

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS – UFG
ESCOLA DE ENGENHARIA CIVIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTU SENSU* EM ENGENHARIA DO
MEIO AMBIENTE – PPGEMA

WALESKA FERNANDA FERREIRA MORGADO

DESINFECÇÃO DE ÁGUAS NATURAIS POR RADIAÇÃO SOLAR
UTILIZANDO OS BIOINDICADORES:
Escherichia coli* e *Clostridium perfringens

GOIÂNIA

2008

WALESKA FERNANDA FERREIRA MORGADO

**DESINFECÇÃO DE ÁGUAS NATURAIS POR RADIAÇÃO SOLAR
UTILIZANDO OS BIOINDICADORES:
Escherichia coli e *Clostridium perfringens***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Engenharia do Meio Ambiente da Universidade Federal de Goiás (UFG) para obtenção do título de Mestre em Engenharia do Meio Ambiente.

Área de Concentração: Saneamento Ambiental e Recursos Hídricos

Orientadora: Prof^ª. Dr^a. Mariângela Fontes Santiago

Co-Orientadores: Prof^ª. Dr^a. Luiza Cintra Campos e Prof. Dr. Marcelo de Paula Corrêa

GOIÂNIA

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M845d Morgado, Waleska Fernanda Ferreira.
Desinfecção de águas naturais por radiação solar utilizando os
bioindicadores : *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* /
Waleska Fernanda Ferreira Morgado. – 2008.
125 f. : il., tabs., grafs. ; 29 cm.

Bibliografia: f. 104-108.
Anexos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Escola de Engenharia Civil, Programa de Pós-Graduação Strictu
Sensu em Engenharia do Meio Ambiente, Goiânia, 2008.

Orientação: Prof^a. Dra. Mariângela Fontes Santiago.
Co-orientadores: Profa. PhD Luiza Cintra Campos e Prof. Dr.
Marcelo de Paula Corrêa.

1. Desinfecção de água por radiação solar. 2. Água -
desinfecção. 3. *Escherichia coli*. 4. *Clostridium perfringens*. I.
Título.

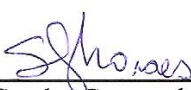
CDU: 628.166.085

WALESKA FERNANDA FERREIRA MORGADO

**DESINFECÇÃO DE ÁGUAS NATURAIS POR RADIAÇÃO SOLAR
UTILIZANDO OS BIOINDICADORES:
Escherichia coli e *Clostridium perfringens***

Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Engenharia do Meio Ambiente da Universidade Federal de Goiás, para obtenção do grau de Mestre, aprovada em 25 de agosto de 2008, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:


Profª. Drª. Mariângela Fontes Santiago – UFG
Presidente da Banca


Profª. Drª. Sandra Gomes de Moraes – UNICAMP

Profº. PhD Eduardo Queija de Siqueira – UFG


Profª. Drª. Ieda Maria Sapateiro Torres – UFG

GOIÂNIA

2008

Aos meus pais, sobretudo, por serem essas pessoas maravilhosas no sentido pleno da palavra, íntegras, companheiras e amorosas, que me estimulam sempre na busca de mais conhecimentos e fazem com que não desista nunca. O meu sincero reconhecimento é a conclusão deste trabalho dedicado a vocês.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me fortalecer nos momentos necessários e trazer sabedoria na condução do meu dia-a-dia, de forma a reunir todos os elementos que foram precisos nesta etapa da minha vida.

Ao meu amor e companheiro, Wilson Mendonça Neto, por seu apoio e estímulo diário, estando ao meu lado para minimizar minhas deficiências físicas e emocionais na conclusão deste. Que minhas numerosas ausências sejam agora compensadas!

Aos meus pais, irmãos e toda família e amigos que, de alguma ou várias formas, me ajudaram, agradeço pelo amor e incentivos constantes.

À minha orientadora Prof^ª Mariângela Fontes Santiago, por sua sabedoria na condução dos desafios surgidos, e por seu exemplo diário como profissional acadêmico.

Aos meus Co-Orientadores, Prof^ª. Luiza Cintra Campos e Prof^º. Marcelo de Paula Corrêa, que, mesmo distantes, contribuíram imensamente com seus conhecimentos neste trabalho.

À Prof^ª. Ieda Maria Sapateiro Torres, por disponibilizar o laboratório na Faculdade de Farmácia da UFG para as análises microbiológicas e, principalmente, por sua amizade.

À Universidade Federal de Goiás – UFG, em especial aos professores do PPGEMA, por sua valorosa contribuição nesta área extremamente atual e necessária e aos professores e funcionários da Faculdade de Farmácia que colaboraram para a execução deste trabalho.

À Universidade de Brasília – UnB pela oportunidade de aperfeiçoamento técnico.

À Giovanna, por sua colaboração como precursora desta linha de pesquisa e ao Thiago por seu apoio nas análises estatísticas.

À Turma do PPGEMA, pela união que muito contribuiu para superar os momentos de dificuldades e às colegas Margareth, Suzi e Maysa por seu companheirismo.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro através da bolsa de pesquisador de mestrado.

“Deus criador, Pai da família humana, Vós formastes a Amazônia, maravilha da vida, Bênção para o Brasil e para o mundo. Despertai em nós o respeito e a admiração pela obra Que vossa mão entregou aos nossos cuidados. Ensinai-nos a reconhecer o valor de cada criatura Que vive na terra, cruza os ares ou se move nas águas. Perdoai, Senhor, a ganância e o egoísmo destruidor; Moderai nossa sede de posse e poder. Que a Amazônia, berço acolhedor de tanta vida, Seja também o chão da partilha fraterna, Pátria solidária de povos e culturas, Casa de muitos irmãos e irmãs. Enviai-nos todos em missão! O Evangelho da vida, luz e graça para o mundo, Fazendo-nos discípulos e missionários de Jesus Cristo, Indique o caminho da justiça e do amor; E seja anúncio de esperança e de paz Para os povos da Amazônia e de todo o Brasil.
Amém.”

ORAÇÃO DA CAMPANHA DA FRATERNIDADE 2007

RESUMO

TÍTULO: Desinfecção de Águas Naturais por Radiação Solar utilizando os bioindicadores: *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*

Os países latino-americanos enfrentam sérios problemas com a alta incidência de doenças relacionadas com a falta de saneamento básico, sendo mais afetadas as populações que vivem em localidades pobres, periféricas e em zonas rurais. A utilização da radiação solar no processo de desinfecção de água, SODIS, é introduzida nesse contexto como uma alternativa de desinfecção da água independente de insumos, que funciona sem fornecimento de energia elétrica, baixo custo e de fácil operação em comunidades pequenas. Este trabalho teve por objetivo avaliar a inativação dos patógenos *Escherichia coli* e o *Clostridium perfringens* através da SODIS na região Centro-Oeste do Brasil, na cidade de Goiânia – GO. Para a determinação das bactérias *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* foi utilizado os métodos Colilert® e tubos múltiplos (NMP/100 mL), respectivamente. A inativação e o recrescimento destes bioindicadores, a análise dos parâmetros físico-químicos da água bruta e da água desinfetada pela SODIS foram os enfoques principais deste estudo. Água bruta foi coletada de um poço raso da Escola de Engenharia Civil (EEC) da Universidade Federal de Goiás (UFG) e inoculada com concentrações determinadas dos bioindicadores, separadamente, acondicionadas em garrafas de PET e expostas ao sol pelo período das 09:00 às 15:00 horas. Amostras de água foram coletadas e analisadas em laboratório após os tempos de exposição de 0, 2, 4 e 6 horas. O trabalho experimental foi dividido em duas etapas, a primeira considerou a diferença de volumes nas garrafas, 1,5 L e 2 L, para investigar o efeito das concentrações de oxigênio, a verificação do recrescimento após 3 dias de armazenamento na própria garrafa de PET em temperatura ambiente e a avaliação da água bruta antes e após a SODIS. Na segunda etapa, garrafas com volume padrão de 1,5 L foram usadas em combinação com e sem concentrador solar. Os resultados mostraram que houve uma pequena diferença, (0,25-Log para *Clostridium perfringens* e 0,5-Log *Escherichia coli*) nas inativações bacterianas em relação aos diferentes volumes, sendo maiores nas garrafas de 1,5 L para ambos os bioindicadores na etapa 1. O uso do concentrador solar não apresentou melhoria no processo em relação ao *Clostridium perfringens* e o recrescimento foi proporcional à concentração final dos bioindicadores após as 6 horas de exposição.

ABSTRACT

TITLE: Water solar disinfection using *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* as bioindicators

Latin-American countries are facing serious problems related to waterborne diseases due to the lack of basic sanitation, affecting in particular those people living in small and rural communities. Solar radiation for water disinfection, SODIS, seems a promising process for small communities since it does not require electric energy and it has low cost and easy operation. This work aimed to evaluate the inactivation of the pathogens *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* by SODIS in the Center-West region of Brazil, Goiânia-GO. The Colilert® and multiple tubes (NMP/100 mL) were used to determine the *Escherichia coli* and the *Clostridium perfringens* bacterias, respectively. The inactivation and the re-growth of these bioindicators, the physico-chemical parameters of the raw and disinfected waters were the main focus of this work. Raw water was collected from a well located at the Civil Engineering School (EEC) of Federal University of Goiás (UFG) and it was inoculated apart using pre-determined concentrations of these bio-indicators. Samples were put in transparent PET bottles with capacity of 2L and left under sunlight exposure between 9am and 3pm. Samples were collected and analyzed in the laboratory after 0, 2, 4 and 6 hours of exposure. The work was divided into two phases: the first evaluate the effect of the use of two water volumes (1.5 L and 2 L) on the pathogen inactivation. In addition, the re-growth of these pathogens in the PET bottles after 3 storage days at ambient temperature was also investigated. In the second phase, PET bottles containing 1.5 L of contaminated water were exposed to sunlight radiation with and without solar reflectors. The results showed that there was a small difference (0,25-Log to *Clostridium perfringens* and 0,5-Log to *Escherichia coli*) in the inactivation of both bioindicators between the two volumes evaluated in the first phase. The use of the solar reflector did not improve the inactivation of the *Clostridium perfringens* and their re-growth was proportional to the final concentration after 6 hours of sunlight exposure.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Principais doenças relacionadas à ingestão de água contaminada e seus agentes causadores -----	18
Tabela 2.1	Refletâncias médias em percentual de diferentes materiais -----	31
Tabela 2.2	Padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano -----	43
Tabela 2.3	Parâmetros de aceitação da água para consumo humano -----	43
Tabela 3.1	Condições de estudo da etapa 1: Setembro/Outubro – 2007 -----	47
Tabela 3.2	Condições de estudo da etapa 2: Abril/Maio – 2008 -----	47
Tabela 3.3	Métodos e equipamentos usados nas análises físico-químicas-----	52
Tabela 4.1	Características Físico-Químicas da Água do Poço – Maio / 2007-----	59
Tabela 4.2	Características Microbiológicas da Água do Poço - Maio / 2007 -----	59
Tabela 4.3	Resultados da concentração inoculada de Escherichia coli - Etapa 1 -----	61
Tabela 4.4	Resultados da concentração inoculada de Clostridium perfringens - Etapa 1----	62
Tabela 4.5	Resultados da concentração inoculada de Clostridium perfringens - Etapa 2----	63
Tabela 4.6	Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas do Clostridium perfringens na Etapa 1-----	66
Tabela 4.7	Resultados da ANCOVA para a inativação de Clostridium perfringens na etapa 1 (set/out 2007) na Faculdade de Engenharia Civil – UFG em Goiânia---	68
Tabela 4.8	Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas da Escherichia coli na Etapa 1 -----	74
Tabela 4.9	Resultados da ANOVA para a inativação de Escherichia coli na etapa 1 (set/out 2007) na Escola de Engenharia Civil – UFG em Goiânia -----	75
Tabela 4.10	Recrescimento de Escherichia coli na etapa 1 -----	76
Tabela 4.11	Matriz de correlação dos parâmetros físico-químicos avaliados na etapa 1 (set/out 2007)-----	80
Tabela 4.12	Resultados das análises microbiológicas para a água bruta na etapa 1 (setembro 2007)-----	81
Tabela 4.13	Resultados das análises microbiológicas para a água bruta na etapa 1 (outubro 2007) -----	82
Tabela 4.14	Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas do Clostridium perfringens na Etapa 2-----	87
Tabela 4.15	Resultados da ANCOVA para a inativação de Clostridium perfringens na etapa 2 (abril/maio 2008) na Escola de Engenharia Civil – UFG em Goiânia---	88

Tabela 4.16	Matriz de correlação dos parâmetros físico-químicos avaliados na etapa 2 (abril/maio 2008) -----	92
Tabela 4.17	Resultados das análises microbiológicas para a água bruta na etapa 2 (abril 2008) -----	93
Tabela 4.18	Resultados das análises microbiológicas para a água bruta na etapa 2 (maio 2008)-----	94
Tabela 4.19	Identificação microbiana dos sobreviventes a SODIS na etapa 2 -----	97
Tabela 4.20	Microrganismos identificados antes e após a SODIS -----	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Espectro da radiação solar mostrando as diferentes bandas da radiação e suas faixas de comprimento de onda -----	23
Figura 2.2	Dimerização fotoquímica de duas bases timina -----	26
Figura 2.3	Distribuição mundial da radiação solar em faixas que indicam as possibilidades de aplicações solares -----	31
Figura 2.4	Participação de diferentes materiais em embalagens de refrigerantes no período de janeiro de 2005 a dezembro de 2006 (ABIR, 2007)-----	33
Figura 2.5	Estimativas de consumo de bebidas não-alcoólicas para a região Centro-Oeste em litros/milhão (ABIR, 2007)-----	34
Figura 2.6	Estimativas de consumo de bebidas não- alcoólicas para os estados da região centro-oeste em litros/milhão (ABIR, 2007)-----	35
Figura 3.1	Condição experimental na etapa 1 -----	46
Figura 3.2	Garrafas com 1,5L e 2L de água -----	46
Figura 3.3	Concentrador solar com capacidade para 4 garrafas de PET -----	46
Figura 3.4	Condição experimental na etapa 2 -----	46
Figura 3.5	Poço da EEC/ UFG -----	49
Figura 3.6	Galões de 20L de água inoculada -----	49
Figura 3.7	Cartelas Quanti-Tray-----	53
Figura 3.8	Seladora Quanti-Tray Sealer Modelo 2X -----	53
Figura 3.9	Tubos múltiplos para determinação de <i>Clostridium perfringens</i> -----	54
Figura 3.10	Resultados negativos e positivos (negros) para <i>Clostridium perfringens</i> . -----	54
Figura 4.1	Comportamento da R-UVA na etapa 1 nos 8 experimentos -----	64
Figura 4.2	Comportamento da R-UVA na etapa 2 nos 8 experimentos -----	64
Figura 4.3	Inativação de <i>Clostridium perfringens</i> em função do tempo de exposição na etapa 1 (set/out 2007) -----	69
Figura 4.4	Recrescimento de <i>Clostridium perfringens</i> na etapa 1 -----	70
Figura 4.5	Temperaturas médias em função do tempo de exposição para <i>Clostridium perfringens</i> na etapa 1 (set./out 2007) -----	70

