INFLUÊNCIA DE PRÉ-TRATAMENTOS SOBRE A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE BENTONITAS TRATADAS COM PRATA

J. A. do Rosário, P. M. Souza, R. H. Linhares, V. H. S. Cordora, M. Gusatti, L. A. da Silva, R. B. Lima, C. T. Pich, N. C. Kuhnen, H. G. Riella
Laboratório de Materiais e Corrosão, Departamento de Engenharia Química, Centro Tecnológico, Caixa Postal 476, Universidade Federal de Santa Catarina, Trindade, Florianópolis, SC – CEP: 88.040-900
E-mail: jeanear@gmail.com
Depto de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina

A argila bentonítica caracteriza-se por apresentar diversas propriedades especiais, como uma alta capacidade de troca catiônica e uma elevada área superficial. Estas conferem a argila um grande poder de adsorção, de troca de íons e de reações de superfície, permitindo o seu uso, por exemplo, no desenvolvimento de materiais antimicrobianos. Este trabalho visa avaliar os efeitos de alguns pré-tratamentos sobre a atividade antimicrobiana de uma bentonita brasileira tratada com prata. A argila natural foi beneficiada por sedimentação e por ativação alcalina com Na_2CO_3. A obtenção de atividade bactericida foi dada por troca iônica em suspensão com nitrato de prata. O teste microbiológico foi realizado pelo método de disco-difusão em ágar sobre as bactérias Escherichia coli e Staphylococcus aureus. Os resultados demonstram que as amostras tratadas com prata apresentam forte atividade bactericida e que os pré-tratamentos provocaram o aumento de cerca de 3mm no diâmetro do halo de inibição formado.

Palavras-chave: bentonita antimicrobiana, ativação alcalina, sedimentação.

INTRODUÇÃO

Argilas bentoníticas são muito utilizadas em uma ampla variedade de aplicações industriais, principalmente devido às propriedades peculiares de seu argilomineral predominante – a montmorilonita. A sua elevada capacidade de troca

catiônica, poder de adsorção e estrutura em camadas impulsionou o seu uso na formação de materiais antimicrobianos, combinando a natureza inerte desta argila à habilidade de se dispersar em meios aquosos e adsorver bactérias [1] com a capacidade de intercalação de espécies químicas em seu espaço interlamelar.

Para atribuir propriedades antibacterianas a um material inerte como a argila, é necessário tratá-lo com íons metálicos de natureza bacteriostática, tais como prata, cobre e zinco. É conhecido o poder destas espécies químicas em inibir o nascimento e ou ainda de eliminar micróbios danosos pela alteração de seu metabolismo. Estudam mostram que montmorilonitas intercaladas com espécimes bacteriostáticas como Ag^{+} e Cu^{2+} apresentaram uma forte atividade antimicrobial contra, por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* [1, 2, 3, 4, 5].

Produtos bactericidas à base de argila se apresentam usualmente sob a forma de compósitos, em que os íons metálicos são impregnados superficialmente ou intercalados em seu carregador [6]. Isto ocorre com a simples troca dos cátions intercambiáveis do meio interplanar da montmorilonita pelos íons metálicos provenientes de seus sais em solução. Íons de prata são extensivamente usados na síntese de agentes antimicrobianos por serem bastante efetivos na destruição de bactérias e fungos, a concentrações e toxicidade relativamente baixas [7]. Esta característica é muito importante para certos segmentos da indústria, normalmente aqueles que requerem pureza e higiene, com remoção parcial ou completa de microorganismos nocivos. Assim, a procura por produtos com propriedades antimicrobianas tem recebido atenção especial para estes tipos de processos, como em matérias-primas direcionadas a cosméticos, produtos e utensílios farmacêuticos, hospitalares e veterinários, para a indústria de alimentos e de rações animais, entre outros [6].

