

**UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SUSTENTABILIDADE DE**  
**ECOSSISTEMAS COSTEIROS E MARINHOS**  
**MESTRADO EM ECOLOGIA**

**CRISTINA PORTO PRADO**

**ESTUDO COMPARATIVO DE AGENTES INIBIDORES DE CRESCIMENTO**  
**BACTERIANO UTILIZADOS PARA TRATAMENTO DOS ESGOTOS**  
**DOMÉSTICOS**

**Santos/SP**

**2015**

**CRISTINA PORTO PRADO**

**ESTUDO COMPARATIVO DE AGENTES INIBIDORES DE CRESCIMENTO  
BACTERIANO UTILIZADOS PARA TRATAMENTO DOS ESGOTOS  
DOMÉSTICOS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Santa Cecília como  
parte dos requisitos para obtenção  
do título de mestre no Programa de  
Pós-Graduação em Ecossistemas  
Costeiros e Marinhos, sob  
orientação do Prof. Dr. Silvio José  
Valadão Vicente e da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.  
Cristina Sayuri Asano.

**Santos - SP**

**2015**

Autorizo a reprodução parcial ou total deste trabalho, por qualquer que seja o processo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos.

Prado, Cristina P.

Estudo Comparativo de Agentes Inibidores de Crescimento Bacterianos utilizados para Tratamento dos Esgotos Domésticos / Cristina P Prado, 2015.

N. fls.76.

Orientadores: Prof. Dr. Silvio José Valadão Vicente e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Sayuri Asano

Dissertação de Mestrado - Universidade Santa Cecília, Programa de Pós Graduação em Ecologia, Santos, SP, 2015.

1.Esgoto. 2.Hipoclorito de sódio; 3. Peróxido de hidrogênio. 4. *Salmonella typhimurium*; 5.*Escherichia coli*. I - Vicente, Silvio José Valadão. II - Asano, Cristina Sayuri. III - Estudo Comparativo de Agentes Inibidores de Crescimento Bacterianos utilizados para Tratamento dos Esgotos Domésticos

Elaborada pelo SiBi – Sistema Integrado de Bibliotecas - Unisanta

*Dedico este trabalho à minha família, em especial ao meu marido Luís, incentivador e parceiro; à minha filha Isabelle paciente e compreensiva; ao meu querido afilhado Diego; à minha querida mãe “in memorian” Maria do Carmo; a minha tia “in memorian” Regina; às minhas amigas Ariane, Cristina e Elizabete.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade Santa Cecília, que com excelência, criou condições para que fosse possível a continuidade de meus estudos e aperfeiçoamento pessoal e profissional.

Aos meus orientadores, Professor Doutor Silvio José Valadão Vicente e Professora Doutora Cristina Sayuri Asano, pela paciência, dedicação, profissionalismo, seriedade e por compartilhar, de forma exemplar, conhecimentos e experiências profissionais e acadêmicas.

A todos os professores do programa de mestrado em Ecologia da UNISANTA, pela dedicação e incentivo durante o curso.

Ao diretor adjunto da UNIMONTE prof. Mestre Flávio Sartori que possibilitou o desenvolvimento do meu projeto nos laboratórios da instituição.

Aos funcionários e estagiários do laboratório de microbiologia da UNIMONTE, em especial Bianca da Silva Figueiredo e Priscila Meloti.

A estagiária do curso de Engenharia Química da UNISANTA Amanda Borges.

Aos meus colegas de mestrado, André de Freitas, Ariane Pera, Érica Rojas e Vinícius Roveri pelo ótimo convívio, aprendizagem e amizade.

Às secretárias da pós-graduação, Sandra e Imaculada, pela atenção, simpatia e cortesia.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

## RESUMO

O lançamento de esgotos é uma das formas mais comuns de poluição de cursos d'água. O lançamento desses efluentes causam impactos ambientais tais como contaminação microbiológica, alteração da biodiversidade e acréscimo de matéria orgânica no meio. Esta dissertação teve por objetivo realizar um estudo comparativo utilizando hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio para o tratamento bacteriológico dos esgotos domésticos. Foram realizados testes *in vitro* para a determinação dos parâmetros de crescimento microbiano e as densidades ópticas foram medidas por espectrofotometria visível em 600 nm. Nestes ensaios foram utilizadas as bactérias *S. typhimurium* e *E. coli* e os agentes inibidores de crescimento peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio. A partir das curvas de crescimento foram calculadas as velocidades exponenciais médias e os tempos de latência para cada uma das concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NaClO. Após os testes verificou-se que o agente inibidor mais eficiente foi o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para ambas bactérias. Para a bactéria *S. typhimurium*, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou efeito bactericida na concentração de 150 mg/L e com o NaClO apresentou ação bacteriostática na concentração de 200 mg/L. Para a *E. coli*, a concentração de 25 mg/L para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 50 mg/L para NaClO, resultaram em efeito bacteriostático.

**Palavras Chave:** Esgoto. Hipoclorito de sódio. Peróxido de hidrogênio. *Salmonella typhimurium*. *Escherichia coli*.

## ABSTRACT

The dumping of sewage is one of the most common form of pollution in watercourses. Environmental impacts generated by discharge of these effluents can cause microbiological contamination, changes of the biodiversity and the increase of organic matter. This study aimed to conduct a comparative study using sodium hypochlorite and hydrogen peroxide for the bacteriological treatment of domestic sewage. Tests *in vitro* were conducted to determine microbial growth parameters and the optical density were measured by visible spectroscopy at 600 nm. Cultures of *S. typhimurium* and *E. coli* were tested using hydrogen peroxide and sodium hypochlorite as inhibitory agents. Using the growth curves, the average exponential rate and the lag time were obtained for each concentration of NaClO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. After testing, it was verified that the most efficient inhibitory agent was H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for both bacterias. For *S. typhimurium*, 150 mg/L of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presented bactericidal effect and 200 mg/L of NaClO presented bacteriostatic effect. For *E. coli*, 25 mg/L of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 50 mg/L of NaClO produced bacteriostatic effect.

**Keywords:** Sewage. Sodium hypochlorite. Hydrogen peroxide. *Salmonella typhimurium*. *Escherichia coli*.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Fig. 1 Distribuição da água no planeta Terra.                                                                                                                 | 17 |
| Fig. 2 Vista aérea de lagoas de estabilização localizadas na cidade de Lins – SP.                                                                             | 24 |
| Fig. 3 Instalações de unidade de lodo ativado.                                                                                                                | 25 |
| Fig. 4 Tratamento por sistema de zona de raízes.                                                                                                              | 27 |
| Fig. 5 Cultura de bactérias contendo coliformes fecais.                                                                                                       | 28 |
| Fig. 6 Fotomicrografia da <i>E. coli</i> .                                                                                                                    | 30 |
| Fig. 7 Grupos filogenéticos do <i>E. coli</i> .                                                                                                               | 31 |
| Fig. 8 Micrografia eletrônica de <i>S. typhimurium</i> .                                                                                                      | 32 |
| Fig. 9 Curva logarítmica de desinfecção de micro-organismos.                                                                                                  | 35 |
| Fig.10 Esterilizador por radiação UV.                                                                                                                         | 37 |
| Fig.11 Preparo da cultura inicial de <i>S. typhimurium</i> .                                                                                                  | 41 |
| Fig.12 Preparo das placas de cultura de <i>S. typhimurium</i> .                                                                                               | 42 |
| Fig.13 Preparo da cultura mãe.                                                                                                                                | 43 |
| Fig.14 Teste de inibição realizado em capela de fluxo laminar.                                                                                                | 44 |
| Fig.15 Teste com <i>S. typhimurium</i> (C = controle, TR = tratamento com 10 mg/L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).                                         | 47 |
| Fig.16 Teste <i>S. typhimurium</i> (C = controle, TR = tratamento com 10 mg/L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), valores médios (n = 3).                     | 48 |
| Fig.17 Teste <i>S. typhimurium</i> (C = controle, TR = tratamento com 50 mg/L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), valores médios (n = 3).                     | 48 |
| Fig.18 Teste <i>S. typhimurium</i> (C = controle, TR = tratamento com 75 mg/L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), valores médios (n = 3).                     | 49 |
| Fig.19 Teste <i>S. typhimurium</i> (C = controle, TR = tratamento com 100 mg/L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), valores médios (n = 3).                    | 50 |
| Fig. 20 Teste <i>S. typhimurium</i> (C = controle, TR = tratamento com 150 mg/L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), valores médios (n = 3).                   | 50 |
| Fig. 21 Velocidade exponencial ( $V_{exp}$ ) versus concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg/L) para <i>S. typhimurium</i> , valores médios (n = 3). | 52 |
| Fig.22 Tempo de latência (Lag) versus concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg/L) para <i>S. typhimurium</i> , valores médios (n = 3).               | 53 |
| Fig. 23 Teste com <i>E. coli</i> (C = controle, TR = tratamento com 5 mg/L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), valores médios (n = 3).                        | 54 |
| Fig. 24 Teste com <i>E. coli</i> (C = controle, TR = tratamento com 10 mg/L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), valores médios (n = 3).                       | 54 |
| Fig. 25 Teste com <i>E. coli</i> (C = controle, TR = tratamento com 15 mg/L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), valores médios (n = 3).                       | 55 |