Figura 4.6	Valores médios de oxigênio dissolvido em função do tempo de exposição para <i>Clostridium perfringens</i> na etapa 1 (set./out 2007) -----	71
Figura 4.7	Valores médios de pH em função do tempo de exposição para <i>Clostridium perfringens</i> na etapa 1 (set./out 2007) -----	72
Figura 4.8	Turbidez média em função do tempo de exposição para <i>Clostridium perfringens</i> na etapa 1 (set./out 2007)-----	72
Figura 4.9	Valores médios para cor aparente em função do tempo de exposição para <i>Clostridium perfringens</i> na etapa 1 (set./out 2007) -----	73
Figura 4.10	Inativação de <i>Escherichia coli</i> em função do tempo de exposição na etapa 1 (set/out 2007) -----	76
Figura 4.11	Comparação da temperatura média da água exposta por 6 h nas garrafas com 1,5 L e 2 L-----	77
Figura 4.12	Comparação dos valores médios do oxigênio dissolvido na água exposta por 6 h nas garrafas com 1,5 L e 2 L -----	78
Figura 4.13	Comparação dos valores médios do pH na água exposta por 6 h nas garrafas com 1,5 L e 2 L -----	78
Figura 4.14	Comparação dos valores médios de turbidez na água exposta por 6 h nas garrafas com 1,5 L e 2 L -----	79
Figura 4.15	Comparação dos valores médios de cor aparente na água exposta por 6 h nas garrafas com 1,5 L e 2 L -----	79
Figura 4.16	Inativação de bactérias heterotróficas totais na água bruta em função do tempo de exposição na etapa 1 (set/out 2007) -----	83
Figura 4.17	Média dos parâmetros físico-químicos na água bruta para garrafas com 1,5 L antes da SODIS nos 8 experimentos -----	84
Figura 4.18	Média dos parâmetros físico-químicos na água bruta para garrafas com 1,5 L após a SODIS nos 8 experimentos -----	84
Figura 4.19	Média dos parâmetros físico-químicos na água bruta para garrafas com 2 L antes da SODIS nos 8 experimentos -----	85
Figura 4.20	Média dos parâmetros físico-químicos na água bruta para garrafas com 2 L após a SODIS nos 8 experimentos -----	85
Figura 4.21	Comparação da inativação microbiana entre os bioindicadores <i>Escherichia coli</i> e <i>Clostridium. perfringens</i> em função da radiação usados na etapa 1 (set/out 2007)-----	86

Figura 4.22	Inativação de <i>Clostridium perfringens</i> em função do tempo de exposição na etapa 2 (abril/maio 2008)-----	89
Figura 4.23	Comparação da temperatura média da água exposta por 6 h com e sem concentrador solar -----	90
Figura 4.24	Comparação do pH médio da água exposta por 6 h com e sem concentrador solar -----	90
Figura 4.25	Comparação da turbidez média da água exposta por 6 h com e sem concentrador solar -----	91
Figura 4.26	Comparação da cor aparente média da água exposta por 6 h com e sem concentrador solar -----	92
Figura 4.27	Inativação de bactérias heterotróficas totais na água bruta em função do tempo de exposição na etapa 2 (abril/maio 2008)-----	95
Figura 4.28	Média dos parâmetros físico-químicos na água bruta antes da SODIS -----	96
Figura 4.29	Média dos parâmetros físico-químicos na água bruta após a SODIS -----	96
Figura 4.30	Dias 18 e 19.04.08 -----	98
Figura 4.31	Dias 24 e 25.04.08 -----	98
Figura 4.32	Repiques de 24 h -----	98
Figura 4.33	Lâminas de Gram-----	98
Figura 4.34	BBL Gram-positivos-----	99
Figura 4.35	BBL Gram-negativos -----	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABES	Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental
ABIR	Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não-Alcoólicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
C	Citosina
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
DRCM	Meio Diferencial Enriquecido para Clostrídios
DST	Tecnologia de Substrato Definido
ETAs	Estações de Tratamento de Afluentes
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMTA	Instituto Mexicano de Tecnologia da Água
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
MUG	4-metilumbeliferil- β -d-glucoronídeo
NMP	Número Mais Provável
OD	Oxigênio Dissolvido
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONPG	o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PET	Politereftalato de Etileno ou polietileno tereftalato
POAs	Processos Oxidativos Avançados
R-UV	Radiação Ultravioleta
R-UVA	Radiação Ultravioleta A
SNIS	Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento
SODIS	Processo de desinfecção solar de águas
SOPAS	Processo de pasteurização solar
T	Timina
THMs	Trihalometanos
uC	Unidade de Cor
UFC	Unidade Formadora de Colônia

UFG	Universidade Federal de Goiás
UnB	Universidade de Brasília
UNT	Unidade Nefelométrica de Turbidez
USEPA	United States Environmental Protection Agency
uT	Unidade de Turbidez
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Objetivos	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	Radiação Ultravioleta (R-UV)	22
2.2	A Dose de R-UV	24
2.3	Mecanismos de Inativação	25
2.4	Vantagens e Desvantagens da R-UV	27
2.5	Radiação Solar	28
2.6	Recipientes – Garrafas de PET	32
2.7	Processos e mecanismos de desinfecção e esterilização	37
2.8	Microrganismos importantes na SODIS	39
2.9	Padrão de Potabilidade de Água	42
3	METODOLOGIA / ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS	45
3.1	Variações dos Experimentos	45
3.2	Água de Estudo	49
3.3	Preparo das Garrafas de PET	49
3.4	Simulações das Medidas de Radiação Solar	51
3.5	Análises	51
3.5.1	Análises Físico-Químicas	51
3.5.2	Análises Microbiológicas	52
3.6	Métodos Bacteriológicos e Inoculação das Amostras	54
3.6.1	Métodos Bacteriológicos	54
3.6.2	Preparo das Amostras	55
3.6.3	Inoculação das Amostras	56
3.6.4	Coleta e Armazenamento das Amostras	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
4.1	Resultados dos Estudos Preliminares da Água do Poço	58
4.2	Resultados das Inoculações dos Bioindicadores	61

4.2.1	Inoculação de <i>Escherichia colina</i> na Etapa 1 -----	61
4.2.2	Inoculação de <i>Clostridium Perfringens</i> na Etapa 1 -----	62
4.2.3	Inoculação de <i>Clostridium Perfringens</i> na Etapa 2 -----	62
4.3	Resultados das Simulações das Medidas de Radiação Solar -----	63
4.4	Resultados dos Estudos da Etapa 1-----	65
4.4.1	Resultados do <i>Clostridium perfringens</i> na Etapa 1 -----	65
4.4.1.1	Resultados da Inativação de <i>Clostridium perfringens</i> na Etapa 1-----	67
4.4.1.2	Recrescimento de <i>Clostridium perfringens</i> na Etapa 1 -----	69
4.4.1.3	Análise dos Parâmetros Físico-Químicos para <i>Clostridium perfringens</i> na Etapa 1 -	70
4.4.2	Resultados da <i>Escherichia coli</i> na Etapa 1-----	73
4.4.2.1	Resultados da Inativação de <i>Escherichia coli</i> na Etapa 1 -----	74
4.4.2.2	Recrescimento de <i>Escherichia coli</i> na Etapa 1 -----	76
4.4.2.3	Análise dos Parâmetros Físico-Químicos para <i>Escherichia. coli</i> na Etapa 1 -----	76
4.4.3	Análises da Água (Sem Bioindicadores) na Etapa 1-----	80
4.4.3.1	Análise dos Parâmetros Físico-Químicos da Água Bruta na Etapa 1-----	83
4.4.4	Comparação entre <i>Escherichia coli</i> e <i>Clostridium perfringens</i> na Etapa 1 -----	86
4.5	Resultados dos Estudos da Etapa 2-----	86
4.5.1	Resultados do <i>Clostridium perfringens</i> na Etapa 2 -----	86
4.5.1.1	Resultados da Inativação de <i>Clostridium perfringens</i> na Etapa 2-----	88
4.5.1.2	Análise dos Parâmetros Físico-Químicos para <i>Clostridium perfringens</i> na Etapa 2 -	89
4.5.2	Análises da Água (Sem Bioindicadores) na Etapa 2-----	93
4.5.2.1	Análise dos Parâmetros Físico-Químicos da Água Bruta na Etapa 2-----	95
4.5.2.2	Identificação Microbiana após a SODIS na Etapa 2-----	96
5	CONCLUSÕES -----	100
6	RECOMENDAÇÕES PARA FUTUROS TRABALHOS -----	102
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	103
	ANEXOS -----	108

1 INTRODUÇÃO

O elevado crescimento urbano acompanhado do desenvolvimento tecnológico e industrial tem repercussões imediatas no meio ambiente e na população que dele depende para sobrevivência. Diante deste fato, a sociedade tem tido dificuldade para se adaptar a essa nova realidade e, com isso, surgem teorias novas de consciência da saúde do meio ambiente, onde se encontram relacionados o homem e as formas básicas de saneamento, saúde e educação ambiental (HELLER, 1997).

No início do século 21, a humanidade se deparou com o problema da escassez de água como uma ameaça para a saúde humana e a vida do planeta. A escassez ou falta de água afeta mais que 40% da população mundial por razões políticas, econômicas e climáticas. Em paralelo, mais que 25% da população mundial sofre de problemas de saúde ou de higiene, relacionados à água. Apesar dos esforços institucionais para a melhoria da qualidade da água e da infra-estrutura sanitária, cerca de 1,1 bilhões de pessoas não têm acesso a um suprimento adequado de água e esgoto, especialmente em países da África, Ásia e América Latina (RANGEL, 2008).

Aproximadamente 80% de todas as doenças humanas estão relacionadas à água não tratada, saneamento precário e falta de conhecimento básico de higiene e dos mecanismos básicos das doenças. Percebe-se, portanto, a necessidade da aplicação de métodos de tratamento das águas de consumo e efluentes (RODRIGUES et al., 1993).

Os principais agentes biológicos descobertos nas águas contaminadas são as bactérias patogênicas, os vírus e os parasitas. As bactérias patogênicas encontradas na água e alimentos constituem uma das principais fontes de morbidade em nosso meio. Elas são as responsáveis pelos numerosos casos de enterites, diarreias infantis e doenças epidêmicas (como a febre tifóide), com resultados freqüentemente letais. Os vírus mais comumente encontrados nas águas contaminadas por dejetos humanos, entre outros, são os da poliomielite e da hepatite infecciosa. Dentre os parasitas que podem ser ingeridos através da água, destaca-se a *Entamoeba histolytica*, causadora da amebíase e suas complicações, inclusive para o sistema hepático. Esta é encontrada, sobretudo, em países quentes e em locais onde existem más condições sanitárias. Na tabela 1.1 podem ser observadas as principais doenças relacionadas à ingestão de água contaminada e seus agentes causadores (WHO, 1996).

Tabela 1.1 Principais doenças relacionadas à ingestão de água contaminada e seus agentes causadores (WHO, 1996).

Doenças	Agente Causador
Cólera	<i>Vibrio cholerae</i>
Disenteria bacilar	<i>Shiggella sp.</i>
Febre tifóide	<i>Salmonella typhi</i>
Hepatite infecciosa	Vírus da Hepatite do tipo A
Febre paratifóide	<i>Salmonella paratyphi</i> A, B e C
Gastroenterite	Outros tipos de <i>Salmonella</i> , <i>Shiggella</i> , <i>Proteus sp.</i>
Diarréia infantil	Tipos enteropatogênicos de <i>Escherichia coli</i>
Leptospirose	<i>Leptospirase sp.</i>

Pelo menos um terço da população nos países em desenvolvimento não tem acesso à água potável. A falta de fornecimento adequado de água e de infra-estrutura de saneamento propicia sérios riscos à saúde e expõe a população ao perigo de contaminação e doenças transmissíveis pela água não tratada. Há cerca de 4 bilhões de casos de diarreia a cada ano, e 2,5 milhões de casos que terminam em morte. A cada dia, cerca de 6000 crianças morrem de desidratação devido à diarreia (SODIS, 2008).

Segundo Monteiro (1999), vários países latino-americanos enfrentam sérios problemas com a alta incidência de doenças relacionadas com a falta de saneamento básico, sendo mais afetadas as populações que vivem em localidades pobres, periféricas e em zonas rurais. Estes locais, por não possuírem sistemas de esgoto, despejam uma elevada carga de poluição em corpos d'água, muitos dos quais servem de abastecimento de água sem nenhum tratamento antes do seu consumo. Wegelin et al. (1994) enfatiza a importância do uso de tecnologias apropriadas dos sistemas de abastecimento de água e dos sistemas de tratamento de esgotos através de baixo custo e cuja operação e manutenção possam ser gerenciadas e sustentadas com recursos locais.

Segundo o Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS), o diagnóstico dos serviços de água e esgotos de 2006 cuja publicação ocorreu em dezembro de 2007, relata que a quantidade de municípios brasileiros contidos na amostra agregada corresponde à totalização de 4.516 municípios sobre os serviços de água e de 1.251 sobre os serviços de esgotos (respectivamente, 81,2% e 22,5% do total de municípios brasileiros). Considerando esses dados, os prestadores de serviços que estão presentes no SNIS em 2006

atuam em municípios que possuem uma população urbana de 147,9 milhões de pessoas, no caso dos serviços de água, e 115,3 milhões no caso dos serviços de esgotos (respectivamente, 97,1% e 75,7% do total do país). O nível de atendimento urbano de água na Região Centro-Oeste foi de 98,0% pelos prestadores de serviços participantes do SNIS em 2006 e de 98,8% pelos prestadores regionais. A distribuição da quantidade de municípios e respectivas populações, cujas informações, de forma agregada, constam do SNIS em 2006, segundo os estados brasileiros, em Goiás foi observado 232 municípios com um percentual de 94,3% e a população urbana de 5.031.129 alcançando um percentual de 99,1%.

Devido à ocupação esparsa da zona rural, uma opção tecnológica a ser considerada é a adoção de sistemas de abastecimento de água uni – domiciliares, ou seja, obtidos em pequenos volumes por residência. A utilização da radiação solar no processo de desinfecção de água é introduzida nesse contexto como uma alternativa de desinfecção da água, independente de insumos, que funciona sem fornecimento de energia elétrica e que apresenta grande simplicidade (BRANDÃO, 2000).

Os estudos relativos à desinfecção solar de águas, conhecida como SODIS (do inglês – SODIS é acrônimo de Solar Water Disinfection) tiveram seu início no final da década de 70, passando a ter maior reconhecimento a partir de 1985.

O uso da energia solar para desinfecção de águas vem sendo proposto para utilização, por exemplo, em áreas rurais de países em desenvolvimento, possibilitando a desinfecção de águas captadas em poços ou mananciais superficiais, cujas características físicas e químicas são adequadas ao consumo humano, mas sanitariamente duvidosas, uma vez que apenas a avaliação do aspecto dessas não permite conclusão sobre a contaminação da amostra de água coletada, relatam Paterniani e Silva (2005).

Sommer et al. (1997) destacam que, no que diz respeito à desinfecção solar, diversos estudos têm sido realizados com objetivo de determinar o efeito da luz solar sobre diferentes organismos indicadores de contaminação e organismos patogênicos transmissores de doenças pela água. A importância desses estudos resulta do fato de que, como as condições ambientais são distintas em cada país e região, as condições de uso da desinfecção solar variam de local para local.