Para aumentar a área superficial de bentonitas, e com isto, o seu poder de adsorção para íons metálicos, alguns estudos neste campo empregam meios ácidos e altas temperaturas. Tais rotinas melhoram a atividade antimicrobiana de bentonitas com prata, mas com um efeito direto sobre a estrutura mineralógica da argila, o que afeta as suas propriedades essenciais.

O pré-tratamento mecânico de argilas através da sedimentação gravimétrica têm sido utilizado largamente para eliminar fases mineralógicas indesejáveis e aumentar a fração argilosa predominante, como a fase montmorilonítica de

bentonitas. A ativação alcalina, por sua vez, é muito utilizada para aumentar o teor sódico interplanar das bentonitas cálcicas ou policatiônicas, o que acarreta não só o beneficiamento de boa parte de suas propriedades, como também proporciona uma melhor troca iônica por íons Ag^+, devido a isomorfia entre os dois cátions. Nenhum estudo até o momento investigou se existe uma influência destes já conhecidos pré-tratamentos de bentonitas sobre a sua atividade antimicrobiana após a intercalação com a prata.

Com isto, o objetivo deste estudo é preparar uma bentonita modificada com prata usando uma argila brasileira e avaliar se os pré-tratamentos de sedimentação e ativação alcalina com Na_2CO_3 proporcionam algum efeito sobre a intercalação da prata.

MATERIAIS E MÉTODOS

Bentonita

Amostras da argila de Quatro Barras, município do Estado do Paraná, foram previamente caracterizadas mineralógica e quimicamente como uma bentonita policatiônica, pela presença de montmorilonita com frações de quartzo, caulinita, albita e ortoclase. A capacidade de troca catiônica desta argila, determinada por adsorção com azul de metileno, é de 42,5 meq/100g e o índice de inchamento de Foster é de 2,0 ml/g. Tais valores baixos indicam a deficiência de íons Na^+ no meio interlamelar, comprometendo as suas propriedades mais básicas.

Pré-tratamento 1 – Sedimentação

As argilas submetidas a este tratamento foram dispersas em água e mantidas sob agitação vigorosa por 7 dias. Após este período, a suspensão argilosa foi depositada em um cone de sedimentação de 50cm de altura, e mantida em repouso por mais 2 dias, para a decantação das partículas não-argilosas de maior granulometria. Então a fração correspondente aos 2/3 superiores da dispersão foi coletada, seca a 50ºC, moída e peneirada em malha 200 mesh, para obtenção de grãos menores ou iguais a 75μm de diâmetro.

Pré-tratamento 2 – Ativação Alcalina

Argilas naturais (NAT) e as provenientes do ensaio de sedimentação (SED) foram submetidas a processamento químico por ativação alcalina com Na_2CO_3, para melhorar o seu conteúdo sódico interlamelar. Para isto, uma suspensão de 100g/L foi preparada e mantida sob agitação até a sua completa dispersão. Uma solução de 5% em massa de Na_2CO_3 foi então adicionada à suspensão e a mistura permaneceu em agitação por 24 horas. Após o término do tempo de reação, as amostras ativadas ATI e SED-ATI obtidas respectivamente a partir de argilas naturais e das obtidas por sedimentação foram também secas a 50ºC e moídas até passarem completamente em peneira 200 mesh.

Intercalação das bentonitas com Ag^+

Para o carregamento de íons de prata nas argilas (NAT, ATI e SED-ATI) foi adotado o seguinte procedimento: 5g de cada amostra foi misturada a 50mL de uma solução 0,06N de $AgNO_3$, e a suspensão foi mantida sob agitação por 2 horas. Depois, as amostras foram lavadas com água deionizada por filtração à vácuo, até que nenhum íon de prata fosse indicado presente na solução passante pelo teste de precipitação com AgCl. Precauções foram tomadas durante todo o procedimento experimental para minimizar a exposição dos íons de prata à luz e, desta forma, evitar a redução do Ag^+ para prata metálica.