|                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Fig. 26 Teste com <i>E. coli</i> (C = controle, TR = tratamento com 20 mg/L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), valores médios (n = 3).                | 55 |
| Fig. 27 Teste com <i>E. coli</i> (C = controle, TR = tratamento com 25 mg/L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), valores médios (n = 3).                | 56 |
| Fig. 28 Velocidade exponencial ( $V_{exp}$ ) versus concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg/L) para <i>E. coli</i> , valores médios (n = 3). | 57 |
| Fig. 29 Tempo de latência (Lag) versus concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg/L) para <i>E. coli</i> , valores médios (n = 3).              | 58 |
| Fig. 30 Teste com <i>E. coli</i> (C = controle, TR = tratamento com 5 mg/L de NaClO), valores médios (n = 3).                                          | 59 |
| Fig. 31 Teste com <i>E. coli</i> (C = controle, TR = tratamento com 12,5 mg/L de NaClO), valores médios (n = 3).                                       | 59 |
| Fig. 32 Teste com <i>E. coli</i> (C = controle, TR = tratamento com 25 mg/L de NaClO), valores médios (n = 3).                                         | 60 |
| Fig. 33 Teste com <i>E. coli</i> (C = controle, TR = tratamento com 30 mg/L de NaClO), valores médios (n = 3).                                         | 61 |
| Fig. 34 Teste com <i>E. coli</i> (C = controle, TR = tratamento com 50 mg/L de NaClO), valores médios (n = 3).                                         | 61 |
| Fig. 35 Velocidade exponencial ( $V_{exp}$ ) versus concentração de NaClO (mg/L) para <i>E. coli</i> , valores médios (n = 3).                         | 62 |
| Fig. 36 Tempo de latência (Lag) versus concentração de NaClO (mg/L) para <i>E. coli</i> , valores médios (n = 3).                                      | 63 |
| Fig. 37 Teste com <i>S. typhimurium</i> (C = controle, TR = tratamento com 75 mg/L de NaClO), valores médios (n = 3).                                  | 64 |
| Fig. 38 Teste com <i>S. typhimurium</i> (C = controle, TR = tratamento com 100 mg/L de NaClO), valores médios (n = 3).                                 | 64 |
| Fig. 39 Teste com <i>S. typhimurium</i> (C = controle, TR = tratamento com 150 mg/L de NaClO), valores médios (n = 3).                                 | 65 |
| Fig. 40 Teste com <i>S. typhimurium</i> (C = controle, TR = tratamento com 200 mg/L de NaClO), valores médios (n = 3).                                 | 66 |
| Fig. 41 Velocidade exponencial ( $V_{exp}$ ) versus concentração de NaClO (mg/L) para <i>S. typhimurium</i> , valores médios (n = 3).                  | 67 |
| Fig. 42 Tempo de latência (Lag) versus concentração de NaClO (mg/L) para <i>S. typhimurium</i> , valores médios (n = 3).                               | 67 |

## LISTA DE QUADROS

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| Q.1 Composição média dos compostos orgânicos nos esgotos domésticos.           | 22 |
| Q.2 Bactérias encontradas nos esgotos e algumas patogenias associadas.         | 28 |
| Q.3 Vias de contaminação humana por patógenos presentes no esgoto.             | 29 |
| Q.4 Probabilidade de doenças causadas por alguns sorotipos de <i>E. coli</i> . | 32 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                        |                                                                |
|------------------------|----------------------------------------------------------------|
| <b>ATCC</b>            | American Type Culture Collection                               |
| <b>CL</b>              | Concentração letal                                             |
| <b>CF</b>              | Coliformes fecais                                              |
| <b>CT</b>              | Coliformes termotolerantes                                     |
| <b>DNA</b>             | Ácido desoxirribonucléico                                      |
| <b>EF</b>              | Enterococos fecais                                             |
| <b>DO</b>              | Densidade óptica                                               |
| <b>ETE</b>             | Estação de tratamento de esgoto                                |
| <b>L</b>               | Litro                                                          |
| <b>Lag</b>             | Tempo de latência                                              |
| <b>mg/L</b>            | Miligrama/L                                                    |
| <b>OxyR</b>            | Proteína expressa em presença de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
| <b>SoxRS</b>           | Proteína expressa em presença de superóxido                    |
| <b>UA</b>              | Unidade de absorbância                                         |
| <b>V<sub>exp</sub></b> | Velocidade exponencial                                         |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                                                                                       | 14 |
| <b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>                                                                                                            | 16 |
| 2.1 Água: importância e características                                                                                                    | 16 |
| 2.2 Degradação dos recursos hídricos                                                                                                       | 18 |
| 2.3 Esgotos: características, contaminação e tratamentos                                                                                   | 20 |
| 2.4 Doenças de veiculação hídrica                                                                                                          | 27 |
| 2.5 <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella typhimurium</i>                                                                                | 30 |
| 2.6 Agentes para tratamento de esgotos domiciliares                                                                                        | 34 |
| <b>3. OBJETIVOS</b>                                                                                                                        | 40 |
| 3.1 Objetivo geral                                                                                                                         | 40 |
| 3.2 Objetivos específicos                                                                                                                  | 40 |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                                                                                              | 41 |
| 4.1 Materiais                                                                                                                              | 41 |
| 4.2 Metodologia analítica                                                                                                                  | 41 |
| 4.3 Tratamento estatístico                                                                                                                 | 45 |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                                                                           | 47 |
| 5.1 <i>Salmonella typhimurium</i> : tratamento com peróxido de hidrogênio                                                                  | 47 |
| 5.2 <i>Escherichia coli</i> : tratamento com peróxido de hidrogênio                                                                        | 53 |
| 5.3 <i>Escherichia coli</i> : tratamento com hipoclorito de sódio                                                                          | 58 |
| 5.4 <i>Salmonella typhimurium</i> : tratamento com hipoclorito de sódio                                                                    | 63 |
| 5.5 Efeitos de concentrações crescentes do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre a velocidade exponencial de crescimento e tempo de latência | 68 |
| 5.6 Efeitos de concentrações crescentes do NaClO sobre a velocidade exponencial de crescimento e tempo de latência                         | 69 |
| <b>6. CONCLUSÕES</b>                                                                                                                       | 71 |
| <b>7. REFERÊNCIAS</b>                                                                                                                      | 72 |

## 1. INTRODUÇÃO

O esgoto é uma das principais fontes de matéria orgânica que pode contaminar as águas naturais. De acordo com Jordão e Pessoa (2011), o lançamento indiscriminado de esgotos sem tratamento ou parcialmente tratado nos corpos de água é responsável por alterações da qualidade ocasionadas no corpo receptor e nas implicações relativas às limitações dos usos da água.

O esgoto doméstico contém aproximadamente 99,9% de água e a fração restante apresenta sólidos orgânicos em suspensão e dissolvidos além de micro-organismos. Entre as substâncias orgânicas presentes no esgoto predominam as proteínas (40% a 60%), carboidratos (25% a 50%), gorduras e óleos (8% a 12%) e ureia, surfactantes, fenóis, pesticidas, metais e outros compostos em menor quantidade (SPERLING, 2014).

Os micro-organismos patogênicos estão presentes nas fezes de indivíduos e animais infectados e podem transmitir diversas doenças de veiculação hídrica.

São considerados indicadores de poluição os Coliformes Totais (CT), os Coliformes Fecais (CF) termotolerantes e os Enterococos Fecais (EF) presentes nas fezes de animais de sangue quente. Como exemplo de alguns micro-organismos patogênicos destacam-se a *Salmonella typhi* e *paratyphi*, *Escherichia coli*, os enterovírus, o vírus da hepatite A, os protozoários e os helmintos (JORDÃO e PESSOA, 2011).

A presença de qualquer desses organismos em amostras de corpos de água indica a probabilidade de que outros organismos patogênicos também estejam presentes, caracterizando uma contaminação por esgotos.