De acordo com a Portaria nº 518, de 25 de março de 2004 (BRASIL, 2004), que estabelece o padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano, as águas destinadas ao consumo humano devem ser distribuídas à população sem o risco de veiculação de doenças, com condições sensoriais adequadas e cujos parâmetros físicos, químicos, radioativos, além do microbiológico já citado, atendam aos limites estabelecidos. Segundo

Daniel *et al.* (2001), a prática de controle microbiológico de qualidade da água de consumo humano, no Brasil, se fundamenta no controle de bactérias do grupo coliformes.

A detecção de coliformes totais e termotolerantes, qualitativamente ou quantitativamente, podem ser realizadas pelos métodos dos tubos múltiplos, contagem em membranas filtrantes e em substratos cromogênicos. O uso de organismos comuns do intestino como indicadores de poluição fecal tem sido, universalmente, aceito para monitorar e avaliar a segurança microbiológica da água para abastecimento, além de avaliar a eficiência de processos de tratamento de água (WHO, 1996). A escolha dos bioindicadores deste estudo, *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* reforçam esta afirmativa, sendo que valores médios em UFC/g relatados por Leclerc (1977) para a flora fecal humana são de 4×10^8 para *Escherichia coli*, e 4×10^6 para *Clostridium perfringens*.

O estudo com um microrganismo mais resistente à desinfecção, como o *Clostridium perfringens*, que é esporogênico, é um diferencial proposto neste estudo, já que foram identificados organismos formadores de esporos na água, após a desinfecção solar de Fleury (2006). Admite-se obter uma redução baixa de *Clostridium perfringens* indicando em torno de 30% de inativação de protozoários (MENDEZ-HERMIDA *et al.*, 2005).

No presente trabalho foi avaliada a utilização da radiação solar como agente desinfetante de águas naturais dentro das características climáticas e de insolação presentes no Brasil, tomando como referência a região Centro-Oeste, cidade de Goiânia, capital do Estado de Goiás, Brasil. A eficiência da desinfecção solar da água, que é uma opção de tratamento de baixo custo e que não necessita de recursos tecnológicos e operacionais significativos, e o uso de recipientes simples e acessíveis para acondicionamento da água a ser tratada como, por exemplo, as garrafas de polietileno tereftalato (PET), serão objetos de estudo desta pesquisa.

A utilização das garrafas de PET no processo de desinfecção solar, após o seu uso convencional como embalagens para refrigerantes ou água, contribui para a conservação do meio ambiente, uma vez que aumenta o tempo de vida útil destas garrafas que são baratas e de fácil acesso (FLEURY, 2006). De modo similar, o uso de embalagens de plástico metalizado provenientes de alimentos industrializados para a cobertura do concentrador solar a ser utilizado, também tem sua contribuição ambiental pelo reúso.

1.1 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é avaliar a eficiência da radiação solar na desinfecção de águas naturais utilizando a *Escherichia coli* e o *Clostridium perfringens* como indicadores biológicos.

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Quantificar a inativação dos microrganismos *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* pela SODIS;
- Avaliar a influência dos parâmetros temperatura, pH, cor, turbidez e oxigênio dissolvido (OD) na inativação dos microrganismos no processo de desinfecção solar;
- Determinar o tempo de exposição à radiação solar, necessário para inativação dos microrganismos patogênicos;
- Determinar o índice de R-UVA e o volume mais adequado de água nas garrafas de PET para otimização do processo de SODIS;
- Avaliar a eficiência das garrafas de PET e do concentrador solar no processo de desinfecção solar;
- Avaliar o potencial de recrescimento bacteriano nas águas expostas à radiação solar;
- Determinar o tempo máximo de conservação da água após o uso da SODIS que mantenha as características microbiológicas dentro dos limites legais de potabilidade;
- Obter dados regionais para disponibilização de um método de desinfecção de águas naturais de baixo custo e de fácil operação em comunidades pequenas e áreas rurais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Radiação Ultravioleta (R-UV)

Métodos alternativos de desinfecção começaram a ser desenvolvidos com a finalidade de substituir a cloração e, conseqüentemente, minimizar a formação de precursores de trihalometanos (THMs) e outros subprodutos que apresentam potencial cancerígeno (DANIEL *et al.*, 2001)

Ao contrário de outros desinfetantes, que têm ação química, a radiação ultravioleta (R-UV) atua por meio físico, atingindo, principalmente, os ácidos nucléicos dos microrganismos, promovendo reações fotoquímicas que inativam os vírus e as bactérias. A R-UV tem crescente aplicação como alternativa aos agentes químicos tradicionais no processo de desinfecção de águas de abastecimento e, também, de águas residuárias.

O efeito germicida deste tipo de energia foi reportado pela primeira vez por Downs e Blunt, em 1878 (KOLLER, 1952 *apud* DANIEL, 2001). Entretanto, a R-UV utilizada como alternativa para desinfecção é conhecida desde o início do século passado, mas por problemas de confiabilidade de equipamento, tecnologia, entre outros, foi abandonada. Posteriormente, superada a maioria desses problemas, o método de desinfecção por R-UV começou a ganhar popularidade, principalmente, nos países europeus e a pesquisa e o desenvolvimento desse método têm aumentado bastante. Um dos fatores importantes para sua popularização é o custo, que o torna competitivo economicamente, se comparado à cloração.

As primeiras instalações de desinfecção com R-UV ocorreram na Suíça e na Áustria, em 1955, sendo que, em 1985, ambos os países contavam com aproximadamente 500 e 600 instalações, respectivamente. Segundo a USEPA (United States Environmental Protection Agency), citada por Wright e Cairns (1998) *apud* Daniel (2001), em 1988, havia cerca de 3.000 instalações de desinfecção com R-UV para águas de abastecimento, sendo 2.000 na Europa e 1.000 nos Estados Unidos. No Brasil, particularmente na Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, as pesquisas foram iniciadas em 1977 (CAMPOS; PIZZIRANI, 1977 *apud* DANIEL, 1993) tendo por objetivo a desinfecção de esgotos.

A R-UV pertence ao espectro eletromagnético e está situada na faixa de 10 a 400 nm de comprimento de onda, entre os raios X e a luz visível (KOLLER, 1952 *apud* DANIEL, 2001). A subdivisão da faixa de R-UV entre os vários valores de comprimento de onda é:

- a) UV vácuo → 10 a 200 nm
- b) UV C → 200 a 280 nm
- c) UV B → 280 a 315 nm
- d) UV A → 315 a 400 nm

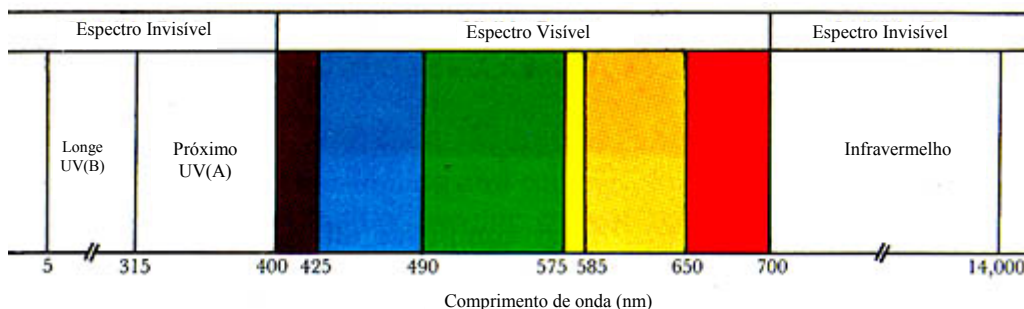


Figura 2.1 - Espectro da radiação solar mostrando as diferentes bandas da radiação e suas faixas de comprimento de onda (ACRA, 1984).

De acordo com Bolton (1999) *apud* Daniel (2001), o comprimento de onda de maior efeito bactericida é o de 254 nm, que está inserido na faixa do UV C. No entanto, Harm (1980) *apud* Daniel (2001) afirma que a absorção máxima de R-UV ocorre em 260 nm, e o comprimento de onda de 254 nm é relativo à emissão máxima de lâmpadas de baixa pressão de vapor de mercúrio. O intervalo de comprimento de onda compreendido entre 254 e 285 nm é considerado a faixa germicida ótima para a inativação de microrganismos.

A R-UV utilizada para a inativação de microrganismos, usualmente, é obtida por meio de lâmpadas especiais. A grande maioria é composta por lâmpadas de vapor de mercúrio ionizado, de baixa e média pressão (por exemplo, tubular, tipo lâmpadas fluorescentes) e com diversos valores de potência. Isso significa que o método de desinfecção por radiação ultravioleta utiliza a energia elétrica a fim de gerar radiação para a eliminação, a inativação ou a inviabilização de microrganismos.

O termo fotólise refere-se à interação da radiação luminosa com as moléculas, provocando uma ruptura das ligações químicas, fragmentando-as. A luz é composta por pequenos “pacotes” de energia, denominados fótons, cuja energia, E , é inversamente proporcional ao comprimento de onda, λ , da luz, sendo expressa na Equação 1:

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad (1)$$

Onde: h : constante de Plank ($6,026 \times 10^{-34}$ Js); c : velocidade da luz (m/s); λ : comprimento de onda (m).

Se a absorção de um fóton por uma molécula promover a fotólise (fragmentação), o fóton deve ter energia suficiente e superior para romper uma ligação específica ou várias ligações entre os átomos que compõem a molécula. Esse fenômeno, na maioria das vezes, está relacionado a comprimentos de onda na região do espectro correspondente à R-UV. Compostos que absorvem R-UV e apresentam alto rendimento quântico de fotólise são bons candidatos a fotodegradação.

Quando se irradiam moléculas de água com R-UV de comprimento de onda menor que 190 nm, ocorre o rompimento de ligações acarretando a formação de radicais hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) e hidrogênio ($\text{H}^\cdot$), poderosos agentes oxidantes e redutores, respectivamente. Portanto, processos de descontaminação, tanto em meio aquoso como em ar úmido, podem ser realizados com base nesse fenômeno (DANIEL *et al.*, 2001).

2.2 A Dose de R-UV

Alguns microrganismos patogênicos, particularmente vírus e protozoários, são mais resistentes ao desinfetante cloro do que as bactérias do grupo dos coliformes, por exemplo, *Escherichia coli* (National Research Council, 1980 *apud* DANIEL, 2001). Entretanto, Yip e Konasewich (1972) *apud* Daniel (2001) sugeriram que a dose de R-UV necessária para inativar organismos patogênicos é semelhante àquela necessária para promover o mesmo efeito nas bactérias usualmente utilizadas como indicadoras de qualidade da água. Desse modo, para a inativação de patogênicos, as doses de R-UV necessárias, usadas como parâmetro para o grupo coliforme, podem ser mais efetivas do que a cloração no processo de desinfecção (SHABAN *et al.*, 1997 *apud* DANIEL, 2001).

Um problema que pode ocorrer com a utilização de R-UV é a indesejada recuperação de parcela dos microrganismos inativados. Isso significa que, sob irradiação de luz na faixa do visível, pode ocorrer reversão das reações fotoquímicas e os microrganismos podem recuperar a atividade. Esse mecanismo permite que microrganismos irradiados recuperem-se caso tenham recebido dose subletal de radiação ultravioleta. Portanto, a dose correta de UV é uma variável importante para o dimensionamento de instalações de desinfecção.

O termo dose de radiação ultravioleta é freqüentemente utilizado na literatura para representar a exposição de um dado organismo à irradiação na faixa germicida. Esse parâmetro é similar à concentração em mg/L quando o desinfetante é uma substância química.

A dose de R-UV é o produto da intensidade de radiação pelo tempo de exposição. Vale ressaltar que a inativação de um número fixo de microrganismos pode ser alcançada em curto intervalo de tempo e alta intensidade ou em tempo longo e baixa intensidade, ou seja, a dose é mantida constante. Segundo a Equação 2:

$$D = I \times t \quad (2)$$

Onde: D é a dose de radiação ultravioleta (W.h/m²); I é a intensidade da radiação (W/m²); t é o tempo de exposição (h).

A unidade mais adequada para expressar a dose de radiação UV é mJ/cm², o mesmo que mW.s/cm², ou, ainda, pode-se usar J/m².

A fração de sobrevivência é dada pela Equação 3:

$$f(D) = \frac{N}{N_0} \quad (3)$$

Onde: N₀, N: respectivamente, concentração de microrganismos antes e depois da irradiação ultravioleta (organismos/100 mL); f(D): função da dose.

As Equações (2) e (3) sugerem que a intensidade e o tempo de exposição podem ser diferentes para uma mesma fração de sobrevivência (QUALLS e JOHNSON, 1985 *apud* DANIEL, 2001).

2.3 Mecanismos de Inativação

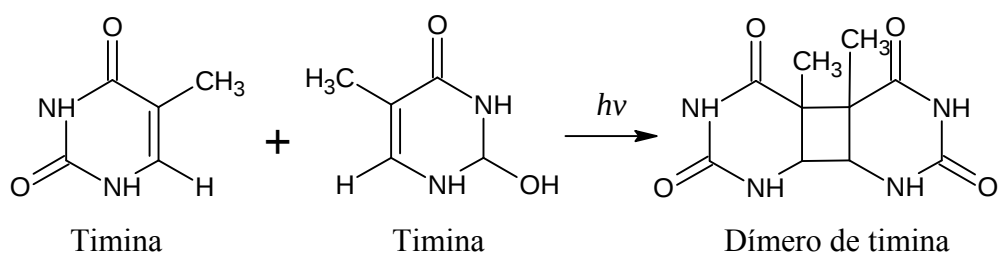
Ao contrário da maioria dos agentes desinfetantes normalmente utilizados em águas, a R-UV não inativa os microrganismos por meio de interação (reação) química. A inativação dos microrganismos é causada pela absorção dessa luz de alta energia, que promove reações fotoquímicas com os componentes fundamentais das células, prejudicando seu funcionamento normal, por exemplo, interrompendo o mecanismo de duplicação ou provocando a morte da mesma (USEPA, 1999 *apud* DANIEL, 2001).

A desinfecção por R-UV ocorre devido à absorção da radiação pelas proteínas e pelos ácidos nucleicos RNA e DNA. A absorção de altas doses de R-UV pelas proteínas

presentes nas membranas celulares leva ao rompimento dessas membranas e, conseqüentemente, à morte da célula. Porém, a absorção de pequenas doses de R-UV pelo DNA pode apenas interromper a habilidade do microrganismo de se reproduzir, impedindo-o de contaminar o meio.

A R-UV é rapidamente absorvida por algumas moléculas presentes no DNA, como as purinas e as pirimidinas, que se tornam mais reativas. A absorção máxima de R-UV pelo DNA ocorre em 260 nm, sugerindo que a inativação pela radiação é mediada pela absorção direta de purinas e pirimidinas pelas moléculas, levando à formação de dímeros e hidratos.

A absorção de R-UV por bases nitrogenadas adjacentes pode resultar na formação de dímeros, como citosina-citosina, adenina-adenina e timina-timina. A timina, por ter a estrutura mais simples das bases nitrogenadas, é a que apresenta maior formação de dímeros, os quais mudam a estrutura do DNA impedindo a reprodução do microrganismo. Esse é o mecanismo fundamental da desinfecção por R-UV, representado na Figura 2.2:



$h\nu$ = incidência da radiação ultravioleta

Figura 2.2 - Dimerização fotoquímica de duas bases timina (DANIEL, 2001).