Avaliação do Potencial Antimicrobiano

A atividade antimicrobiana das argilas foi avaliada pelo halo de inibição formado para as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* através do teste de disco-difusão em ágar. Os microorganismos foram cultivados em meio *Plate Count Agar* (PCA) e mantidos a 37ºC por 24 horas para crescimento. Células provenientes deste pré-inóculo foram aplicados com alça Ni-Cr em placas de Petri (meio PCA) para formação de um “tapete” de bactérias. O ágar foi então perfurado, criando furos onde foram adicionadas 100mg das amostras naturais e tratadas, com e sem prata. O volume foi complementado com cerca de 80μL de água destilada, para umedecer a argila e assim proporcionar uma melhor difusão. Os halos de

inibição foram então medidos e fotografados após 24 horas de incubação a 37ºC. Os ensaios foram todos feitos com duplicata, e os resultados apresentados neste trabalho correspondem aos valores médios.

Para comparação, foi utilizado um estudo anterior realizado sobre as amostras naturais com e sem prata [8]. Nesta metodologia, as únicas diferenças foram no meio utilizado (*Mueller Hinton Agar* – MHA) e no diâmetro do furo, 3mm menor do que o utilizado neste estudo. Entretanto, esta informação apresenta-se sempre explicitada nos resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios dos diâmetros das zonas de inibição finais e os comprimentos dos anéis de difusão determinados pelos testes de disco-difusão em ágar estão presentes na Tabela 1. As bentonitas naturais e submetidas aos pré-tratamentos sem prata não apresentaram nenhuma atividade antibacteriana, por isso não constam na Tabela abaixo.

Tabela 1: Diâmetros dos halos de inibição e anéis de difusão

Bactéria	Meio	Amostras (além dos controles)	Diâmetros dos Halos (mm)		
			Média	Furo	Difusão
S. aureus	MHA	NAT-Ag	*9,00*	*7,00*	2,00
S. aureus	PCA	ATI-Ag	*13,75*	*10,00*	3,75
S. aureus	PCA	SED-ATI-Ag	*15,50*	*10,00*	5,50
E.coli	MHA	NAT-Ag	*9,00*	*7,00*	2,00
E. coli	PCA	ATI-Ag	*13,25*	*10,00*	3,25
E. coli	PCA	SED-ATI-Ag	*14,75*	*10,00*	4,75

O resultado da atividade antibacteriana das bentonitas naturais tratadas com prata estão de acordo com os resultados apresentados por Özdemir *et al.* (2010), onde foi reportado uma difusão de 2 a 3mm para as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

As amostras de bentonita com prata que foram submetidas aos pré-tratamentos, por outro lado, apresentaram aumentos bastante significativos nos diâmetros dos halos. Em especial, as bentonitas que passaram por sedimentação e

ativação alcalina antes da modificação com a prata elevaram em cerca de 3mm as zonas de inibição formadas.

Os resultados indicam que o processo de sedimentação removeu os minerais indesejáveis, selecionando uma maior fração de argilominerais montmoriloníticos. Conseqüentemente, o aumento do teor sódico da argila ocorreu mais expressivamente nestas amostras e, com isto, a troca pelos íons de prata foi mais efetiva, acarretando em um maior poder de inibição aos microorganismos.

As imagens dos testes de disco-difusão para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* constam respectivamente nas Figuras 1 e 2.