Atualmente, existem inúmeros processos para o tratamento de esgotos, individuais ou combinados. A decisão pelo processo a ser empregado deve levar em consideração principalmente as condições do curso de água receptor (estudo de autodepuração e os limites definidos pela legislação ambiental) e as características do esgoto bruto a ser lançado. O tratamento nas Estações de Tratamento de Esgotos (ETE) sempre envolve processos físicos, químicos e biológicos. (SPERLING, 2014).

A cloração é a principal forma de desinfecção nas ETE. O cloro ou agentes desinfetantes penetram nas células dos micro-organismos e reagem com suas enzimas, destruindo-as ou inativando-as. A dosagem de cloro no esgoto bruto varia

de 6 a 12 mg/L (JORDÃO e PESSOA 2011). A cloração sobre a matéria orgânica dos esgotos pode formar compostos tóxicos como organoclorados e trihalometanos como o clorofórmio, que têm consequências tóxicas e carcinogênicas (BAIRD, 2011).

Por outro lado, a ação do peróxido de hidrogênio está relacionada à produção de radicais hidroxilas no meio intracelular, as quais atacam os componentes celulares essenciais como os lipídeos das membranas, as proteínas e o DNA, conduzindo à incapacidade de sobrevivência microbiana (McDONNELL e RUSSELL, 1999). De acordo com os autores, os peróxidos são fortes oxidantes e comprovadamente mais eficazes que os compostos clorados, apresentando níveis de segurança elevados e alta miscibilidade na água.

Este cenário trouxe a premente necessidade de se identificar agentes inibidores de crescimento adequados para a incapacitação ou morte dos micro-organismos patogênicos. Uma outra preocupação relevante neste estudo foi de encontrar um agente eficaz que não gerasse impactos ou resíduos tóxicos no ambiente.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

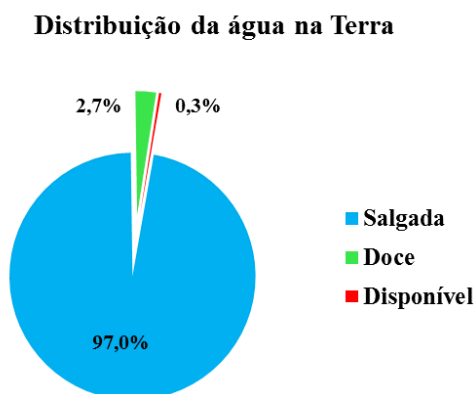
### **2.1 Água: importância e características**

A água é um dos mais importantes recursos naturais que se renova através do ciclo hidrológico. É fundamental à vida e para diversas atividades desenvolvidas pelos seres humanos. Encontra-se disponível sob várias formas e sua distribuição no nosso planeta é um fator essencial para moldar os ecossistemas (BRAGA et al., 2005).

Como verificado ao longo da história da humanidade, o desenvolvimento das populações ocorreu em função da abundância de alimentos, existência de fontes de energia necessárias à sua subsistência e a disponibilidade da água, sendo que estes fatores representavam instrumentos de dominação e poder. Estes recursos hídricos permitiram, de maneira decisiva, a instalação ou forçaram a migração das populações em diferentes regiões do planeta, sendo fator predominante para o surgimento ou desaparecimento das civilizações (REBOUÇAS, 2006; JORDÃO E PESSOA, 2011).

A água abrange cerca de 75% da superfície do planeta Terra e sua distribuição totaliza 97% de água salgada (difundida entre os diversos mares e oceanos) e 3% na forma de água doce. Desta última fração, 2,7% se encontra na forma de geleiras, neve, vapor ou em profundidades inacessíveis aos humanos e apenas 0,3% se encontra disponível para aproveitamento como visto na Figura 1. Graças ao ciclo hidrológico natural do planeta, os recursos hídricos superficiais e subterrâneos são constantemente reciclados através de precipitação, escoamento superficial, infiltração, escoamento subterrâneo e evapotranspiração (TEIXEIRA, 2009; LIBÂNIO, 2010).

Nos seres vivos incluindo os humanos, a água é a substância mais abundante, perfazendo cerca de 70% da massa celular. Além de fornecer um meio líquido adequado, esta substância desempenha outras funções vitais para o perfeito funcionamento das células, podendo ser citadas o suporte estrutural, o transporte de nutrientes e metabólitos indesejáveis, a participação no processo da digestão através de reações de hidrólise, a atuação na absorção e excreção, a promoção e auxílio das funções mecânicas e a manutenção da temperatura corporal (LEHNINGER, 2009).



**Figura 1: Distribuição da água no planeta Terra (adaptado de TEIXEIRA, 2009; LIBÂNIO, 2010).**

Segundo Braga et al. (2005) e Libânio (2010), as características físico-químicas incomuns da água indicam que a mesma é uma substância notável, apresentando propriedades peculiares quando comparada a outros solventes. Isto decorre das pontes de hidrogênio existentes, o que resulta na forma física líquida nas condições habituais de temperatura e pressão, tendo elevado calor específico, densidade, viscosidade e tensão superficial. A água é um ótimo solvente sendo freqüentemente designada como solvente universal devido às suas propriedades moleculares que permitem que ela dissolva um grande número de substâncias orgânicas e inorgânicas nos estados sólido, líquido ou gasoso.

As propriedades da água foram essenciais para permitir o aparecimento da vida e a manutenção das cadeias alimentares formadas pelos organismos produtores, consumidores e decompositores. A solubilidade de diferentes materiais que contribuem para a composição das águas naturais influencia no metabolismo dos organismos aquáticos, sendo fundamental para a estreita interação entre os seres vivos e o ambiente que os envolve (TEIXEIRA, 2009; LIBÂNIO, 2010).

A água é um recurso natural intensamente utilizado, sendo fundamental para a existência e manutenção da vida, devendo estar presente no ambiente em quantidade e qualidade. Sua pureza está associada à qualidade de vida das pessoas. Em oposição, seu uso inadequado e sua poluição têm causado impactos negativos principalmente nas últimas décadas, tornando-a um dos elementos chave na questão ambiental (BRAGA et al., 2005; JORDÃO E PESSOA, 2011). O acesso à água pura e livre de patógenos representa uma necessidade crítica para a população mundial, sendo motivo de preocupação frente a conflitos internacionais e

um sério desafio ao desenvolvimento futuro (SALATI, LEMOS E SALATI, 2006; SPIRO E STIGLIANI, 2009).

## **2.2 Degradação dos recursos hídricos**

A contaminação das águas naturais pode ocorrer em qualquer uma das fases do ciclo hidrológico natural. Isto decorre das suas propriedades de solvente e da sua capacidade de transportar partículas, micro-organismos patogênicos e substâncias tóxicas. Por estes motivos, a qualidade da água é resultante de fenômenos naturais e antropogênicos (SPERLING, 2005; SILVA E KULAY, 2006; LIBÂNIO, 2010).

Segundo Braga et al. (2005) e Piveli e Kato (2006), à medida que as populações e as atividades produtivas aumentam, muitas regiões atingem condições de escassez de água ou se defrontam com problemas relacionados à sua qualidade. Poucas regiões do mundo se encontram livres dos problemas de perda das fontes de água doce através da degradação e da poluição das águas superficiais e subterrâneas em função de sua utilização como abastecimento humano e industrial, geração de energia, irrigação, navegação, aquicultura e recreação, dentre outros.

A qualidade da água pode ser avaliada através de vários parâmetros que traduzem suas principais características físicas, químicas e biológicas. Muitos de seus atributos podem ser alterados por ações ou interferências naturais ou provocadas pelo homem (SPERLING, 2014).

De acordo com o artigo 3 - parágrafo III da Lei Federal 6938 de 1981 promulgada pela Casa Civil da Presidência da República e que dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, poluição é definida como a degradação da qualidade ambiental resultante de atividades que direta ou indiretamente:

- a) Prejudiquem a saúde, a segurança e o bem-estar da população;
- b) Criem condições adversas às atividades sociais e econômicas;
- c) Afetem desfavoravelmente a biota;
- d) Afetem as condições estéticas ou sanitárias do meio ambiente;
- e) Lancem matérias ou energia em desacordo com os padrões ambientais estabelecidos.

Segundo Braga et al. (2005), é importante distinguir o conceito de poluição do

de contaminação pois muitas vezes são indevidamente usados como sinônimos. De acordo com este autor, a contaminação pode ser entendida quando a concentração de alguma substância ou micro-organismo se encontra acima do nível natural para determinada área, podendo causar prejuízos aos seres vivos, mas não necessariamente ao ecossistema.