Segundo Rodrigues (2000), o mecanismo de desinfecção por R-UV ocorre devido à inabilidade da bactéria recuperar-se dos danos provenientes da radiação. Caso a radiação não seja suficientemente intensa para causar danos letais à célula, uma fotorreativação pode ocorrer gerando mutações no organismo. A luz ultravioleta interfere no DNA das bactérias ocasionando lesões em pirimidinas adjacentes, promovendo a ligação covalente entre elas (formando, por exemplo, os dímeros de timina mostrados na Figura 2.2). Quanto maior o tempo de incidência de R-UV na bactéria, maior a quantidade de bases modificadas. Estas lesões interferem no pareamento normal de bases, impedindo, assim, a duplicação e manutenção celular. A transição citosina timina é a mutação mais freqüente, mas outras substituições de bases (transversão) e mudanças de matriz de leitura também são estimuladas pela luz UV, bem como duplicação e deleção.

2.4 Vantagens e Desvantagens da R-UV

De acordo com Daniel *et al.* (2001), são várias as razões para a escolha da R-UV como agente desinfetante em tratamento de água, dentre elas: a) a R-UV é efetiva para grande variedade de bactérias e vírus, usando doses relativamente pequenas; b) mínimos riscos à saúde (a formação de subprodutos é mínima); c) Não confere residual, o qual poderia reagir com substâncias orgânicas na produção comercial ou industrial (por exemplo, não é produzida descoloração ou mudança de sabor, quando se utiliza R-UV em indústria alimentícia); d) segurança e aceitação dos operadores e do público (nenhum produto químico tóxico é transportado, armazenado ou manuseado); e) simplicidade e baixos custos de operação e manutenção (o equipamento de R-UV é mais simples do que os equipamentos de geração de ozônio e dióxido de cloro); f) pequeno tempo de contato, conseqüentemente, não necessita de grandes tanques de contato (são alcançadas doses efetivas de desinfecção em poucos segundos, comparados ao período de 10 a 60 minutos de outras tecnologias de desinfecção, em se tratando de sistema com fonte de energia externa).

Dentre as desvantagens da desinfecção com R-UV, destacam-se: a) os mecanismos de reparo do dano provocado ao DNA dos microrganismos, se uma dose subletal for empregada; b) a matéria dissolvida ou em suspensão reduz a intensidade de radiação quando esta atravessa a lâmina líquida; c) não confere residual à água distribuída (DANIEL *et al.*, 2001).

No entanto, o fato da R-UV não deixar residual desinfetante na água, tem sido discutivelmente apontado como argumento para o uso do cloro, pois, na realidade, há um potencial para formação de biofilme nas redes de distribuição de água. Se a água contiver nutriente (particularmente carbono orgânico assimilável), eles podem se acumular em torno das canalizações, dando suporte ao crescimento microbiano, e, além disso, a presença de 1 mg/L de cloro residual livre, não garante que o biofilme não seja formado nas superfícies das canalizações e os coliformes fecais não sejam encontrados nas águas de consumo (SOUZA, 2000).

A desinfecção com R-UV é mais efetiva para águas com cor e turbidez de pequeno valor, devido à necessidade de penetração da luz no meio, portanto, a qualidade da água a ser tratada é um importante fator na utilização deste processo.

2.5 Radiação Solar

A literatura mostra que os microrganismos patogênicos, geralmente presentes na água, são vulneráveis ao calor e à R-UV (BRYAN et al., 1992 *apud* DANIEL, 2001). Uma vez que o sol é fonte natural, universalmente disponível e gratuita, tanto de calor como de R-UV, imagina-se que essa fonte seja a base de um método de desinfecção efetivo e de baixo custo para uso em regiões afastadas e menos favorecidas, principalmente em países em desenvolvimento e áreas críticas.

Segundo Anon (1988), o mecanismo de inativação dos organismos patogênicos pela luz solar é resultado de um efeito combinado da temperatura e radiação. Porém, Reed (1997) sugere que outros fatores podem estar envolvidos, como a condição de aerobiose da água. Nesse caso, considera-se que a inativação do agente patogênico dá-se pela transformação do oxigênio dissolvido (O_2) na água, em ozônio, (O_3) devido à influência da radiação.

Dentre os processos estudados para a desinfecção de águas, os chamados processos oxidativos avançados (POAs) têm recebido grande atenção por serem capazes de converter poluentes em espécies químicas inócuas. Os POAs são definidos como processos de oxidação, onde radicais hidroxilas ($OH^\cdot$) são gerados em quantidade suficiente para atuarem como principais agentes oxidantes. Vários são os fotocatalisadores utilizados (TiO_2 , ZnS , CdS , ZnO , WO_3 , $SrTiO_3$ e Fe_2O_3) com TiO_2 , atraindo grande atenção como processo alternativo para purificação de água e ar, inclusive, no que concerne à desinfecção (ASSALIN, 2000).

O cloro e derivados como hipoclorito e cloroaminas como desinfetante é o mais utilizado, atualmente, no Brasil e no mundo. Este apresenta vantagens relevantes como: alta eficiência, baixo custo e a manutenção de um residual desinfetante que assegura a boa qualidade da água até seu ponto de uso. Porém, uma desvantagem significativa do uso do cloro é a sua capacidade de reagir com a matéria orgânica presente na água, formando subprodutos tais como os THMs (trihalometanos). Em 1976, descobriu-se que o clorofórmio, um dos principais THMs, mostrou ser agente cancerígeno em ratos. Além da formação dos THMs, descobriu-se que alguns microrganismos, tais como os protozoários, têm mostrado resistência ao cloro, o que mostra a elevada importância de se buscarem novos processos de desinfecção conforme Assalin (2000).

A radiação solar aplicada para desinfecção de água, utilizando recipientes de plástico e de vidro, mostrou-se efetiva, pois, foi obtida inativação de 99,9% de coliformes em

95 minutos de exposição, ao passo que foram necessários 630 minutos para se obter a mesma eficiência com luz artificial. O componente da radiação solar mais efetivo na destruição de microrganismos parece ser a R-UV com comprimento de onda na faixa de 315 a 400 nm e, em menor grau, a luz visível (violeta e azul) com comprimento de onda de 400 a 490 nm (ACRA et al., 1984).

A completa eliminação dos organismos patogênicos requer um mínimo de duas horas de exposição à radiação solar direta de 600 W/m². É recomendado como fator de segurança, principalmente para as regiões tropicais úmidas, um período de cinco horas de exposição. A presença de nuvens ou de potenciais interferências climáticas (fumaça, *fog*) diminui a eficiência do processo de desinfecção (ZAPP et al., 1987 *apud* DANIEL, 2001). Já Herrera (2003) relata que nos dias ensolarados, o tempo de exposição à radiação solar requerido é, geralmente, superior a cinco horas para remover de maneira completa (até cinco unidades logarítmicas) os coliformes fecais presentes na água, de acordo com estudos de laboratório e campo realizados por Wegelin, desde 1991.

Segundo Mendez-Hermida (2005), a redução da infecciosidade dos oocistos de *Cryptosporidium parvum* por SODIS pode não ser permanente, pois, o processo de reparo do DNA pode começar após a exposição. Contudo, estudos recentes mostram que o reparo do DNA após a exposição dos oocistos à R-UV pode não ser suficiente para que eles recuperem seu poder de infecção.

O aumento da permeabilidade da parede do oocisto de *C. parvum* produzido pela elevada temperatura da água pode facilitar o transporte de produtos na R-UV, tais como o peróxido de hidrogênio e íons superóxido, para o interior dos oocistos, onde eles podem ter um ótimo efeito biocida (MENDEZ-HERMIDA, 2005).

As águas com elevadas contaminações não são desinfetadas facilmente pela radiação solar, nem tampouco as águas com elevada turbidez, como é o caso de alguns rios. É esperado que a turbidez atenuar o efeito da radiação solar e que elementos nutritivos da água residuária facilitem a proliferação de alguns microrganismos, relata Odeyemi (1986) *apud* Daniel (2001).

A R-UVA (315 a 400 nm) é a principal responsável pela inativação de microrganismos e a R-UV de comprimento de onda de 400 a 450 nm (luz violeta), praticamente, não tem efeito bactericida quando tem atuação independente. Entretanto, o efeito sinérgico dessas duas faixas de radiação (como é o caso na radiação solar) aumenta significativamente a taxa de inativação dos microrganismos (WEGELIN et al., 1994).

Do ponto de vista do desenvolvimento de unidades de desinfecção solar, o resultado mais relevante do trabalho de Wegelin *et al.* (1994) é a observação do efeito sinérgico da radiação solar e da temperatura. De acordo com Feachem *et al.* (1983) apud Sommer *et al.* (1997), para destruição de enterovírus pelo calor, é necessário expô-lo à temperatura de 63° C por 30 minutos. Wegelin *et al.* (1994), em seus experimentos, observaram redução de 99,9% de enterovírus após 42 minutos de exposição ao sol, com temperatura da água a 40°C. Para a mesma água, sob similar condição de radiação, mas em temperatura de 20°C, foram necessários 150 minutos para atingir o mesmo grau de inativação. Conclui-se que a temperatura como único agente desinfetante não é capaz de inativar o vírus, porém, amplifica significativamente o efeito da radiação. Parece óbvio, também, que, sob condições de temperatura mais elevada, o efeito da temperatura por si só passe a ser significativo.

A turbidez e a espessura da lâmina d'água interferem significativamente na eficiência de inativação de microrganismos. O aumento da turbidez e da profundidade da água leva a uma menor eficiência do processo, se considerado um tempo fixo de exposição. Águas mais turvas necessitarão de maior tempo de exposição para efetiva desinfecção, ou, dependendo da intensidade da turbidez, não serão passíveis de desinfecção eficaz.

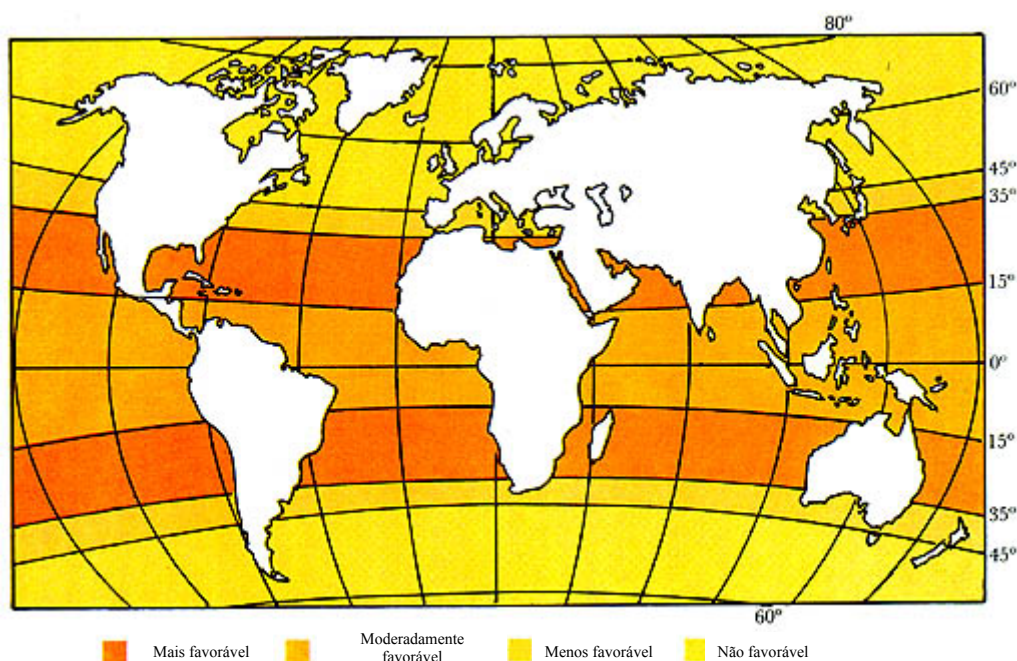
Apesar do efeito negativo da turbidez em testes realizados sob condição controlada, observa-se que, mesmo com elevada turbidez (~ 110 UTN) e elevado grau de contaminação (10^9 UFC/mL), a eliminação total de coliformes pode ser conseguida com um tempo de exposição de duas horas e temperatura da água a 50°C. Testes preliminares realizados em Brasília (BRANDÃO, 2000) mostraram que, em dia ensolarado, a temperatura da água atingiu 50°C após duas horas de exposição e permaneceu acima dessa temperatura por mais de três horas. Isso sugere o potencial de utilização dessa tecnologia em grande parte do Brasil.

Segundo Herrera (2003), os papéis metalizados e os plásticos metalizados e aluminizados, empregados como embalagens de presentes e alimentos como batatas fritas e similares, são os materiais mais refletivos dentro da faixa de comprimento de onda 300-540nm, portanto, mais eficientes que o papel alumínio utilizado por Fleury (2006), conforme observado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Refletâncias médias em percentual de diferentes materiais (HERRERA, 2003).

MATERIAL	200 – 700 nm	300 – 540 nm
Plástico metalizado (embalagem de presentes)	68,8 – 79,3	66,0 – 75,2
Plástico aluminizado	25,8 – 69,9	25,3 – 68,7
Fita 100% alumínio autoaderente	68,4	57,66
Papel metalizado (embalagem de presentes)	60,1	59,4
Papel alumínio (para uso em cozinha)	41,6 – 56,4	38,8 – 56,3
Placa e lâmina de alumínio	16,6 – 19,1	14,8 – 16,3
Lâmina galvanizada	28,98	31,6

É importante notar que a maioria dos países em desenvolvimento está dentro das regiões mais favoráveis para o uso da SODIS entre as latitudes 35°N e 35°S (Figura 2.3). Por esta razão, eles podem contar com a radiação solar como uma fonte de energia vantajosa que pode ser prontamente explorada de forma barata pelas famílias rurais e urbanas para uma variedade de propósitos, incluindo a desinfecção solar de água potável e soluções de reidratação oral (ACRA, 1984). Portanto, a região do presente estudo se enquadra na faixa mais favorável de aplicação da radiação solar, justificando a sua utilização na desinfecção de águas naturais.

**Figura 2.3** - Distribuição mundial da radiação solar em faixas que indicam as possibilidades de aplicações solares (ACRA, 1984)

A desinfecção solar pode ser concebida tanto em instalações em batelada, para servir a uma unidade domiciliar (pequenos volumes), como em sistema contínuo (algo semelhante a um aquecedor solar, porém transparente), a fim de produzir maior volume de água e servir a escolas, postos de saúde e outras instituições na zona rural. Um sistema contínuo de desinfecção solar também poderá fornecer água bacteriologicamente segura para pequenas empresas agrícolas familiares e, com isso, ser usada na melhoria e/ou beneficiamento do produto agrícola, agregando renda ao pequeno produtor. A região Centro-Oeste, como centro agrícola nacional brasileiro, encontra-se perfeitamente situado neste contexto.