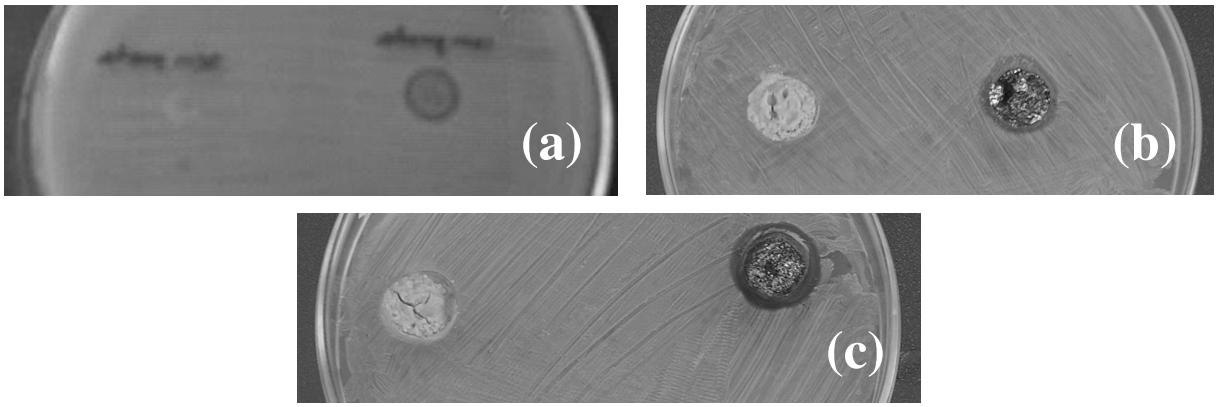

Figura 1: Teste de disco-difusão em ágar para a bactéria *Staphylococcus aureus*: (a) NAT e NAT-Ag$^+$; (b) ATI e ATI-Ag$^+$; (c) SED-ATI e SED-ATI-Ag$^+$.

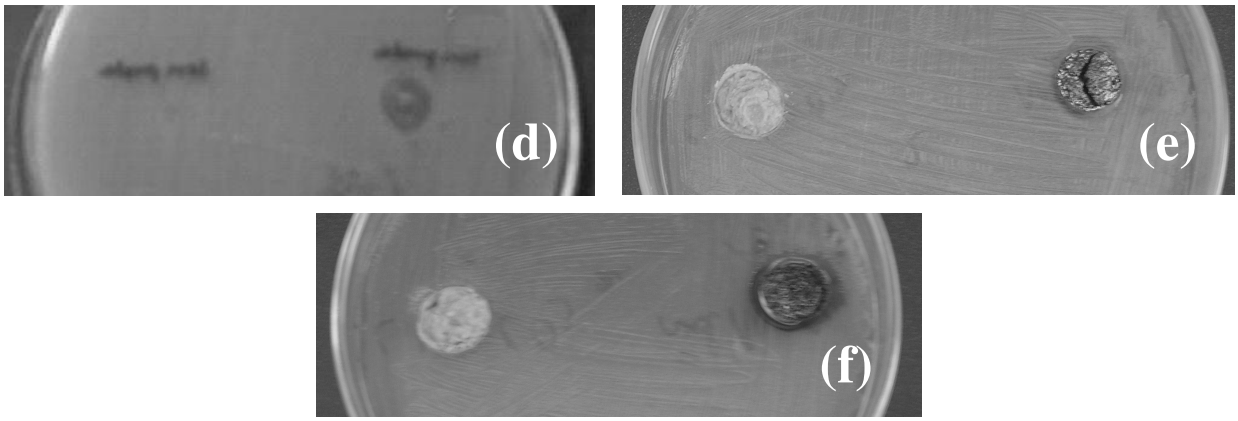

Figura 2: Teste de disco-difusão em ágar para a bactéria *Escherichia coli*: (d) NAT e NAT-Ag$^+$; (e) ATI e ATI-Ag$^+$; (f) SED-ATI e SED-ATI-Ag$^+$.

Através das imagens pode-se observar que nos testes feitos com PCA, as amostras apresentaram um aspecto metalizado na superfície, caracterizando uma possível exudação da prata (redução para prata metálica e difusão para a superfície

externa das partículas). Há possibilidade de ter ocorrido uma influência do meio de cultura, uma vez que testes realizados com outros meios não apresentaram o fenômeno.