Os efeitos resultantes da introdução de poluentes no meio aquático dependem da natureza do poluente, do caminho percorrido pelo mesmo no meio e do uso que se faz do corpo de água contaminado (LIBÂNIO, 2010). Estes poluentes podem ser classificados de acordo com a sua natureza, os seus efeitos indesejáveis e os principais impactos causados pelo seu lançamento. Dentre os principais poluentes aquáticos podem ser destacados (BRAGA, 2005; JORDÃO E PESSOA, 2011):

- a) Compostos orgânicos biodegradáveis incluindo principalmente as proteínas, os carboidratos e as gorduras;
- b) Poluentes orgânicos recalcitrantes incluindo defensivos agrícolas, detergentes sintéticos além do petróleo e seus derivados;
- c) Metais que podem causar danos à saúde de acordo com a quantidade ingerida, toxicidade ou potenciais mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos como o cromo, mercúrio e chumbo;
- d) Nutrientes que, em excesso, podem gerar a proliferação exagerada de algas e micro-organismos;
- e) Organismos patogênicos incluindo bactérias, vírus, protozoários e helmintos oriundos de regiões com saneamento básico precário ou inexistente.

Os poluentes podem alcançar as águas superficiais e/ou subterrâneas através do lançamento direto, precipitação, escoamento pela superfície do solo ou infiltração. De acordo com a sua origem, a poluição dos corpos de água pode ocorrer de forma pontual ou difusa. As fontes pontuais são aquelas introduzidas por lançamentos individualizados como a descarga de efluentes industriais de uma fábrica em um determinado rio. Já as fontes difusas não apresentam um ponto específico de lançamento podendo ser exemplificada pelo carreamento de defensivos agrícolas pela lixiviação do solo. As identificações das origens e os controles destes últimos tipos de poluição são bem mais complexos (SUBTIL, 2012;

SPERLING, 2014).

Considerando o tipo de poluição, podem ser citadas as de origem natural ou antrópica. A poluição de origem natural tem como fatores principais a decomposição da vegetação, a erosão das margens e a salinização (dissolução de rochas e depósitos minerais), podendo ser agravada por atividades antrópicas como assoreamento e a eutrofização que aceleram estes fenômenos naturais. Como exemplo de poluição antrópica pode ser citado a agricultura cujos resíduos de defensivos agrícolas podem atingir os rios, lagos, aquíferos e oceanos. O lançamento de destes defensivos (pesticidas, herbicidas, fungicidas etc.) podem gerar sérias implicações sanitárias e problemas de toxicidade (BAIRD, 2011; JORDÃO E PESSOA, 2011).

### **2.3 Esgotos: características, contaminação e tratamentos**

Conforme Braga et al. (2005) e Jordão e Pessoa (2011), esgoto é o termo utilizado para caracterizar os despejos provenientes dos diversos usos da água como doméstico, comercial, industrial, agrícola, pluvial e sanitário. De acordo com os mesmos autores, alguns pesquisadores têm preferido empregar o termo águas residuais no lugar de esgoto. Esta tendência vem se acentuando, podendo ser citado como exemplo o emprego da sigla ETAR (Estação de Tratamento de Águas Residuárias) em substituição a ETE (Estação de Tratamento de Esgotos), o que se acha em desacordo com as recomendações da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

A poluição por águas urbanas servidas é formada pelos esgotos domésticos, industriais, pluviais e lodos das estações de tratamento de água. A composição quantitativa e qualitativa dos esgotos gerados em uma cidade ou região varia de acordo com os hábitos e as características socioeconômicas da população, da disponibilidade hídrica, do clima e das atividades desenvolvidas (BRAGA et al., 2005; ARAÚJO, 2011; SPERLING, 2014).

Os esgotos sanitários são formados principalmente pelos despejos domésticos ou domiciliares de edificações que possuem banheiros, lavanderias e cozinhas. Os esgotos industriais, por sua vez, são muito mais diversificados e apresentam características próprias em função do processo industrial empregado (JORDÃO E PESSOA, 2011; SPERLING, 2014).

Conforme a Norma Brasileira NBR 9648 (ABNT, 1986), esgoto sanitário é definido como qualquer despejo líquido constituído de esgotos domésticos e industriais, água de infiltração e contribuição pluvial parasitária. De acordo com esta mesma norma, são definidos:

- a) Esgoto doméstico: despejos líquidos resultantes do uso da água para higiene e necessidades fisiológicas humanas;
- b) Esgoto industrial: despejos líquidos resultantes dos processos industriais, respeitados os padrões de lançamento estabelecidos;
- c) Água de infiltração: proveniente do subsolo, indesejáveis ao sistema de tratamento e que penetra no mesmo através de canalizações;
- d) Contribuição pluvial parasitária: parcela do deflúvio superficial inevitavelmente absorvida pela rede de esgoto sanitário.

A característica dos esgotos é função do uso à qual a água foi submetida. Nas estações de tratamento destes efluentes, são analisados parâmetros físicos, químicos e biológicos para revelar o potencial poluidor do despejo e os tratamentos adequados ao mesmo (SPERLING, 2014). Segundo este mesmo autor, os esgotos domésticos apresentam em sua composição aproximadamente 99,9% de água e apenas 0,1% de materiais sólidos. Estes últimos podem ter natureza orgânica, inorgânica ou biológica (principalmente bactérias, protozoários e vírus). Dependendo de suas características, os sólidos podem estar dissolvidos ou emulsionados e, se esta pequena fração conferir características indesejáveis às águas servidas, acaba impondo a necessidade de tratamentos das mesmas.

Como citado pelos autores Jordão e Pessoa (2011), os esgotos de natureza doméstica contém principalmente águas de banho e lavagem de roupas e utensílios, urina e fezes, restos de comida (principalmente proteínas, carboidratos e lipídios), detergentes e outros produtos de uso sanitário. Cerca de 70% dos materiais sólidos são compostos orgânicos contendo carbono, hidrogênio, nitrogênio e fósforo (Quadro 1) e os 30% restantes são materiais inorgânicos como areia e poeiras variadas.

**Quadro 1. Composição média dos compostos orgânicos nos esgotos domésticos**

| Materiais                                                | Composição média (%) |
|----------------------------------------------------------|----------------------|
| Compostos nitrogenados<br>(principalmente proteínas)     | 40 – 60              |
| Carboidratos                                             | 25 – 50              |
| Lipídios                                                 | 5 – 10               |
| Surfactantes, compostos<br>fenólicos, desinfetantes etc. | < 0,5                |

Fonte: Jordão e Pessoa (2011)

Devido à escassez crescente de água a nível mundial, o uso cada vez mais eficiente e racional deste recurso estratégico vem se tornando necessário. Esta ação conservadora pode ser atingida através da reutilização da água, após seu primeiro uso, em atividades menos exigentes em termos da qualidade da água ou pelo retorno das águas residuais aos corpos receptores após tratamento adequado que garanta que a água reciclada se encontre sem alterações significativas de sua qualidade (MOTA, MANZANARES E SILVA, 2006).

O lançamento de esgotos sanitários não esterilizados é uma das formas mais comuns de poluição das áreas costeiras, podendo ocorrer por contribuições de cursos d'água, emissários submarinos e despejo de ETE. Os impactos ambientais podem ser associados a contaminação microbiológica, acréscimo de matéria orgânica e o enriquecimento por nutrientes, dentre outros, podendo causar eutrofização, deposição de resíduos sólidos nos sedimentos e aumento da turbidez. Comunidades bentônicas dominadas pelos corais são as mais prejudicadas pela turbidez devido à atividade fotossintetizante das zooxantelas simbiotes se comparadas com as comunidades planctônicas. A matéria orgânica excessiva favorece aumento na Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e Demanda Química de Oxigênio (DQO). A adição de carga orgânica excedente geralmente é acompanhada pelo desenvolvimento de micro-organismos exóticos, podendo gerar instabilidades nas comunidades, resultando na perda da biodiversidade (SANTANNA, 2013).

Estudos conduzidos pelos pesquisadores Braga e colaboradores (2000) avaliaram a poluição bacteriana e a eutrofização no Sistema Estuarino da Baixada Santista resultante do despejo de resíduos domésticos e industriais. Os resultados

demonstraram que elevadas concentrações de nutrientes dissolvidos (sais de amônio, nitratos, fosfatos e silicatos) e de coliformes totais e fecais nos ambientes marinhos rasos eutrofizados por influência antrópica apresentaram proliferação de macroalgas verdes que possibilitaram a sobrevivência de diversos micro-organismos patogênicos.