2.6 Recipientes – Garrafas de PET

As embalagens foram criadas para proteger e transportar produtos. A barreira é a capacidade que uma embalagem tem de resistir à absorção ou evaporação de gases e vapores, resistir à passagem de luz e também à permeação de gorduras. A barreira a gases é avaliada em termos de taxa de permeabilidade a gases, ou seja, pela quantidade de gás que passa através de uma unidade de área superficial do material de embalagem por unidade de tempo, a determinada temperatura e sob certo gradiente de pressão parcial do gás e a determinada umidade relativa. Quanto maior for a temperatura, maior a difusão de gases. No caso da umidade, o vapor de água compete com o gás seja CO₂ ou O₂ (GARCIA, 1989; DIOGO, 2002; SARANTÓPOULUS, 2002 apud PACHECO, 2006).

O mercado de refrigerantes é, dentre as bebidas não alcoólicas, o mais desenvolvido. O Brasil é o 3º maior mercado do mundo, atrás de Estados Unidos e México, embora com consumo per capita ainda baixo, cerca de 70 litros/ano (ABIR, 2007).

As embalagens mais utilizadas para refrigerantes são: metálicas (latas de alumínio), PET e de vidro. De acordo com a ABIR (2007), no período de janeiro de 2005 a dezembro de 2006, as embalagens de PET 2 L foram as mais vendidas, com os resultados variando entre 70% em janeiro de 2005 a 66,3% em dezembro de 2006 e, se forem consideradas todas as embalagens de PET, tem-se de 81,8% em janeiro de 2005 a 79,6% em junho/julho de 2006 na participação do mercado de refrigerantes. As embalagens de vidro e de lata tiveram suas maiores vendas em junho/julho de 2006, com 12,7% e junho/julho de 2005, com 8,1%, respectivamente, como mostrado na Figura 2.4.

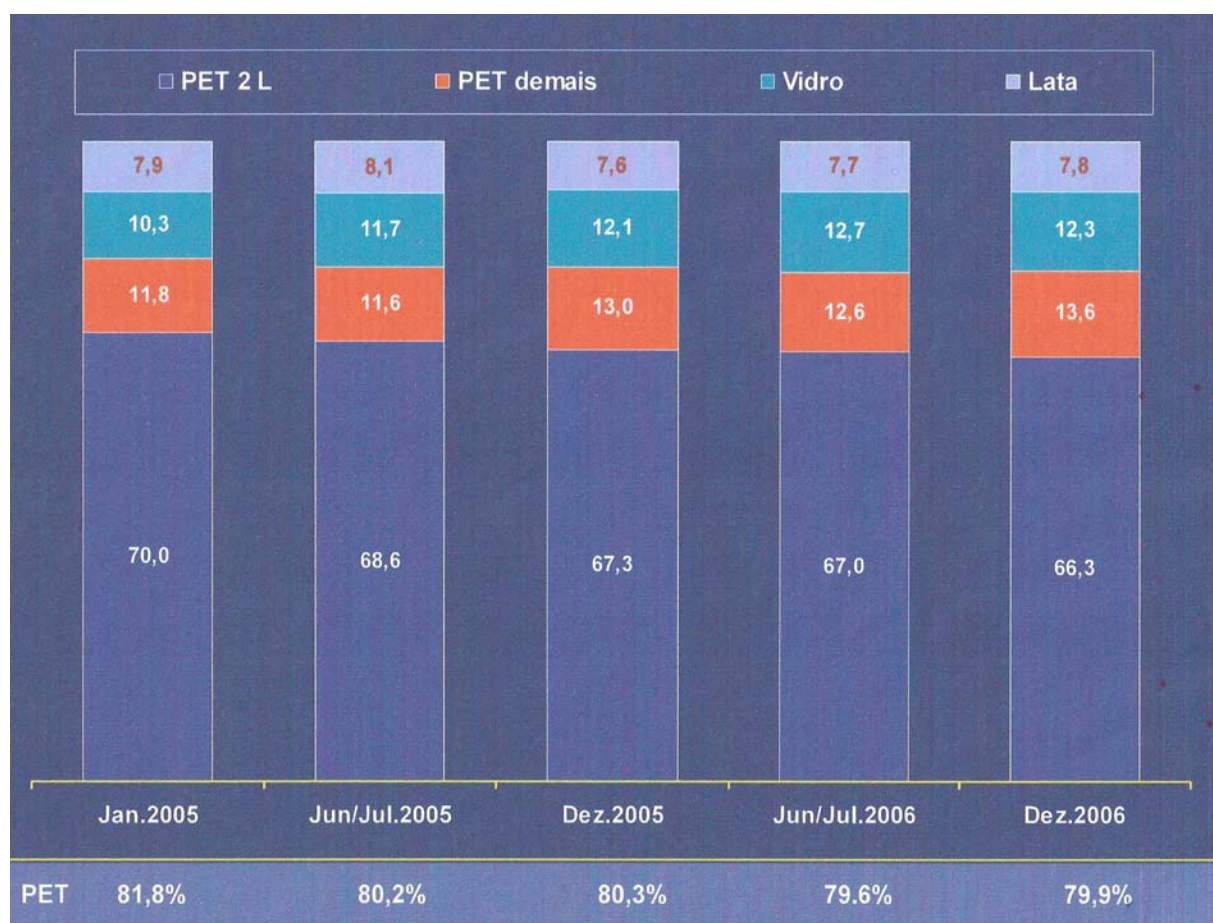


Figura 2.4 – Participação de diferentes materiais em embalagens de refrigerantes no período de janeiro de 2005 a dezembro de 2006 (ABIR, 2007).

As estimativas de consumo de refrigerantes para a região centro-oeste em 2011 são de 1442 litros/milhão, ao passo que a água mineral terá 998 litros/milhão e sucos e néctares 113 litros/milhão, indicando que seu somatório ainda não alcança o valor da estimativa para os refrigerantes, conforme Figura 2.5. Em Goiás, as estimativas de consumo de refrigerantes, sucos e água mineral para 2011 são as maiores da região centro-oeste, alcançando 861 litros/milhão e os valores dos demais estados podem ser observados na Figura 2.6. Assim, torna-se válida a re-utilização das garrafas de PET segundo a metodologia deste trabalho para evitar-se o acúmulo de resíduos sólidos gerados na nossa região, tanto hoje quanto futuramente.

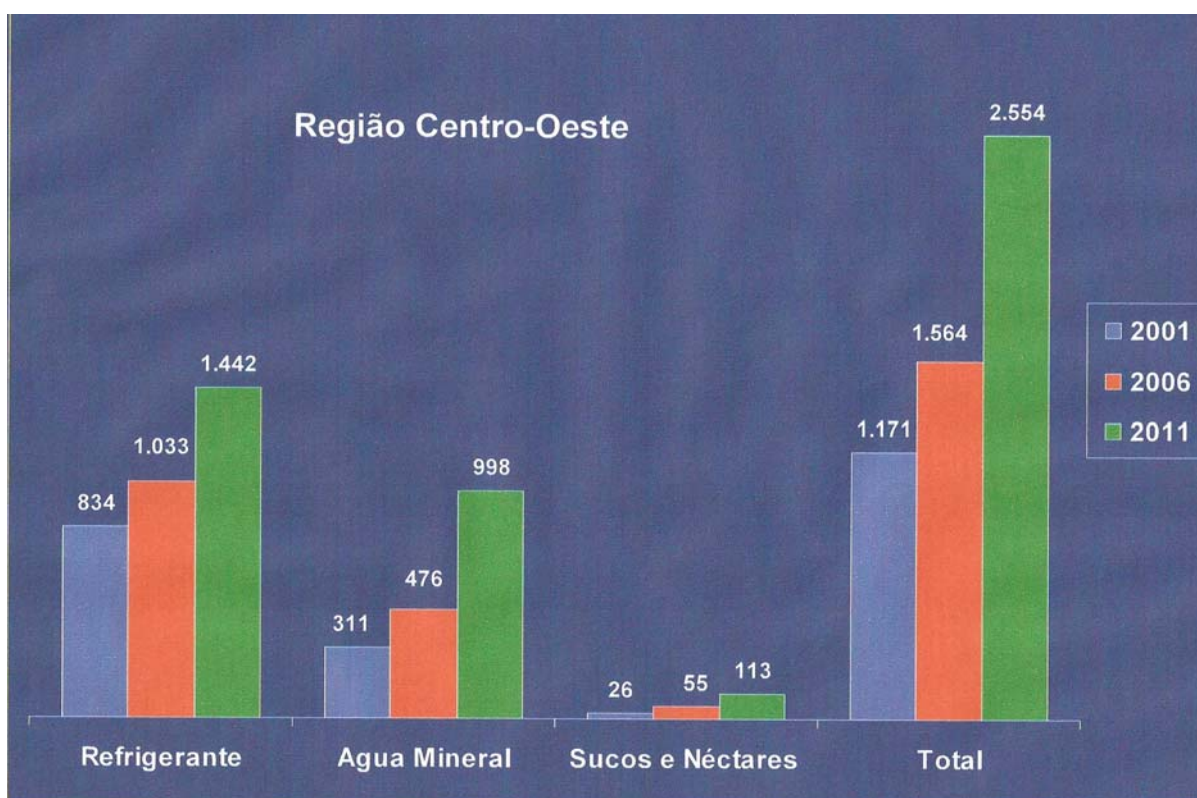


Figura 2.5 – Estimativas de consumo de bebidas não-alcoólicas para a região centro-oeste em litros/milhão (ABIR, 2007).

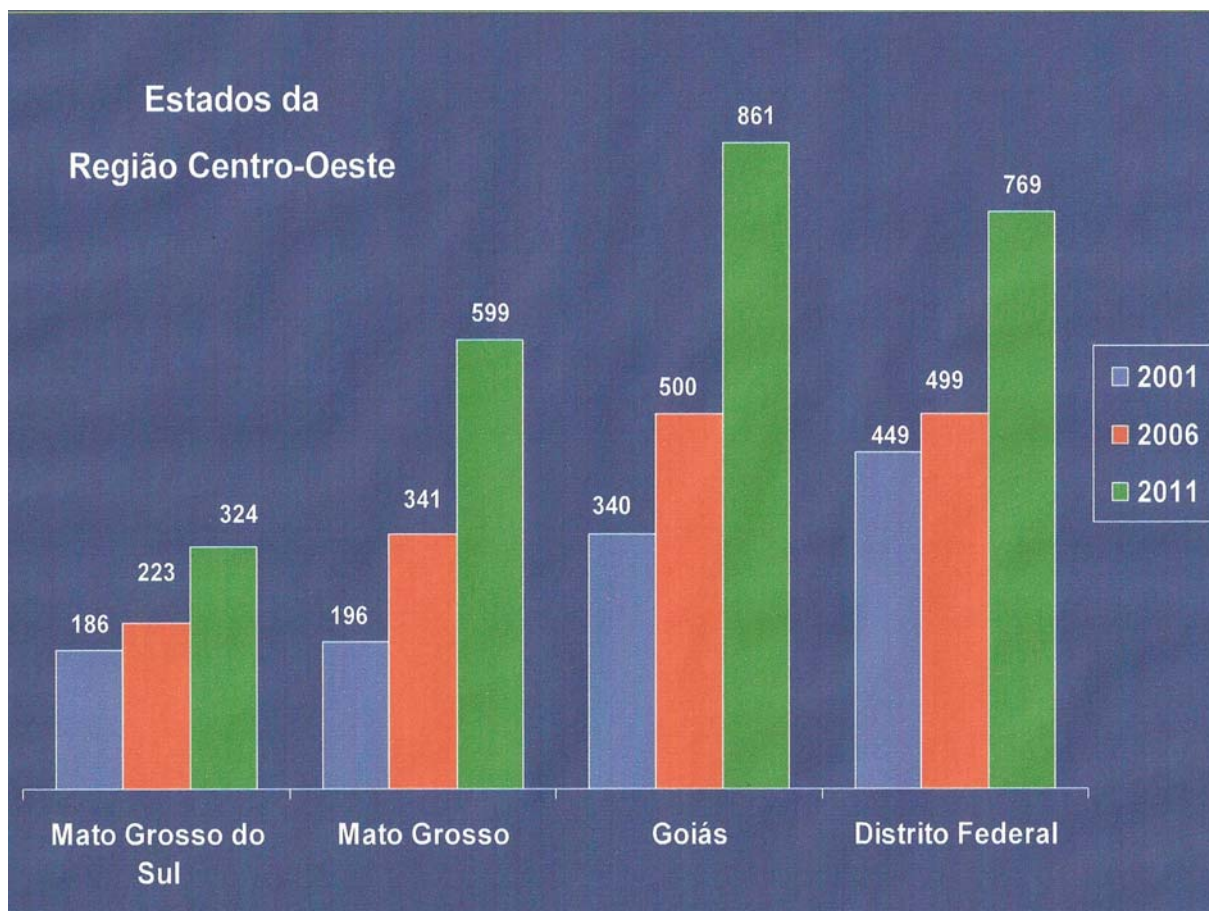


Figura 2.6 – Estimativas de consumo de bebidas não- alcoólicas para os estados da região centro-oeste em litros/milhão (ABIR, 2007)

O PET é um material de grande importância no segmento de embalagem. Isso se deve às suas excelentes propriedades, a exemplo da elevada resistência mecânica, aparência nobre, entre outras. A escolha e o desenvolvimento do PET para uso em bebidas carbonatadas (refrigerantes) resultaram em estudos paralelos entre indústrias de bebidas e fabricantes de plásticos, levando-se em consideração os custos de energia proveniente do petróleo. Ao lado da utilização em refrigerantes, as embalagens de PET vêm apresentando acentuada expansão em outros segmentos como o alimentício, farmacêutico, higiênico e limpeza (GARCIA, 1989 *apud* SARANTÓPOULUS, 2002 *apud* PACHECO, 2006).

O aparecimento das embalagens de PET no Brasil ocorreu, praticamente, no início de 1989, com apenas duas empresas fornecedoras, ambas com garrafas de 2000 mL, com fundo côncavo em base de polietileno de alta densidade (PEAD). Neste mesmo ano, estudos

realizados visavam à introdução da garrafa de 2000 mL, com fundo petalóide (forma do fundo da embalagem usada atualmente), que ocorreu no início de 1990 (GARCIA, 1989 *apud* PACHECO, 2006).

O formato e o tamanho do recipiente utilizado para expor as amostras ao sol mostraram-se pouco influente na taxa de inativação dos microrganismos indicadores. No Egito, mostrou-se uma tendência de rápida redução na taxa de morte ou inativação bacteriana em amostras contidas em recipientes de 500 mL e 100 mL. Ambos os recipientes possuíam tamanhos pequenos, tipicamente utilizados para coleta de água e armazenamento, como garrafas, comumente utilizadas em países em desenvolvimento. A posição vertical ou horizontal de exposição ao sol também produziu pouco efeito na eficiência do processo (ARAFA, 1985 *apud* DANIEL, 2001).

Por ser uma tecnologia destinada às regiões em desenvolvimento, os materiais empregados na SODIS devem ter baixo custo. Assim, as alternativas testadas foram as garrafas de vidro, PVC (policloreto de vinila), PET e sacolas de PET. As garrafas de vidro comuns contêm óxido de ferro e espessura média de 2mm sendo praticamente opacas à R-UV. Dessa forma seriam necessários vidros especiais (Pyrex®, Corex®, etc) que tem custo elevado e inviabilizam o objetivo da tecnologia. Quanto aos plásticos, o PET possui menos aditivos que o PVC, tendo preferência pelo menor potencial de contaminação da água. As garrafas devem ser incolores, pois as cores marrom e verde absorvem a radiação solar UV-A. (WEGELIN *et al.*, 2000).