CONCLUSÕES

Neste trabalho, bentonitas sintetizadas com prata e submetidas a pré-tratamentos foram avaliadas visando o desenvolvimento de materiais antimicrobianos. Os pré-tratamentos foram baseados em processos de sedimentação e ativação alcalina com Na_2CO_3 visando, respectivamente, o aumento do teor montmorilonítico da argila natural e a melhoria do conteúdo de Na^+ interplanar, para facilitar a troca iônica isomórfica pelos íons de Ag^+.

A atividade antimicrobiana examinada sobre as bactérias *S. aureus* e *E.coli* mostraram ausência de potencial bacteriostático da bentonita natural. As amostras tratadas com prata, por outro lado, apresentaram uma excelente atividade antibacteriana para os microorganismos avaliados. E, finalmente, indicaram que os pré-tratamentos conseguem melhorar significativamente a intercalação dos íons de prata na bentonita, acarretando em um aumento de até 55% nas zonas de inibição formadas.

Desta forma, pode-se concluir que as bentonitas podem ser beneficiadas através de uma metodologia bastante simples, resultando no desenvolvimento de um material bactericida de boa eficiência contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

REFERÊNCIAS

(1) ÖZDEMIR, G.; LIMONCU, M. H.; YAPAR, S. The antibacterial effect of heavy metal and cetylpridinium-exchanged montmorillonites. **Appl. Clay Sci.**, v.48, p. 319-323, 2010.

(2) OHASHI, F.; OYA, A. Antimicrobial and antifungal agents derived from clay minerals. **J. Mater. Sci.**, v.27, p. 5027-5030, 1992.

(3) ZHOU, Y.; XIA, M.; YE, Y.; HU, C. Antimicrobial ability of Cu^{2+}-montmorillonite. **Appl. Clay Sci.**, v.27, p. 215-218, 2004.

(4) HU, C.; XIA, M. Adsorption and antibacterial effect of copper-exchanged montmorillonite on *Escherichia coli* K_{88}. **Appl. Clay Sci.**, v.31, p. 180-184, 2006.
(5) FROST, R.; HE, H.; YANG, D.; YUAN, P.; SHEN, W. A novel organoclay with antibacterial activity prepared from montmorillonite and chlorhexidini acetas. **J. Colloid Interface Sci.**, v.297, p. 235-243, 2006.
(6) LI, B.; YU, S.; HWANG, J. Y ; SHI, S. Antibacterial vermiculite nano-material. **J. Miner. Mater. Char. Eng.**, v.1, n.1, p. 61-68, 2002.
(7) OLIVEIRA, L. M.; OLIVEIRA, P. A. P. L. V. Revisão: Principais agentes antimicrobianos utilizados em embalagens plásticas. **Braz. J. Food Technol.**, v.7, n.2, p. 161-165, 2004.
(8) ROSÁRIO, J. A.; MOURA, G. B. G.; GUSATTI, M.; RIELLA, H. G. Synthesis of silver-treated bentonite: Evaluation of its antibacterial properties. **Chem. Eng. Trans.**, v.17, p. 1795-1800, 2009.

INFLUENCE OF PRE-TREATMENTS ON THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SILVER TREATED BENTONITE

The bentonite clay is known for presenting several special properties, such as a high cation exchange capacity and surface area. They provide a great adsorption power, ion exchange and surface reactions to the clay, enabling its use, eg in the development of antimicrobial materials. This study aim to evaluate the effects of some pretreatments on the antimicrobial activity of a Brazilian bentonite treated with silver. The natural clay was beneficiated by gravimetric sedimentation and alkaline activation with Na_2CO_3. The obtainment of bactericidal activity was provided by ion exchange in suspension with silver nitrate. The microbiological test was performed by disk susceptibility test on bacteria Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Results show that the samples treated with silver present strong bactericidal activity and that the pretreatments led to an increase of about 3mm in the diameter of inhibition zone formed.

Key-words: antimicrobial bentonite, alkaline activation, sedimentation