Diferentes tecnologias estão sendo atualmente disponibilizadas, sendo que praticamente todas elas seguem um mesmo fluxo comum que inclui (i) uma etapa preliminar de remoção de sólidos de grande porte e areia (filtração ou gradeamento) visando a proteção mecânica das linhas e equipamentos, (ii) um tratamento primário para a eliminação de materiais sedimentáveis em decantadores ou em tanques de flotação, (iii) uma etapa secundária geralmente microbiológica (anaeróbia ou aeróbia) para a remoção da carga orgânica e (iv) uma desinfecção final para a eliminação dos micro-organismos presentes a qual nem sempre é incluída nas instalações em função dos custos operacionais. Esta escolha passa pela avaliação de variáveis como nível de contaminação, destinação pós-tratamento, estimativa de custo operacional e espaço disponível, dentre outras. Estas tecnologias estão apresentadas a seguir, incluindo algumas de suas principais características operacionais (BORSOI et al., 2014).

a) Disposição no solo: sistema simples no qual as águas residuais são eliminadas por evaporação e/ou absorção pela vegetação de grandes áreas abertas. Parte do efluente infiltra no solo e o restante já tratado é recuperado na extremidade oposta do terreno que preferencialmente é inclinado. O custo é bastante reduzido com a desvantagem de gerar maus odores, insetos e vermes, além de apresentar risco de contaminação da vegetação, exposição dos operadores do sistema e infiltrações no lençol freático.

b) Lagoas de estabilização sem aeração: exigem áreas extensas para as lagoas nas quais ocorre processo aeróbio de depuração pela presença de plantas que oxigenam a água (Figura 2). Esta opção apresenta baixo custo de implantação e operação, mas o lodo gerado deve ser removido após um período variável de uso e adequadamente disposto. Sofre influência das variações atmosféricas (temperatura, ocorrência de chuvas e insolação), pode produzir maus odores e propiciar a proliferação de insetos.



**Figura 2: Vista aérea de lagoas de estabilização localizadas na cidade de Lins – SP (www.finep.gov.br/prosab/4\_esgoto\_usp.htm, 2005).**

c) Sistemas anaeróbios simplificados: baseiam-se na utilização de um reator anaeróbio no qual a matéria orgânica é degradada através de bactérias que permanecem dispersas ou suspensas no meio. Na parte superior do equipamento ocorre o acúmulo e recolhimento do gás gerado (constituído principalmente de metano) que pode ser utilizado como fonte de energia pouco poluente. Esta opção requer pequena área para instalação e tem custos de implantação e operação reduzidos. Podem produzir maus odores e não atingem altos níveis de redução de carga orgânica.

d) Lagoas anaeróbias: apresentam profundidades de até 4,5 metros, porém operam com áreas superficiais reduzidas. As bactérias anaeróbias degradam a matéria orgânica produzindo gases como o metano cuja captação é difícil em função da grande área aberta. São adequadas para esgotos com altos teores orgânicos (por exemplo, matadouros, curtumes e processamento de pescado), não se aplicando aos esgotos domésticos.

e) Lagoas de estabilização aeradas: o oxigênio é fornecido às bactérias aeróbias através de compressores que possuem linhas submersas de transporte e difusão do ar. A eficiência depende do tempo de retenção, da temperatura e das características do esgoto. O lodo gerado é sedimentado sendo removido através de uma lagoa secundária. Geralmente não gera maus odores, obtém alta eficiência na remoção da carga orgânica e não necessita grandes áreas.

f) Lodo ativado: bactérias aeróbias aglomeradas em colônias suspensas no meio

consomem o material orgânico formando uma biomassa que é retirada no equipamento decantador. O lodo decantado é retornado ao biodigestor por bombeamento para aumentar a eficiência do sistema. O oxigênio é fornecido por aeradores superficiais (agitadores) ou por tubulações no fundo do reator conectadas a um compressor. Podem operar de forma contínua ou intermitente e não produzem maus odores, insetos ou vermes. Não é necessária uma área grande para sua implantação (Figura 3), mas os custos de instalação e operação são maiores (presença de vários equipamentos mecânicos). O lodo produzido necessita ser inertizado antes do descarte.



**Figura 3: Instalações de unidade de lodo ativado (Saneamento.poli.ufrj.br, 2013).**

g) Filtros biológicos: o consumo da matéria orgânica é realizado por colônias de bactérias aderidas a suportes fixos (pedras ou materiais sintéticos) sendo que o esgoto flui através destas colônias que acabam absorvendo a carga orgânica para sua nutrição. A instalação é bastante simples com o uso de equipamentos pouco sofisticados e baratos, porém há a necessidade de tratamento do lodo produzido antes de sua disposição final. Entre os inconvenientes estão a dificuldade na limpeza e a possibilidade de proliferação de insetos.

h) Tratamento com oxigênio puro: muito semelhante ao sistema de lodo ativado, mas com altíssima eficiência pelo uso de oxigênio puro em vez de ar atmosférico que contém apenas 22% de oxigênio. Em comparação aos sistemas convencionais, elimina a carga orgânica em tempo reduzido, suporta altas cargas orgânicas, não produz maus odores, a produção de lodo é mínima e o custo de instalação é

reduzido. Como desvantagem, requer a existência de tanque criogênico para a estocagem do oxigênio puro na forma líquida.

Considerando-se o tratamento de esgotos na zona rural, a situação é ainda mais crítica uma vez que segundo a Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD 2003 – IBGE), cerca de 96% dos domicílios rurais não eram atendidos por rede coletora de esgoto sanitário nesta ocasião. Como citado por Almeida, Oliveira e Klieman (2007), alternativas sustentáveis deveriam ser incentivadas e utilizadas seguindo-se os critérios de reduzir o consumo dos recursos naturais e de energia, evitar ou minimizar a dispersão de substâncias tóxicas intensificando a reciclagem dos resíduos gerados e maximizar o uso de recursos renováveis prolongando a durabilidade dos produtos.

Conforme citado por Sabei e Bassetti (2013), levando-se em consideração a situação socioeconômica brasileira, a disseminação de projetos econômicos e de eficiência aceitável deveria ser incentivada. Diferentes alternativas que consideram estas duas premissas já foram descritas na literatura especializada, sendo que algumas delas encontram-se resumidas a seguir:

a) Banheiro seco: processo amplamente utilizado em áreas agrícolas de diferentes países desenvolvidos como Estados Unidos, Canadá, Suécia, Noruega, Inglaterra, Austrália e Nova Zelândia, apresentando-se como solução para áreas com déficit de água e de tratamento municipal. Os dejetos humanos são tratados e sanitizados por processo de compostagem, facilitando o armazenamento, o tratamento e o transporte para disposição final.

b) Escoamento superficial: aplicável em terrenos pouco permeáveis e que apresentem uma ligeira declividade. O esgoto é movimentado naturalmente para a parte baixa da área do tratamento sendo parte evaporada, a fração orgânica é eliminada por micro-organismos associados à vegetação e a fração tratada é coletada na base do declive.

c) Fossa séptica digestora: consiste em processo de tratamento biológico que ocorre em caixas enterradas seqüenciais (normalmente em número de três) nas quais o esgoto permanece em fermentação por cerca de um mês, sendo posteriormente

utilizado como adubo orgânico. O lodo produzido deve ser retirado com alguma frequência e adequadamente disposto.

d) Sistema de zona de raízes (“wetlands”): após passar pela fossa séptica (etapa necessária), o esgoto pré-tratado é lançado em área plantada utilizando-se tubulações perfuradas (Figura 4). As plantas são cultivadas sobre um filtro físico formado por brita/cascalho/areia e atuam absorvendo os compostos orgânicos e sais minerais, gerando o efluente tratado que é captado no fundo do filtro e distribuído.

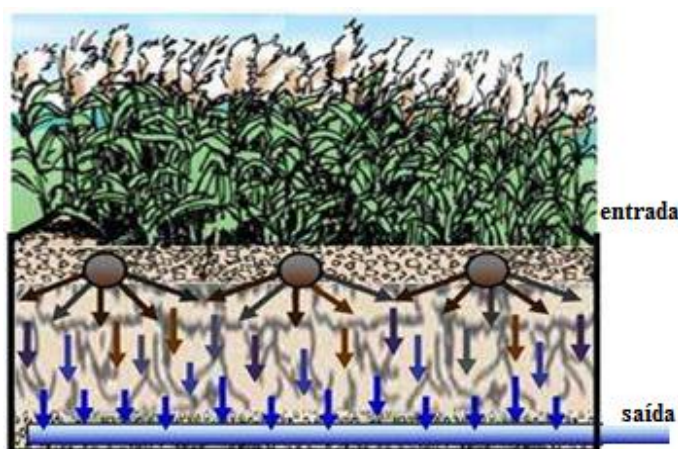


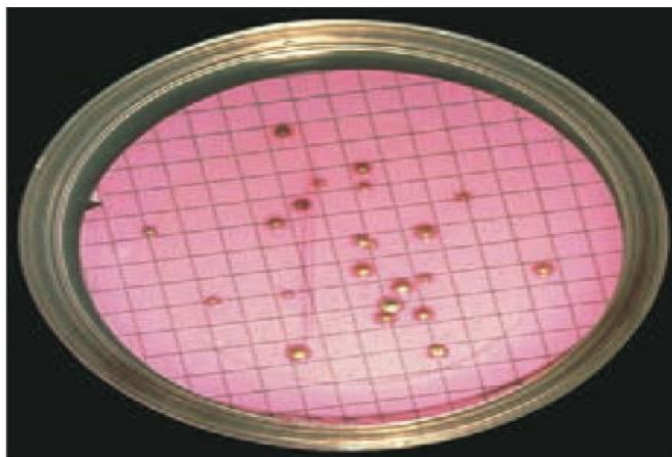
Figura 4: Tratamento por sistema de zona de raízes ([www.inicepg.univap.br/](http://www.inicepg.univap.br/) XIV INIC, 2010).