A transmitância da R-UV e visível nas garrafas de PET transparente, verde e no vidro transparente foram testadas por Fleury (2006). O PET transparente começou a transmitir luz no comprimento de onda de 320 nm (6,5%), aumentando significativamente a transmitância até o comprimento de onda aproximado de 380 nm (80,4%) e, após este valor, houve uma tendência à estabilização. Comportamento similar ocorreu para o vidro, que começou a transmitir luz no comprimento de 290 nm (0,8%) e apresentou tendência à estabilização no comprimento de onda de 350 nm (95,1%). A curva do PET verde, que também transmitiu a luz a partir do comprimento de onda de 320 nm (2%), apresentou maior desuniformidade na sua formação.

A partir de 340 nm, o PET transparente permitiu uma transmitância acima de 60 %, conforme citado na literatura por Wegelin *et al.* (2000), o PET verde 40,4 % e o vidro 89,9 %. Já o comprimento de onda de 400 nm, a transmitância foi de 84 % para o PET transparente, 97,6 % para o vidro e 81,1 % para o PET verde, demonstrando assim, que os maiores valores de transmitância ocorreram para o vidro, depois para o PET transparente e em

seguida para o PET verde. Estes resultados confirmam o registro de Acra *et al.* (1984) que apontam os recipientes incolores, de plástico ou de vidro, como as melhores escolhas para a desinfecção solar porque eles transmitem a luz próximo da região ultravioleta de 320 – 400 nm. Sendo a luz UV-A a principal responsável pela desinfecção solar, na região de 320 – 400 nm, e secundariamente a luz violeta, na região de 400 – 425 nm (Wegelin *et al.*, 1994) pode-se admitir, a partir dos resultados encontrados, que os materiais de plástico e vidro permitem a transmitância nestes comprimentos de onda (320 – 425 nm), afirma Fleury (2006).

A eficiência da desinfecção será maior em recipientes que possuírem transmitância próxima à região ultravioleta do espectro de luz. O grau de maior letalidade observado está relacionado aos comprimentos de onda próximos à R-UV. Os recipientes metálicos com superfície aberta e reflexão interior podem ser utilizados com eficiência no processo de desinfecção solar. No entanto, o tempo de exposição deve ser maior que uma ou duas horas (BALDI, 1987 *apud* DANIEL, 2001).

Em relação aos recipientes, os sacos de polietileno transparentes mostraram-se mais eficientes do que os vasilhames de refrigerante em vidro e PET. Tal eficiência é atribuída à baixa perda de radiação do material e ao aumento mais rápido da temperatura nos mesmos (BRANDÃO, 2000). O uso dos sacos descartáveis não parece ser interessante na realidade brasileira devido ao poder aquisitivo e ao grau de instrução dos cidadãos-alvo dessa tecnologia, pois, a reutilização dos recipientes ou a utilização do mesmo saco para vários fins poderia levar a contaminações cruzadas e à ineficiência do método de desinfecção. A utilização de sacos plásticos novos, a serem descartados após uso, pode significar custo excessivamente elevado para os usuários rurais, além de não fazer parte de sua cultura. Devem-se desenvolver recipientes específicos, com dimensões apropriadas para otimizar a captura da radiação, menor suscetibilidade à contaminação externa e maior durabilidade. A perda de radiação pelo material empregado, se ocorrer, poderá ser compensada com maior tempo de exposição.

2.7 Processos e mecanismos de desinfecção e esterilização

Desinfecção é o processo de destruição de microrganismos, patogênicos ou não, na forma vegetativa (não-esporulada), através de meios físicos e químicos. O mecanismo de destruição dos organismos na desinfecção depende principalmente da natureza do desinfetante e do tipo de organismo. Ainda que os mecanismos de desinfecção não estejam completamente esclarecidos, existe evidência de que a maior parte dos desinfetantes atue destruindo a

proteína celular, principalmente por inativação dos sistemas enzimáticos críticos, responsáveis pelas enzimas essenciais para a vida microbiológica. A destruição ou inativação da proteína enzimática pode ocorrer de várias maneiras, segundo o tipo de desinfetante (LAWRENCE E BLOCK, 1968, *apud* MONTEIRO 1999). Há ainda a diferenciação entre desinfecção e sanitização, sendo a primeira relativa a seres animados (exemplo mãos) e a segunda a seres inanimados como superfícies e, no caso da embalagem de PET, será usado o termo sanitização aplicado ao bioindicador *Escherichia coli*.

A presença e geração de enzimas dentro da célula bacteriana sugerem que o mecanismo de desinfecção implique, ao menos, em duas etapas: penetração do desinfetante através da parede celular e, reação com as enzimas dentro da célula. Esta constatação está de acordo com a observação genérica de que as moléculas neutras são bactericidas mais efetivas que os íons, aparentemente devido ao seu poder de penetrar com mais rapidez nas paredes celulares carregadas negativamente. Enquanto que a passagem de ânions através das paredes celulares pode ser prejudicada pela repulsão eletrostática, as moléculas neutras podem difundir-se mais livremente (FAIR *et al.*, 1968).

Os agentes químicos tais como ozônio, dióxido de cloro e cloro, capazes de oxidar os compostos orgânicos, podem atuar como desinfetantes por oxidação química direta da matéria celular. A aplicação direta de energia calorífica, irradiação por ondas curtas, ou destruição ultra-sônica produz a destruição física dos microrganismos. Isso mostra que um número considerável de compostos químicos (orgânicos e inorgânicos) e agentes físicos causam danos nos microrganismos patogênico, principalmente por interação com as proteínas enzimáticas ou por alterações estruturais destrutivas dentro da célula (WEBER, 1979).

A esterilização é a eliminação ou destruição completa de todas as formas de vida microbiana, por meio de processos físicos ou químicos (MARTINS, 2001). O termo esterilização foi aplicado ao bioindicador esporulado *Clostridium perfringens* no caso da remoção do mesmo nas embalagens de PET e galões que o acondicionaram.

Bactérias anaeróbias estritas, como o *Clostridium perfringens*, só crescem em anaerobiose, sendo inibidas ou mortas na presença de oxigênio, que não é utilizado em seu metabolismo. Aquelas que são mortas pela presença de O₂, não possuem enzimas tais como catalase, que desdobra peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, ou superóxido dismutase, que transforma o ânion superóxido (O₂⁻) em água oxigenada. A água oxigenada ou peróxido de hidrogênio e o ânion superóxido causam danos letais à bactéria, afirma TRABULSI (1991).

Germicidas de alto nível são aqueles que têm atividade nos esporos bacterianos e podem ser esterilizantes se o contato for longo e desinfetante, se o tempo de contato for pequeno. Como exemplos têm os seguintes germicidas químicos: glutaraldeído, ácido peracético, peróxido de hidrogênio entre outros.

A ação bactericida dos ácidos minerais e álcalis origina-se dos efeitos dos íons H_3O^+ e OH^- . Quando os ácidos minerais e álcalis encontram-se concentrados, acredita-se que o íon H_3O^+ seja mais forte que o íon OH^- . Os agentes oxidantes fortes, tais como o ozônio, permanganato de potássio, peróxido de hidrogênio, podem atuar pela inativação enzimática, ou por oxidação degradativa do material celular. A ação desinfetante do cloro e outros halógenos está baseada na rápida inativação enzimática (MONTEIRO 1999).

O peróxido de hidrogênio está sendo introduzido no mercado brasileiro por diversas vantagens: a) custo relativamente baixo; b) preparo e uso simples; c) fácil armazenamento; d) fácil transporte; e) sem toxicidade; f) sem residual químico, pois, se desdobra em oxigênio e água. Recomendado na concentração de 3% a 25% e indicado para materiais termossensíveis entre outros, age mediante exposição de 15 a 30 minutos, como desinfetante (MARTINS, 2001).

2.8 Microrganismos importantes na SODIS

A *Escherichia coli* é uma espécie de bactéria do grupo coliforme termotolerante e é abundante nas fezes humanas e de animais, compreendendo 95% dos coliformes presentes no intestino, tendo sido encontrada somente em esgotos, efluentes, águas naturais e solos que tenham recebido contaminação fecal recente. Ressalta-se que dentre os coliformes, esta é a única espécie que, seguramente, provém de fezes humanas ou de animais de sangue quente (WHO, 1996), sendo, portanto, considerada como a clássica indicadora da possível presença de patógenos entéricos nas águas. Tornou-se possível nos últimos anos, através de testes cromofluorogênicos baseados em expressões enzimáticas, a detecção simples e rápida de *Escherichia coli* e de outras bactérias específicas para fins de monitoramento de mananciais. Segundo Acra *et al.* (1984) a *Escherichia coli* é mais resistente aos efeitos letais da luz solar que outras bactérias como a *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhie*, *Salmonella enteritidis*, e por isso serve bem como bom indicador sobre o efeito da luz solar sobre bactérias entéricas.

Segundo Daniel *et al.* (2001), a *Escherichia coli* usualmente é empregada como microrganismo indicador de contaminação fecal. Todavia, a resistência de alguns patogênicos aos desinfetantes, notadamente os protozoários, é maior que a da bactéria *Escherichia coli*. Por este motivo, é conveniente que sejam feitos exames para detectar outros microrganismos indicadores que possam representar o comportamento de vírus, bactérias esporuladas e cistos de protozoários diante dos desinfetantes.

O *Clostridium perfringens* tem sido utilizado como indicador bacteriológico de contaminação fecal, pois, sua incidência no meio aquático está constantemente associada a dejetos humanos, sendo sua presença detectada em fezes, esgotos e águas poluídas. Por serem esporuladas, essas bactérias apresentam grande resistência aos desinfetantes e às condições desfavoráveis do meio ambiente e a excepcional longevidade de seus esporos na água é útil na detecção de contaminação fecal remota, em situações em que outros indicadores menos resistentes como *Escherichia coli*, já não estão mais presentes (CETESB, 1993).

A pesquisa de *Clostridium perfringens* é recomendada pela CETESB (1993) como um complemento valioso para outros testes bacteriológicos de avaliação da qualidade da água. Em esgotos e águas poluídas, a densidade de *Clostridium perfringens* geralmente excede a de vírus e de bactérias patogênicas. Portanto, sua ausência em águas de consumo humano é uma indicação segura da ausência desses microrganismos.

O *Clostridium perfringens* são bacilos curtos, Gram-positivos, anaeróbios obrigatórios, imóveis, esporogênicos (esporos ovais, com localização central ou subterminal). Não possuem catalase, fermentam a lactose, manose e sacarose com produção de gás e apresentam fraca fermentação da celobiose, manitol e salicilina e fermentação turbulenta do leite. Produzem lecitinase, gelatinase e fosfatase ácida; reduzem o sulfito a sulfeto de hidrogênio (H₂S) e o nitrato, a nitrito. A temperatura ótima para o seu desenvolvimento é de 45°C, podendo crescer entre 20 a 50°C (CETESB, 1993).

Os colifagos são bacteriófagos que infectam e replicam em cepas hospedeiras de *Escherichia coli* e são usados como indicadores de vírus. Já as bactérias *Clostridium perfringens*, por terem a capacidade de formar esporos, portanto, com maior resistência às adversidades do meio, podem ser usadas como indicadores de protozoários. Os colifagos, em geral, apresentam resistência semelhante à da *Escherichia coli*, enquanto o *Clostridium perfringens* é mais resistente, demonstrando ser um indicador em potencial para águas que apresentem suspeita de conter protozoários patogênicos, dados os usos do manancial e do solo que compõem a bacia hidrográfica drenada pelo manancial (DANIEL, 2001).

Alguns estudos têm sido desenvolvidos para utilizar a bactéria *Clostridium perfringens* como indicadora de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* na qualidade e eficiência de tratamentos de água potável, pois seus esporos apresentam taxa de sobrevivência mais elevada e resistência aos processos de tratamento e desinfecção da água maior do que os cistos e oocistos, além de serem mais fáceis, rápidos e baratos de pesquisar em laboratório que os protozoários (TEIXEIRA, 2003).

Embora não exista na legislação vigente a exigência de pesquisa para *Clostridium perfringens*, consta no capítulo IV artigo 11 a recomendação da inclusão de pesquisa de organismos patogênicos, com o objetivo de atingir, como meta, um padrão de ausência, dentre outros, de enterovírus, cistos de *Giardia spp* e oocistos de *Cryptosporidium sp* (BRASIL, 2004).

Netto (1987) relata que, dos organismos anaeróbios esporulados, o mais característico é o *Clostridium perfringens*, também aparecendo regularmente nas fezes, porém em menor número que a *Escherichia. coli*. Os esporos podem sobreviver mais tempo na água do que os organismos coliformes e costumam resistir à cloração normal das ETAs (estação de tratamento de afluentes). A presença desses esporos numa água natural indica contaminação fecal, e a ausência de coliformes indica que se trata de poluição antiga.

De acordo com Evangelista (2001), inúmeros microrganismos são formadores de células de resistência capazes de tolerar condições incompatíveis para a vida de células vegetativas; elas, porém, estão longe de igualar a resistência dos esporos bacterianos aos fatores adversos ao seu crescimento e desenvolvimento.

Em determinadas espécies e constituindo características exclusivas de bactérias em forma de bastonete (por ex. *Bacillus* aeróbios e *Clostridium* anaeróbios), se desenvolve o que é chamado endósporo ou esporo. O esporo é dotado de enorme resistência, podendo sobreviver em condições que não lhe são favoráveis durante longos anos (EVANGELISTA, 2001).

Somente um esporo se forma em cada célula, localizando-se em direção polar ou central; após a produção do esporo, a célula vegetativa pode ser desintegrada. No esporo, ocorre um mecanismo específico de sobrevivência celular, caracterizado por um estado de criptobiose (dormência ou vida latente) com suspensão de sua atividade metabólica. Este estágio de repouso se rompe quando o meio se volta adequado à sua germinação e coincide com aquele favorável ao crescimento das células vegetativas. É ponto pacífico que a formação dos esporos ocorre como um ato de legítima defesa do microrganismo para sua sobrevivência quando as condições de seu substrato se tornam adversas, discorre Evangelista (2001).

Os esporos que atingem os alimentos, comumente são provenientes do solo, principalmente, aqueles originados de resíduos orgânicos, como acontece nos terrenos turfosos, nas partes barrentas de rios e lagos, em planícies aluvionais etc (EVANGELISTA, 2001).

2.9 Padrão de Potabilidade de Água

O controle da qualidade da água de consumo humano se tornou uma ação de saúde pública a partir da década de 1970, quando a Portaria nº 56/Bsb, de 14 de março de 1977 do Ministério da Saúde instituiu a norma de potabilidade em todo o território nacional. Entretanto, a implementação de um programa de vigilância da qualidade da água só ocorreu a partir da criação do Sistema Nacional de Vigilância Ambiental em Saúde em 1999, e da publicação da Portaria nº 1.469 de 29 de dezembro em 2000 que já foi revogada pela Portaria nº. 518 de 25 de março de 2004 que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. A Portaria nº 36 de 19 de janeiro de 1990 é denominada como ato relacionado que está em vigor e aprova normas e o padrão de potabilidade de água destinada ao consumo humano a serem observadas em todo o território nacional. Anteriormente, a qualidade era associada apenas a aspectos estéticos e sensoriais, tais como a cor, o gosto e o odor.

