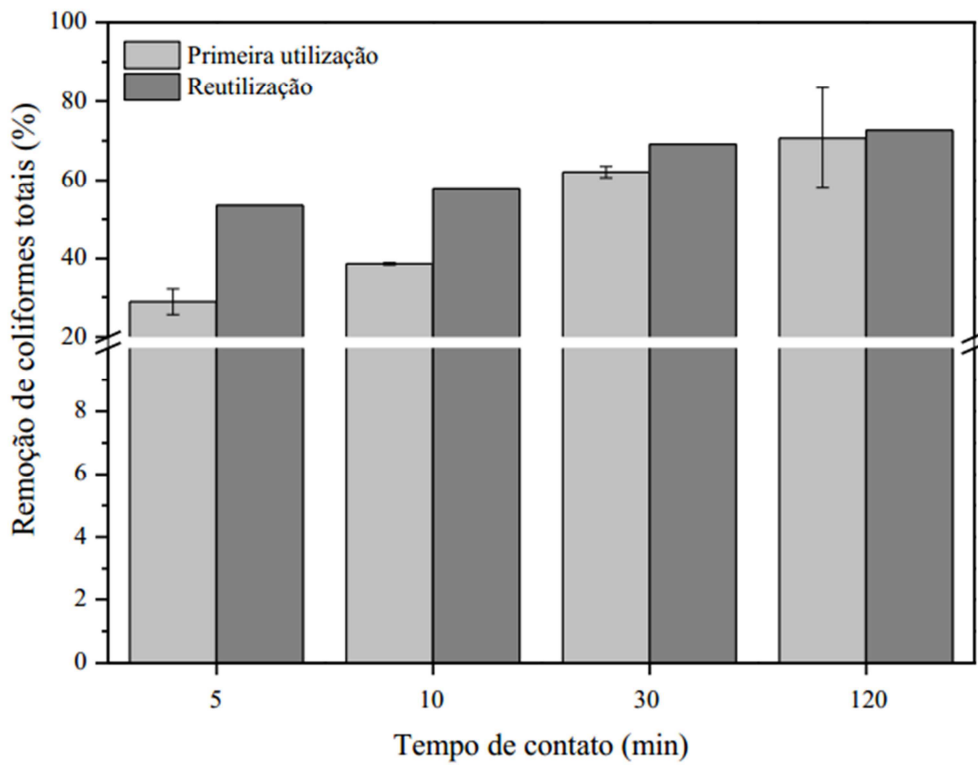


Figura 16