## 2.4 Doenças de veiculação hídrica

Até passado bastante recente, a disposição dos esgotos tratados ou não tratados era feita diretamente no meio ambiente (rios ou outros corpos de água), o que ocorria de forma impensada e irresponsável. Com o intenso crescimento demográfico que ocorreu principalmente após o século XIX, a capacidade de autodepuração natural dos corpos de água que dissimulavam os efeitos danosos destes lançamentos não tratados foi superada, colocando sob suspeita a filosofia segundo a qual “a solução para a contaminação é a diluição” (CHERNICHARO et al., 2001).

Conforme Tang (2014), um mililitro de esgoto doméstico pode conter entre  $10^5$  e  $10^6$  bactérias, vírus e protozoários. Apesar de que a maioria destes organismos apresenta papel benéfico na decomposição dos resíduos do esgoto, alguns podem apresentar caráter patogênico, criando condições de originar doenças variadas,

sendo uma ameaça à saúde pública da população exposta. Dentre as bactérias patogênicas frequentemente isoladas de esgotos geralmente são destacados os coliformes fecais (Figura 5) que se originam no intestino dos mamíferos e chegam aos esgotos através de suas fezes.



**Figura 5: Cultura de bactérias contendo coliformes fecais (Madigan, et al., 2010).**

Além dos coliformes fecais já citados, outros micro-organismos igualmente patogênicos podem ser frequentemente encontrados nos esgotos que não foram adequadamente tratados. Alguns destes organismos e suas patogenias podem ser vistos no Quadro 2.

**Quadro 2. Bactérias encontradas nos esgotos e algumas patogenias associadas**

| Bactéria                      | Algumas patogenias associadas                                               |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Coliformes fecais             | Diarreia, dores abdominais, desidratação, paralisia cerebral, encefalopatia |
| Salmonelas                    | Diarreia, dores abdominais, desidratação, febre tifoide                     |
| Shigelas                      | Disenteria, dor abdominal aguda, sangue nas fezes                           |
| Estreptococos                 | Erisipela, febre reumática, meningite, pneumonia                            |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Infecções respiratórias, urinárias e otites                                 |
| <i>Mycobacterium</i>          | Tuberculose, hanseníase, úlceras                                            |
| <i>Giardia lamblia</i>        | Giardíase, diarreia, inflamações                                            |

Fonte: adaptado de TANG (2014)

Devido à presença destes organismos, uma das etapas mais importantes durante o tratamento dos esgotos é sua desinfecção. O lançamento de esgotos não adequadamente tratados é uma das principais causas da ocorrência de doenças de veiculação hídrica. Esta possibilidade está presente nas áreas urbanas pela contaminação de corpos de água que são utilizados como fontes de captação para a produção de água potável e principalmente na área rural onde a contaminação do lençol aquífero acaba comprometendo a qualidade microbiológica de poços e nascentes que são as principais fontes de água para consumo humano (AMARAL et al., 2003).

Anteriormente à década de 1980, a disenteria e as febres tifóide e paratifóide contabilizavam a maioria dos casos de doenças de veiculação hídrica, sendo que a melhora dos processos de tratamento de esgotos, principalmente por cloração, apresentou resultados notáveis na redução destas ocorrências. Nas últimas décadas, no entanto, protozoários como o *Cryptosporidium ssp* e a *Giardia ssp* se destacaram como os principais agentes patogênicos associados à transmissão de doenças pela água, sendo que centenas de surtos epidêmicos foram mundialmente reportados com resultados desastrosos na área de saúde pública (FRANCO, 2007).

Conforme Chernicharo et al. (2001), os organismos patogênicos transmitidos pela água contaminada que oferecem maiores riscos à população humana são as bactérias, os vírus entéricos e os protozoários intestinais, todos presentes nos esgotos domésticos. Segundo estes autores, a introdução destes patógenos no organismo humano pode ocorrer por diversas vias (Quadro 3).

**Quadro 3. Vias de contaminação humana por patógenos presentes no esgoto**

| Via de contaminação | Causa                                                                           |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Direta              | Ingestão da água contaminada.                                                   |
| Direta com falha    | Ingestão de água tratada que apresentou alguma falha no sistema de tratamento.  |
| Alimentar           | Ingestão de alimentos contaminados por patógenos presentes na água contaminada. |
| Contato             | Penetração dérmica por contato do indivíduo com a água contaminada.             |

Fonte: adaptado de Chernicharo et al. (2001)

Segundo Canedo (2003), a fim de se oferecer à totalidade da população brasileira os serviços de água potável tratada e esgoto canalizado, a União deveria investir cerca de US\$ 40 bilhões até 2015. Comparando-se este investimento com o gasto anual de cerca de US\$ 3 bilhões só para o atendimento das doenças de veiculação hídrica pelo SUS (não computados os gastos de atendimentos em serviços privados, medicamentos e outras perdas como redução dos dias de trabalho e de produtividade), vê-se que esta ação de saúde pública é não só necessária, mas totalmente justificada inclusive considerando-se o fator econômico.

## **2.5 *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium***

### **a) *Escherichia coli***

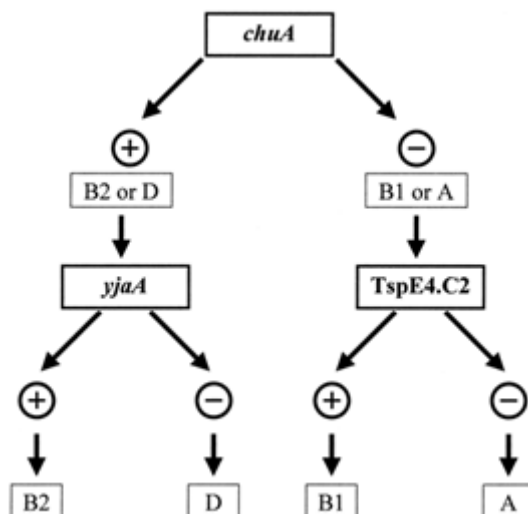
A *Escherichia coli* (ou simplesmente *E. coli*) é classificada taxonomicamente no Reino *Monera*, filo *Proteobacteria*, família *Enterobacteriaceae* e gênero *Escherichia*, tendo sido isolada pela primeira vez por Theodor Escherich em 1885. Trata-se de uma bactéria bastante comum no trato intestinal inclusive dos humanos, sendo bastante conhecida e estudada pela facilidade de manipulação em laboratório. Trata-se de um bacilo Gram negativo, com característica aero-anaeróbio facultativo, não esporulado, provido de flagelos para sua movimentação como visto na Figura 6 (GONÇALVES, 2011).



**Figura 6: Fotomicrografia da *E. coli* (www.doctortipster.com, 2014).**

É freqüentador habitual do intestino de vários animais, podendo causar

diarreia, infecções do trato urinário e meningite neonatal, dentre outras. Apresenta quatro principais grupos filogenéticos denominados A, B1, B2 e D (Figura 7), sendo que o grupo B2 e, em menor escala, o grupo D são os que se apresentam patogênicos (CLERMONT, BONACORSI e BINGEN, 2000).



**Figura 7:** Grupos filogenéticos do *E. coli*. O gene *chuA* codifica a proteína de membrana de 69 kDa envolvida no transporte do grupo heme, o gene *yjaA* codifica uma proteína produzida em resposta a presença de peróxido de hidrogênio e o gene *TspE4.C2* codifica uma proteína de função desconhecida. (CLERMONT, BONACORSI e BINGEN, 2000).