De acordo com a Portaria nº. 518 de 2004, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a água potável é “água para consumo humano cujos parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e radioativos atendam ao padrão de potabilidade e que não ofereça riscos à saúde”. Ainda segundo essa mesma Portaria, a água potável deve passar por um controle de qualidade, a fim de verificar se a água fornecida à população está apta ao consumo humano. Esse controle de qualidade consiste em um “conjunto de atividades exercidas de forma contínua pelos responsáveis pela operação de sistema ou solução alternativa de abastecimento de água, destinadas a verificar se a água fornecida à população é potável, assegurando a manutenção desta condição”.

O Artigo 11 dessa Portaria define que a água potável deve estar em conformidade com o padrão microbiológico conforme Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano. (BRASIL, 2004).

PARÂMETRO	VMP (1)
<u>Água para consumo humano (2)</u>	
<i>Escherichia coli</i> ou coliformes termotolerantes (3)	Ausência em 100 mL
<u>Água na saída do tratamento</u>	
Coliformes totais	Ausência em 100 mL
<u>Água tratada no sistema de distribuição (reservatórios e rede)</u>	
<i>Escherichia coli</i> ou coliformes termotolerantes (3)	Ausência em 100 mL
Coliformes totais	Sistemas que analisam 40 ou mais amostras por mês:
	Ausência em 100 mL em 95% das amostras examinadas no mês;
	Sistemas que analisam menos de 40 amostras por mês:
	Apenas uma amostra poderá apresentar mensalmente resultado positivo em 100 ml

(1) Valor máximo permitido.

(2) Água para consumo humano em toda e qualquer situação, incluindo fontes individuais como poços, minas, nascentes, dentre outras.

(3) A detecção de *Escherichia coli* deve ser preferencialmente adotada.

No controle da qualidade da água, quando forem detectadas amostras com resultado positivo para coliformes totais, mesmo em ensaios presuntivos, novas amostras devem ser coletadas em dias imediatamente sucessivos até que as novas amostras revelem resultado satisfatório.

No Artigo 12 da Portaria nº. 518 de 2004 da ANVISA, em complementação às exigências relativas aos indicadores microbiológicos, deve ser observado um padrão de turbidez para água pós-filtração ou pré-desinfecção de 1,0 UT em 95% das amostras para

desinfecção (água subterrânea), 1,0 UT para filtração rápida (tratamento completo ou filtração direta) e 2,0 UT em 95% das amostras para filtração lenta.

Os parâmetros de aceitação da água para consumo humano estão citados na Tabela 2.3 e devem ser seguidos, segundo a Portaria nº. 518 de 2004.

Tabela 2.3 - Parâmetros de aceitação da água para consumo humano (BRASIL, 2004).

PARÂMETRO	VMP (1)
Amônia	1,5 mg/L
Cloreto	250 mg/L
Cloro Livre	5,0 mg/L
Cor aparente	15 uH
Dureza	500 mg/L
Ferro	0,3 mg/L
Fluoreto	1,5 mg/L
Gosto	Não objetável
Nitrato (como N)	10 mg/L
Nitrito (como N)	1 mg/L
Odor	Não objetável
pH	6,0 a 9,5
Sólidos dissolvidos totais	1.000 mg/L
Sulfato	250 mg/L
Turbidez	5 UT

(1) Valor máximo permitido.

3 METODOLOGIA / ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS

Os experimentos incluíram a análise e exames das seguintes variáveis: volume de água nas garrafas de PET, recrescimento dos bioindicadores e uso do concentrador solar no processo da desinfecção solar de águas naturais e o seu impacto na inativação dos indicadores *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*.

3.1 Variações dos Experimentos

Os experimentos foram realizados no período de setembro/outubro de 2007 e abril/maio de 2008, em Goiânia, na Escola de Engenharia Civil (EEC) da Universidade Federal de Goiás (UFG), cuja localização é 16°40'43" S (Sul), 49°15'14" W (Oeste) e 802 m de altitude. Foram colocados recipientes com as amostras de água para exposição à radiação solar, em uma mesa suporte de telha de amianto (6 mm), inclinação de 10%, de 70 cm de altura média, 110 cm de largura e 153 cm de comprimento, detalhada em Fleury (2006).

Anteriormente aos dias dos experimentos, foram feitas consultas ao site do INMET (Instituto Nacional de Meteorologia) para verificar a previsão climática, presença ou não de sol, nuvens e precipitações para direcionar o estudo aos dias de sol, sem nuvens e precipitações, ou seja, com condição de céu claro. As amostras de água foram acondicionadas em garrafas de PET transparentes e com superfície totalmente lisa, de 2 L (Figura 3.1). Com o intuito de padronizar a metodologia, foi mantida a mesma marca de garrafa de PET usada por Fleury (2006), exceto que foram utilizadas garrafas novas, ou seja, que tiveram seu uso regular de armazenamento de bebida uma única vez e, logo depois foram sanitizadas e esterilizadas de acordo com os processos específicos para cada bioindicador.

As garrafas foram individualmente aferidas com auxílio de provetas para os volumes de 1,5 L e 2 L e marcadas com canetinhas de retroprojeto externamente para serem devidamente identificadas com os diferentes volumes e horários de coletas (Figura 3.2). A utilização de volumes diferentes de amostra de água teve como objetivo verificar a possível interferência de processos oxidativos avançados na desinfecção solar, que foram avaliados com a maior presença de oxigênio na garrafa contendo menor volume de água.

Foram utilizados também dois concentradores solares (suportes de madeira) revestidos internamente por plásticos metalizados. A embalagem reutilizada para revestir os concentradores solares foi, principalmente, do salgadinho de milho sabor galinha, da marca Mico's®, fabricação da Cicopal Indústria e Comércio de Produtos Alimentícios e Higiene

Pessoal LTDA, situada no município de Senador Canedo, próximo a Goiânia. Segundo informação da Cicopal, este plástico metalizado é grau BOPP e possui elevada resistência, foi colado aos concentradores utilizando a cola Amazonas® nº02, testada previamente para evitar reação com o plástico metalizado que descorava com outras colas, quando colado na madeira do concentrador solar (Figuras 3.3 e 3.4).

O uso do concentrador solar aumenta a temperatura da água das amostras sem impedir a incidência da radiação solar. O concentrador solar utilizado foi construído mantendo as características geométricas semelhantes ao do modelo proposto pelo Instituto Mexicano de Tecnologia da Água (IMTA), que tem capacidade para 3 garrafas de PET. Porém, o concentrador solar proposto neste estudo foi adaptado para ter uma capacidade de 4 garrafas de PET, para garantir as mesmas condições de estudo e, para isso, tiveram que ser aumentadas as medidas da base e das aletas. Assim, foram usados os mesmos concentradores solares que Fleury (2006), exceto o revestimento externo alterado para o plástico metalizado.



Figura 3.1 - Condição experimental na etapa 1



Figura 3.2 - Garrafas com 1,5L e 2L de água



Figura 3.3 - Concentrador solar com capacidade para 4 garrafas de PET



Figura 3.4 – Condição experimental na etapa 2

Os períodos definidos para a exposição das amostras de água à radiação solar foram previamente escolhidos em função da ausência de precipitação e menor ocorrência de nuvens. A etapa 2 teve seu início bastante adiado em função do período prolongado de chuvas

na região Centro-Oeste, neste ano de 2008. Portanto, as amostras da água foram submetidas às condições de estudo estabelecidas nas Tabelas 3.1 e 3.2:

Tabela 3.1 Condições de estudo da etapa 1: Setembro/Outubro – 2007

Bioindicador	Tempos de exposição solar e retirada de amostras			
	00:00h	02:00h	04:00h	06:00h
<i>Clostridium perfringens</i> Total amostras: 16	2 garrafas (1 com 2L e 1 com 1,5L)	4 garrafas (2 com 2L e 2 com 1,5L)	4 garrafas (2 com 2L e 2 com 1,5L)	6 garrafas (2 com 2L e 2 com 1,5L e 2 para recrescimento de 3 dias)
<i>Escherichia coli</i> Total amostras: 8	2 garrafas (1 com 2L e 1 com 1,5L)	—	—	6 garrafas (2 com 2L e 2 com 1,5L e 2 para recrescimento de 3 dias)
Sem bioindicador Total amostras: 2	1 garrafa (1,5L)	—	—	1 garrafa (1,5L)
Total de amostra por experimento: 26				

Tabela 3.2 Condições de estudo da etapa 2: Abril/Maio – 2008

Bioindicador	Tempos de exposição solar e retirada de amostras			
	00:00h	02:00h	04:00h	06:00h
<i>Clostridium perfringens</i> sem concentrador solar Total amostras: 08	2 garrafas	2 garrafas	2 garrafas	2 garrafas
<i>Clostridium perfringens</i> com concentrador solar Total amostras: 06	—	2 garrafas	2 garrafas	2 garrafas
Sem bioindicador com concentrador solar Total amostras: 02	1 garrafa	—	—	1 garrafa
Total de amostras por experimento: 16				

Devido à inexistência de um residual na desinfecção solar que pudesse garantir que a qualidade da água permanecesse a mesma por um período prolongado, que é somente possível com um processo químico de desinfecção, a avaliação do potencial de recrescimento bacteriano é importante, principalmente, em se tratando de água para consumo humano e de uso não imediatamente após a desinfecção. Assim, uma garrafa de cada volume para cada bioindicador na etapa 1 dos experimentos foi retirada após 6 h de exposição ao sol e armazenadas em suas embalagens originais, em um local específico dentro do laboratório, à

temperatura ambiente, por 72 h (3 dias) para avaliação posterior do recrescimento bacteriano. Essas condições foram determinadas a fim de simular a realidade de uma família sem refrigerador em sua residência, que manteria a água nas próprias garrafas de PET e que precisasse estocar a água por mais tempo.

O período experimental foi de quatro meses, dividido conforme estabelecido anteriormente. A água de estudo foi exposta ao sol uma vez por semana na etapa 1 em função do grande número de amostras dos dois bioindicadores usados, *Escherichia coli* e o *Clostridium perfringens*, e todo o trabalho prévio (preparo e esterilização de meios de cultura, soluções, vidrarias, manutenção dos bioindicadores, etc.) e posterior ao experimento (descontaminação dos meios inoculados com as amostras, lavagem e secagem de vidrarias, leituras dos resultados, etc.) que envolvia toda a semana, inclusive as análises de recrescimento após 3 dias de exposição ao sol. Já na etapa 2, a exposição pôde ser duas vezes por semana principalmente pela diminuição das amostras e o uso de um único bioindicador, o *Clostridium perfringens*. Em ambas as etapas foram feitas análises físico-químicas e microbiológicas da água bruta antes e depois da exposição solar e, através do método de contagem em placas em profundidade, obteve-se o resultado de heterotróficos totais. Essas amostras sem os bioindicadores foram usadas para avaliar se a R-UV era eficaz na água "real" do poço.

As amostras de água foram colocadas em garrafas de PET nos volumes já definidos e colocadas em exposição solar às 09 h da manhã e retiradas nos seguintes horários, para análises: 11 h, 13 h e 15 h (último horário de exposição, perfazendo um total de 06 horas). O horário de verão iniciou-se no dia 14 de outubro de 2007 e finalizou em 17 de fevereiro de 2008 e, neste período, os experimentos realizados tiveram alteração de horário de início e fim (10 h às 16 h) e, portanto, também os horários das retiradas de amostras foram: 12 h, 14 h e 16 h.

A exposição das amostras à radiação solar foi realizada no período de 9 h às 15 h, considerado ideal para os experimentos. A máxima intensidade da radiação solar está relacionada com a máxima elevação do sol durante o dia. As garrafas foram direcionadas para o norte conforme verificado por uma bússola no próprio local dos experimentos, em cima da telha. Durante este período, foram tomadas as amostras e realizadas as análises anteriormente definidas nos intervalos de 2 h, 4 h e 6 h após o início da exposição ao sol.

Foram inoculadas as amostras da água do poço (Figura 3.5) com os microrganismos indicadores. Em galões de 20 L (Figura 3.6), foram preparados inóculos com 10^3 de *Clostridium perfringens*, e 10^6 de *Escherichia coli*. Foram tomadas amostras de cada

uma para confirmação do quantitativo do microrganismo em questão, que são as amostras inoculadas no tempo zero.



Figura 3.5 - Poço da EEC/ UFG



Figura 3.6 - Galões de 20 L de água inoculada

3.2 Água de Estudo

Foram realizados estudos preliminares que tiveram como objetivo auxiliar na decisão sobre o tipo de água a ser utilizada e a metodologia de coleta mais apropriada. Para escolha da água, foram analisados os parâmetros físico-químicos: turbidez, cor aparente, pH, oxigênio dissolvido e temperatura, bem como a contaminação microbiana pré-existente e a acessibilidade de manuseio e transporte da mesma, além dos indicadores *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*, que deveriam estar ausentes, pois foram inseridos na água de estudo de forma padronizada e conhecida para realização da desinfecção solar.

A preparação da água de estudo consistiu no uso da água natural de um poço raso, de 20 m de profundidade aproximadamente, da Escola de Engenharia Civil – UFG, inoculada com a *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* em garrafas de PET, separadamente.

3.3 Esterilização e Sanitização das Garrafas de PET

As garrafas de PET de 2 L, para acondicionamento das amostras, e os galões de 20 L, para armazenamento da água bruta colhida no poço, foram submetidos a processos de remoção dos seus bioindicadores a cada experimento realizado, afim de que não houvesse interferência nos valores inoculados inicialmente.

A sanitização das garrafas de PET que foram inoculadas com a *Escherichia coli* começava pelo menos 72 horas antes do início de cada experimento. As mesmas garrafas de PET foram utilizadas durante os 08 experimentos para a *Escherichia coli* na etapa 1 e, assim, era necessário garantir a sanitização destas garrafas após cada experimento. As garrafas foram primeiramente preenchidas completamente com água clorada de torneira mais 4 mL devidamente pipetados (2 colheres de sopa) de hipoclorito de sódio comercial, fechadas com suas respectivas tampas e conservadas por 24 horas. Após este período, esta água era descartada e novamente as garrafas eram preenchidas com água clorada de torneira, que após 24 horas era descartada, correspondendo ao primeiro enxágüe. Depois, as garrafas eram novamente preenchidas com água clorada de torneira e conservadas por mais 24 horas ou até o momento de encher a garrafa com a própria água de estudo, efetuando-se assim o segundo enxágüe. Na metodologia descrita por Fleury (2006) este último enxágüe era feito com água destilada que, por ser muito propensa a recontaminação, foi substituída pela água clorada que era retirada antes do uso e cada garrafa era ambientada com a água bruta do poço antes de receber a água de estudo, ou seja, a água inoculada com a *Escherichia coli*. Já na esterilização das garrafas de PET, inoculadas com o *Clostridium perfringens*, foi feita uma modificação do agente sanitizante hipoclorito de sódio para o peróxido de hidrogênio a 3%, que é um esterilizante químico bastante eficiente mantendo o tempo de contato e número de enxágües. Os certificados de análises do peróxido de hidrogênio PA utilizados estão no Anexo A. O peróxido de hidrogênio a 3% usado como esterilizante das garrafas de PET e galões de armazenamento da água de estudo, ficou por, no mínimo, 24 h em contato antes dos dois enxágües rigorosos, com 24 h de intervalo entre eles.