Como já mencionado, apenas alguns subgrupos de *E. coli* apresentam potencial para desenvolver patologias intestinais ou extra intestinais e esta característica é devida a mutações que foram classificadas de acordo com os mecanismos responsáveis pela mesma. Um destes subgrupos denominado STEC (“Shiga toxin-producing *E. coli*”) refere-se à variedade genética de alguns micro-organismos que se tornaram capazes de produzir pelo menos uma das citotoxinas de Shiga (“Shiga toxins”), assim denominadas por semelhança com as toxinas produzidas pelas *Shigellas*. Ruminantes e em particular o gado freqüentemente se apresentam contaminados por STEC, causando infecções nos humanos pelo consumo de sua carne contaminada ou pelo contato com água contendo esterco destes animais.

Os STECs são caracterizados bioquimicamente por vários métodos, sendo que a sorotipagem baseada no antígeno O (*Ohne*) é um dos mais utilizados. No Quadro 4 são exibidos alguns dos sorotipos mais comuns do *E. coli* e suas

típicas associações com patogenias (GILES, 2007).

**Quadro 4. Probabilidade de doenças causadas por alguns sorotipos de *E. coli***

| Sorotipo | Sorotipo                                        | Probabilidade | Frequência    |
|----------|-------------------------------------------------|---------------|---------------|
| A        | O157:H7, O157:NM                                | Alta          | Comum         |
| B        | O26:H11, O103:H2, O111:NM,<br>O121:H19, O145:NM | Moderada      | Incomum       |
| C        | O5:NM, O91:H21, O104:H21,<br>O113:H21, O121:NM  | Baixa         | Rara          |
| D        | O7:H4, O69:H11, O103:H25,<br>O113:H14, O117:H7  | Baixa         | Rara          |
| E        | O6:H34, O113:NM, O136:NM,<br>O143:H31, O156:NM  | Não implicado | Não implicado |

Fonte: adaptado de Giles (2007)

#### b) *Salmonella typhimurium*

A *Salmonella typhimurium* (ou *S. typhimurium*) é classificada no Reino Monera, filo *Proteobacteria*, classe *Gammaproteobacteria*, família *Enterobacteriaceae* e gênero *Salmonella*. As primeiras bactérias do gênero *Salmonella* foram identificadas em 1880 e isoladas em 1885 pelo veterinário Dr. Daniel E. Solomon em amostras de suínos doentes. Trata-se de um bacilo Gram negativo, aero-anaeróbio facultativo, que pode apresentar flagelos e que é capaz de provocar doenças em humanos e animais (MARTINS, 2010).

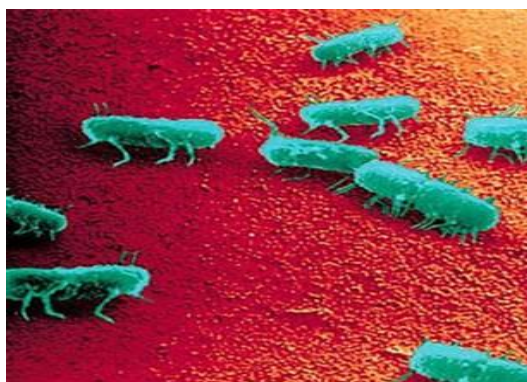


Figura 8: Micrografia eletrônica de *S. typhimurium* ([microbewiki.kenyon.edu/index.php/Salmonella\\_enterica\\_serovar\\_typhimurium](http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Salmonella_enterica_serovar_typhimurium), 2014).

A *S. typhimurium* apresenta alta patogenia para gastroenterite, sendo considerada um sério problema de saúde pública. Tem sido freqüentemente associada a infecções nos lactentes assim como em episódios intra-hospitalares. Pela sua capacidade de se difundir para o sangue, pode manifestar diferentes patologias de origem gastrointestinal, respiratória e neurológica, assim como combinações destas, sendo destacada a gastroenterite, a septicemia, a meningite e a broncopneumonia que podem levar ao óbito com freqüência significativa. Apresenta adicionalmente a possibilidade de causar alterações radiológicas. Por ser um micro-organismo difundido por veiculação hídrica, suas manifestações estão bastante associadas ao grau de desenvolvimento do local considerado (GRISI et al., 1983).

A salmonelose já foi documentada em humanos e em praticamente todos os animais (bovinos, suínos e aves), tendo sido citados mais de 2.000 sorotipos de salmonelas transmissíveis ao homem. A *S. typhimurium* possui três tipos de antígenos com interesse para o diagnóstico que são O, H e Vi. Conforme a Organização Mundial de Saúde, a salmonelose está dividida em febres tifóideas ou paratifóideas (septicemia sem enterite ou portador sadio) e as infecções entéricas. O período de incubação normalmente é de 5 a 72 horas nas infecções entéricas e de 7 a 21 dias para febre tifóide. A mortalidade média é de 4,1% sendo 5,8% em crianças, 2,0% em adultos e 15,0% em idosos acima de 50 anos. Os sintomas incluem náuseas, vômitos, cólica abdominal, febre, cefaléia e diarréia intensa. As complicações mais comuns incluem colite, colecistite, endocardite, miocardite, meningite, síndrome reumatóide, pancreatite, abscessos esplênicos, apendicite e septicemia (PINTO, 2000).

A transmissão da *Salmonella* geralmente ocorre por via oral (consumo de alimentos ou água contaminados), mas há relatos de contaminação pelas membranas mucosas e pelo trato respiratório superior. Na ocorrência entérica, ocorre a colonização do intestino distal e início do cólon sendo que peristaltismo reduzido e desequilíbrios na flora intestinal podem contribuir para a instalação deste micro-organismo. A dose infectante é de  $10^5$  a  $10^8$  células, valores estes que variam largamente em função do sorotipo do micro-organismo, da sensibilidade do hospedeiro no momento do contato e da forma de veiculação. Em termos epidemiológicos, as salmonelas são diferenciadas em três tipos: as sem preferência de hospedeiro, as que afetam apenas os humanos e as que necessitam um tipo

específico de animal (MARTINS, 2010).

## 2.6 Agentes para tratamento de esgotos domiciliares

As primeiras associações da qualidade da água com a transmissão de doenças remontam ao final da década de 1840. Com o desenvolvimento dos equipamentos de microscopia, na segunda metade do século XIX foi confirmado que diversos micro-organismos como bactérias e vírus estavam associados à propagação de diferentes doenças. Deve ser considerado que o acelerado crescimento populacional a nível global acabou reduzindo a oferta de água de boa qualidade para o abastecimento público fazendo-se imperativo o desenvolvimento de novas tecnologias para proteger as reservas existentes e para produzir água de qualidade compatível com as necessidades humanas. No início do século 21 a escassez ou falta de água afeta mais que 40% da população mundial, por razões políticas, econômicas e climáticas (RIBEIRO, 2001; BRITO E RANGEL, 2008).

O principal objetivo da etapa de desinfecção de águas residuais é atuar na inativação e/ou destruição dos micro-organismos patogênicos presentes nas mesmas. Podem ser utilizados diferentes agentes físicos ou químicos para proteger o homem das doenças de veiculação hídrica. A primeira referência histórica do uso de um desinfetante menciona Homero em *A Odisséia* (por volta de 800 a.C.), na qual foi citado o uso do dióxido de enxofre que ainda hoje é utilizado em frutas secas, sucos de frutas e vinhos. Com seu trabalho criterioso, Pasteur concluiu que várias doenças infecciosas estão associadas a diferentes micro-organismos, vindo a desenvolver a técnica que até hoje é utilizada e mundialmente conhecida como pasteurização (ALVARENGA, 1998).