No momento de uso, foi usado jaleco de manga comprida, além de calça comprida e sapato fechado, óculos de segurança e máscara contra gases, principalmente, pelo risco de contaminação com as toxinas do *Clostridium perfringens*. Este bioindicador não foi manipulado em cabine de segurança biológica no momento da inoculação na água de estudo dentro de galões, nas tomadas de ensaio e nas esterilizações das garrafas de PET. O mesmo tipo de conduta ocorreu para a *Escherichia coli* na etapa 1, sendo que ambos os bioindicadores foram mantidos através de suas soluções estoque pelas metodologias específicas e também as análises microbiológicas das amostras após a SODIS foram realizadas em cabine de segurança biológica certificada.

3.4 Simulações das Medidas de Radiação Solar

Os dados de R-UVA foram obtidos por modelagem matemática através do código computacional denominado UVGAME (Ultraviolet Global Atmospheric Model), alimentado por informações atmosféricas (ozônio, perfil, aerossóis, etc), geográficas (latitude/longitude) e temporais (dia/hora/mês), uma vez que não havia sensores para medição deste tipo de radiação no sítio experimental. Os cálculos foram feitos levando também em consideração observações de ozônio feitas pelo sensor OMI (Ozone Mapping Instrument) a bordo do satélite Aura. O modelo de transferência radiativa utilizado oferece dados de alta precisão para situações de céu claro, que foi a condição de escolha para os dias de realização dos experimentos, conforme citado no item 3.1 (Corrêa, 2004).

3.5 Análises

Os exames e análises realizados para caracterização da água foram feitos de acordo com os procedimentos propostos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA; AWWA; WEF, 2004).

3.5.1 Análises Físico-Químicas

Para avaliar a influência dos parâmetros cor, turbidez, pH, oxigênio dissolvido e temperatura no processo, foram feitas análises físico-químicas da água no Laboratório de Saneamento da Escola de Engenharia Civil, da Universidade Federal de Goiás.

As análises dos parâmetros físico-químicos foram realizadas em todas as amostras, utilizando os equipamentos listados na Tabela 3.3. Antes da exposição à radiação solar e durante o experimento todas as análises da água foram realizadas para controle da sua qualidade.

Tabela 3.3 Métodos e equipamentos usados nas análises físico-químicas:

MÉTODO	EQUIPAMENTO	MARCA	MODELO
Cor Aparente	Colorímetro	Hack	DR/890
Oxigênio Dissolvido	Sonda de medição de oxigênio e temperatura	Schott	Handylab OX1
pH	pHmetro	Qualxtron	8010
Temperatura	Sonda de medição de oxigênio e temperatura	Schott	Handylab OX1
Turbidez	Turbidímetro	Marconi	MATB 1000

3.5.2 Análises Microbiológicas

A eficiência da desinfecção da água natural por meio da radiação solar foi avaliada através de análises microbiológicas, realizadas nos Laboratórios de Enzimologia e de Controle de Qualidade Microbiológico de Medicamentos, Cosméticos e Correlatos da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal de Goiás, com base na inativação dos microrganismos *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*, este último por apresentar maior resistência aos agentes desinfetantes.

Portanto, um dos indicadores biológicos utilizado nos experimentos é a *Escherichia coli* ATCC (American Type Culture Collection) 8739. A solução estoque foi preparada para se obter uma concentração aproximada de 15×10^8 NMP/100 mL, ou seja, 15×10^8 número mais provável de microrganismos por 100 mL de amostra, e a água de estudo, 8×10^6 NMP/100 mL.

Para a identificação e quantificação simultânea do número de coliformes totais e *Escherichia coli* viáveis, foi utilizado o método Colilert®, patenteada pela IDEXX e que se baseia na tecnologia de substrato definido (DST).

Quando os coliformes totais metabolizam o indicador-nutriente o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (ONPG) do Colilert®, a amostra adquire coloração amarela. Quando a *Escherichia coli* metaboliza o indicador-nutriente 4-metilumbeliferil-β-d-glucoronídeo (MUG) do Colilert®, a amostra se torna fluorescente. O Colilert® pode detectar simultaneamente estas bactérias a uma concentração de 1UFC/100 mL, dentro de 24 horas, até em presença de 2 milhões de bactérias heterotróficas presentes por cada 100 mL.

As amostras de água das garrafas de PET, que foram previamente inoculadas com a *Escherichia coli*, foram coletadas e misturadas ao reagente Colilert e homogeneizadas até a completa solubilização. Após, foram transferidas para as cartelas Quanti-Tray (Figura 3.7), que foram seladas em uma Seladora Quanti-Tray Sealer Modelo 2X (Figura 3.8) e, em seguida, incubadas a 35°C, por aproximadamente, 24 horas.

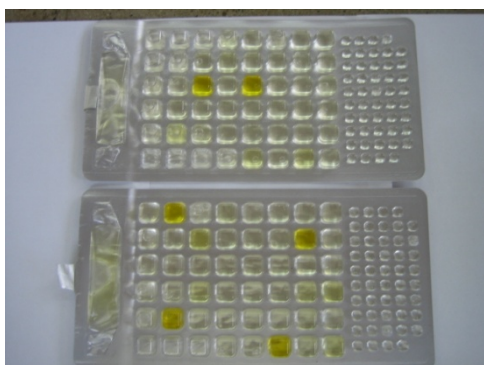


Figura 3.7 - Cartelas Quanti-Tray

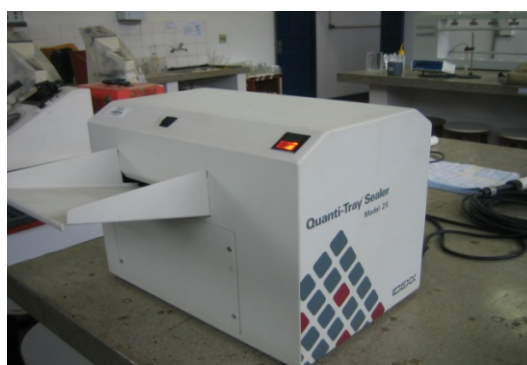


Figura 3.8 - Seladora Quanti-Tray Sealer Modelo 2X

A quantificação do NMP de coliformes totais foi realizada por meio da contagem das cavidades da cartela Quanti-Tray/2000 que adquiriram coloração amarela intensa, após 24 horas de incubação. Para a quantificação de *Escherichia coli* foram utilizadas as mesmas cartelas dos coliformes totais, porém, estas cartelas foram colocadas sob uma lâmpada ultravioleta (comprimento de onda de 360 nm) portátil, onde as cavidades positivas foram as que apresentarem a cor amarela intensa e a fluorescência (IDEXX, 2007). Após a contagem das células (poços) da cartela, utilizou-se a tabela Quanti-Tray/2000 para a determinação do NMP/100 mL dos coliformes totais e *Escherichia coli*.

A cepa de *Clostridium perfringens*, com referência ATCC 12924 fornecido pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), lote 0497215, INCQS 00215, foi a substituta da cepa CCT 7392, de *Clostridium perfringens*, com referência ATCC 13124 e lote T02/3/I fornecido pela Fundação André Tosello, que já se encontrava não-viável quando repicada. A quantidade deste microrganismo que foi inoculada nas amostras a serem testadas variou de 100 a 1000 UFC, sendo o valor ideal entre 500 a 600 UFC. O informe da bactéria de referência *Clostridium perfringens* do INCQS está no Anexo B.

A determinação de *Clostridium perfringens* foi realizada segundo rotina proposta pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo – CETESB (CETESB, 1993), que se baseia no método dos tubos múltiplos pela redução do sulfito e coagulação do leite tornassolado. O método foi realizado em ensaios presuntivo e

confirmativo. No ensaio presuntivo as amostras foram inoculadas nos tubos e incubadas a 35°C, durante 48 horas, em anaerobiose. Este ensaio foi feito em meio diferencial enriquecido para clostrídios (DRCM) e contendo sulfito. Após esse período, o enegrecimento do meio, resultante da redução do sulfito, é uma prova positiva da presença dos clostrídios na amostra (Figuras 3.9 e 3.10). No ensaio confirmativo, os tubos positivos do ensaio presuntivo foram inoculados em leite tornassolado e incubados a 35°C, durante 48 horas, em anaerobiose e a formação de coágulos indica resultado positivo. Porém, tendo em vista o longo tempo de análise necessário para realização dos ensaios para *Clostridium perfringens*, e, considerando que esse organismo será inoculado em valores bastante elevados, se comparados com a sua incidência no ambiente aquático natural para o estudo em questão, somente foi feito o ensaio presuntivo (TEIXEIRA, 2003).

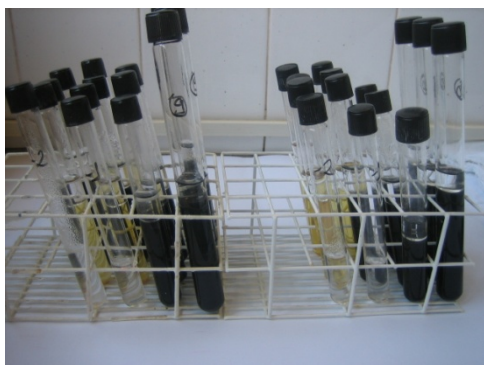


Figura 3.9 – Tubos múltiplos para a determinação de *Clostridium Perfringens*



Figura 3.10 – Resultados negativos e positivos (negros) para *Clostridium Perfringens*

3.6 Métodos Bacteriológicos e Inoculação das Amostras

3.6.1 Métodos Bacteriológicos

A detecção e a quantificação de *Escherichia coli* foram realizadas pelo método Colilert®, técnica que fornece os resultados em número mais provável de microrganismos presentes em 100 mL de amostra (NMP/100 mL) baseado no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, AWWA e WEF, 2004).

A detecção e a quantificação de *Clostridium perfringens* foram realizadas pela técnica de tubos múltiplos para a determinação do número mais provável (NMP) de microrganismos presentes em uma amostra. As análises foram realizadas baseadas no Método

de Ensaio - L5/213 (CETESB, 1993), adaptada pela UnB (MONTEIRO, 1999) e, ainda, com a alteração da tabela de NMP na leitura dos resultados (Anexo C).

As metodologias já foram abordadas anteriormente, conforme seção sobre análises microbiológicas.

3.6.2 Preparo das Amostras

As amostras para *Escherichia coli* foram preparadas a partir de repiques da cultura estoque congelada da cepa padrão, a fim de torná-la novamente viável. A seguir, foi feito o preparo da cultura estoque líquida que forneceu em torno de $67 \text{ a } 86 \times 10^7$ UFC/mL, sendo este valor devidamente comprovado por meio da técnica de contagem em placas de Petri, *pour plate*, em cada experimento, e diluições seriadas que quantificaram a concentração da bactéria *Escherichia coli* viável na cultura estoque líquida.

As amostras para *Clostridium perfringens* foram aquecidas em banho-maria a 75°C, durante 10 minutos, a fim de eliminar organismos não esporulados e formas vegetativas. Após, foram feitas as diluições necessárias.

Os tubos contendo o meio de cultura diferencial enriquecido para clostrídios (DRCM), simples e duplo, previamente identificados e preparados, conforme já descrito, foram inoculados em porções de 1 mL, em série de três tubos para cada diluição efetuada e 10 mL no DRCM duplo. Os tubos de ensaio inoculados foram incubados em anaerobiose pela adição de vaselina líquida na superfície dos tubos, por 48 horas, à temperatura de 35 ± 1 °C.

Alexander (1982) fornece a tabela para as diferentes diluições e as respectivas inoculações que foram efetuadas. De acordo com o número de tubos com resultado positivo, em cada série de três tubos inoculados, obtém-se um código por meio do qual se calcula o NMP/100 mL de *Clostridium perfringens* (Anexo C).

Na leitura dos resultados na tabela de NMP/100 mL presente no Anexo C, para a combinação de positivos onde se lê: 0-0-0, o valor encontrado é < 3 e, para definir um número dentro deste intervalo foi adotado 2,9, sendo o maior valor antes do 3 que já seria uma próxima combinação na tabela.

3.6.3 Inoculação das Amostras

Uma maior parcela da amostra de água do poço (dois galões de 20 L cada na etapa 1 e um galão na etapa 2) foi inoculada com concentrações entre 10^2 a 10^3 NMP/100 mL de *Clostridium perfringens* e, através da técnica dos tubos múltiplos, foi quantificado o número deste indicador presente no volume de estoque, que era utilizado para inocular a amostra, possibilitando, assim, o cálculo do volume (V_1) necessário deste estoque para inserir na água coletada. A Equação 3.6 foi usada para encontrar este valor:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad (3.6)$$

Onde C_1 é a concentração em NMP/100 mL no estoque; V_1 é o volume em mL do estoque que vai ser acrescentado na amostra total; C_2 é a concentração em NMP/100 mL que se deseja encontrar (10^3 NMP/100 mL) e V_2 é o volume em mL da amostra total (40.000 mL, divididos em dois galões de 20.000 mL cada).

Já para obter uma concentração inicial de 8×10^6 NMP/100 mL de *Escherichia coli* na água de estudo, foi calculada a quantidade da solução estoque usando a mesma equação acima.

Onde C_1 é a concentração de bactérias encontrada na solução estoque; V_1 é o volume em mL da solução estoque que vai ser acrescentado na amostra total; C_2 é a concentração que se deseja encontrar (8×10^6 NMP/100 mL) e V_2 é o volume em mL da amostra total (20.000 mL em um único galão).

Na etapa 2 foi usado somente um galão de 20 L para o *Clostridium perfringens*, já que a *Escherichia coli* não foi estudada nesta fase, pois, o uso do concentrador solar para este bioindicador já havia sido avaliado por Fleury (2006).

3.6.4 Coleta e Armazenamento das Amostras

Para a coleta de amostras para os exames microbiológicos realizados nos Laboratórios de Controle de Qualidade Microbiológico de Medicamentos, Cosméticos e Correlatos e de Enzimologia da Faculdade de Farmácia, da UFG, foram utilizados sacos plásticos estéreis descartáveis e graduados e frascos de laboratório de vidro graduado com tampa, lavados e esterilizados, previamente, enquanto que para a análise dos parâmetros

físico-químicos foram utilizados recipientes devidamente limpos e secos do próprio Laboratório de Saneamento da Escola de Engenharia Civil, da UFG. O volume de tomada de ensaio foi variado, conforme a exigência de cada parâmetro.

As amostras foram analisadas do ponto de vista microbiológico para *Clostridium perfringens*, no dia seguinte à exposição da radiação solar na etapa 1 e, assim, foram conservadas conforme recomendação do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, sob refrigeração à temperatura menor que 10°C, até 01 hora após a coleta, sendo que o tempo limite não deve exceder 24 horas (APHA, AWWA e WEF, 2004). Para *Escherichia coli* as análises foram iniciadas no mesmo dia, após o término da retirada das amostras do último horário de exposição ao sol. Já as análises físico-químicas ocorreram simultaneamente à retirada das amostras em cada intervalo de tempo anteriormente estipulado. Já na etapa 2, as amostras contendo *Clostridium perfringens* foram analisadas no mesmo dia, pois, não havia mais as amostras de *Escherichia coli* o que favoreceu na agilidade das análises nesta etapa.