Em revisão efetuada por Chernicharo et al. (2001) estão discutidos alguns dos aspectos cinéticos do processo de desinfecção. Como já publicado em literatura especializada, este processo ocorre por reação bimolecular de primeira ordem que pode ser representado pela equação 1

$$dN / dt = -KN \quad (\text{equação 1})$$

na qual a redução da concentração de micro-organismos presentes em relação

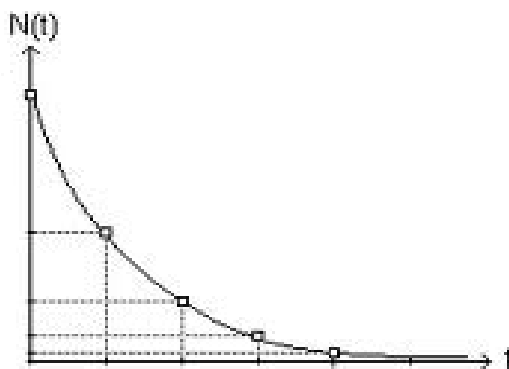
ao tempo de desinfecção ( $dN / dt$ ) depende da constante da velocidade de esterilização ( $K$ ) e da população dos micro-organismos ( $N$ ). Ao se integrar a equação 1 entre os limites de tempo  $0 \rightarrow t$  e de população  $N_0 \rightarrow N$ , obtém-se a equação 2

$$N / N_0 = \exp (-Kt) \quad (\text{equação 2})$$

a qual é válida apenas para situações bem definidas como populações homogêneas de micro-organismos, distribuição homogênea de micro-organismos e agente desinfetante no meio estudado e concentração do agente desinfetante constante ao longo do tempo do ensaio. A fim de evitar o uso de equação exponencial, é possível se aplicar o logaritmo neperiano (base  $e$ ) nesta equação e após rearranjo algébrico, obter a equação 3

$$\ln N = \ln N_0 - Kt \quad (\text{equação 3})$$

Na qual o número de micro-organismos presentes após o processo de desinfecção ( $N$ ) é igual ao número de micro-organismos existentes antes deste tratamento ( $N_0$ ) subtraído do fator  $Kt$  que é o produto da constante da velocidade de esterilização ( $K$ ) pelo tempo de desinfecção ( $t$ ). A representação gráfica desta equação pode ser vista na Figura 9.



**Figura 9:** Curva logarítmica de desinfecção de micro-organismos ([www.profpc.com.br](http://www.profpc.com.br), 2013)

Estes mesmos autores discutiram as principais características de alguns dos agentes desinfetantes mais utilizados, sendo que estas informações estão

resumidas a seguir (CHERNICHARO et al., 2001).

#### a) Cloro

A primeira utilização historicamente registrada deste agente foi em 1831 durante a epidemia européia de cólera. Em 1854, a Inglaterra reconheceu a aplicabilidade desta substância para o tratamento de esgotos e a mesma passou a ser rotineiramente utilizada a partir de 1884. Desde então, o principal uso da cloração tem a finalidade de controlar os organismos patogênicos, principalmente as do grupo dos coliformes. Suas principais formas de uso são o cloro gasoso ( $\text{Cl}_2$ ), os hipocloritos de sódio ( $\text{NaClO}$ ) ou de cálcio ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) e o dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ). O  $\text{Cl}_2$  é um gás que se liquefaz sob pressão, o que facilita seu transporte e armazenagem. Ao reagir com a água produz ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ) que é o principal composto ativo e ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ). Como o cloro gasoso apresenta enormes riscos ao ser estocado em centros urbanos (alta toxicidade), as formas preferidas de uso são os hipocloritos. O  $\text{NaClO}$  é geralmente utilizado na forma de solução com concentração entre 12 e 15 % de cloro disponível mas apresenta a desvantagem de se degradar pela exposição à luz solar e a temperaturas acima de 25 °C. O  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  é mais estável sob o ponto de vista de estocagem, perdendo apenas 0,01 % do seu teor ativo por dia quando estocado na forma sólida. Já o  $\text{ClO}_2$  deve ser preparado no local de uso uma vez que é altamente reativo, podendo reagir vigorosamente na presença de agentes redutores. Todos os compostos esterilizantes do cloro apresentam ação residual (efeito desinfetante após o uso), entretanto podem formar diferentes cloraminas como  $\text{NH}_2\text{Cl}$  (primária),  $\text{NHCl}_2$  (secundária) e  $\text{NCl}_3$  (terciária) ao reagir com compostos nitrogenados fartamente presentes nos esgotos. As cloraminas são tóxicas e apresentam odor pungente e desagradável. Também podem ser formados outros compostos clorados como os trihalometanos que são potencialmente carcinogênicos. Portanto, a utilização do cloro deve ser bem controlada (BAIRD, 2011; SPERLING, 2014).

#### b) Radiação ultravioleta

As primeiras experiências envolvendo radiação ultravioleta (UV) na

desinfecção de esgotos remontam a 1887, mas somente em 1975 ficou demonstrada a possibilidade técnica de se utilizar este agente. Trata-se de um fenômeno físico no qual a radiação altera ou destrói o DNA das células, interrompendo os seus processos de reprodução. Desta forma, a radiação UV apresenta ação desinfetante muito mais por inativação do que por extermínio. Os comprimentos de onda mais efetivos encontram-se entre 255 e 260 nm sendo possível utilizar lâmpadas de mercúrio de baixa pressão que emitem radiações na faixa de 254 nm. Este agente desinfetante (Figura 9) tem a vantagem de não adicionar produtos químicos indesejáveis à água, mas o mesmo não apresenta efeito residual (a desinfecção só ocorre na estação de tratamento durante a operação da lâmpada de UV).



**Figura 10: Esterilizador por radiação UV (<http://joysunmachinery.es/2-UV-sterilizer.html>, 2014)**

### c) Ozônio

As primeiras experiências com este gás de fórmula molecular  $O_3$  ocorreram em 1906 na França. Este produto age na membrana citoplasmática, nos sistemas enzimáticos e ataca os ácidos nucleicos com efeitos devastadores sobre os micro-organismos. Tem a vantagem de agir efetivamente sobre os vírus, danificando proteínas celulares e ácidos nucleicos. A presença de compostos orgânicos e certos minerais reduzem a estabilidade do  $O_3$ , causando um maior consumo deste desinfetante se comparado a água pura contendo apenas os micro-organismos. Os processos mais utilizados para o uso deste agente são os tanques de contato, as câmaras de difusão de bolhas, os reatores com injeção de  $O_3$ , os reatores tipo U e as linhas com misturadores estáticos. O

O<sub>3</sub> é prejudicial ao meio ambiente e concentrações acima de 0,3 ppm já são agressivas às vias respiratórias e a mucosa ocular. Exposições de longas durações mesmo a baixas concentrações podem causar redução da visão noturna, cansaço e perda da coordenação motora.

#### d) Peróxido de hidrogênio

Conforme Mattos et al. (2003), o peróxido de hidrogênio é um poderoso oxidante ( $E^0 = 1,77$  volt para a reação  $\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$ ) e muito versátil, superior ao cloro, dióxido de cloro e permanganato de potássio, como tal, pode ser incluído nos Processos Oxidativos Avançados (POA) que são eficazes no tratamento de águas residuais. O peróxido de hidrogênio é de fácil manipulação e tem uma ampla área de aplicações. Sua capacidade de gerar radicais hidroxilas ( $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \cdot\text{OH}$ ) que é altamente oxidante tem a propriedade de reagir com várias biomoléculas o que o qualifica como agente esterilizante por inativar e/ou destruir moléculas essenciais aos micro-organismos. Pelos fatos citados, a utilização do  $\text{H}_2\text{O}_2$  para o tratamento de esgotos em países desenvolvidos já ocorre a mais de 35 anos.

Segundo Penna (2006) o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é empregado como esterilizante químico de alto nível para artigos termossensíveis. Este agente apresenta amplo espectro de ação e rápida eficácia sobre bactérias Gram positivas e negativas, bacilos da tuberculose, vírus e fungos. Este autor, destaca que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é metabólito natural em muitos micro-organismos e quando decomposto resulta em oxigênio molecular e água. É usado em diferentes formulações e a atividade selecionada contra algum microrganismo definido ocorre simplesmente por ajuste das condições de reação como pH, temperatura, tempo de reação, entre outros.

Em mananciais, lagos e represas é aplicado diretamente para o controle e inativação de microalgas, com a finalidade de impedir a geração de sabores e odores desagradáveis à água potável. Nas estações de tratamento de água pode ser utilizado na etapa de pré-oxidação de modo a facilitar a remoção de impurezas suspensas ou dissolvidas, diminuindo a carga de cloro aplicado no tratamento. Apresenta a vantagem de se decompor totalmente em água, não gerando qualquer nova substância com características eventualmente tóxicas como é o

caso do cloro. No entanto, seu poder residual é bastante limitado. O processo de oxidação do peróxido de hidrogênio é, atualmente, usado de forma combinada em sistemas catalíticos, uma vez que sua ação pode ser potencializada (SPERLING, 2014).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Realizar estudo comparativo utilizando hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio para o tratamento bacteriológico de esgotos domiciliares, tomando como modelo as bactérias *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- a) Estudar o efeito dose dependente do hipoclorito de sódio sobre as curvas de crescimento das cepas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), avaliando a velocidade exponencial e tempo de latência;
- b) Efetuar os mesmos ensaios utilizando peróxido de hidrogênio;
- c) Determinar a concentração de inibição de crescimento (efeito bacteriostático) ou a concentração letal (efeito bactericida) para cada micro-organismo em função do agente utilizado.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

As bactérias *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* foram escolhidas para realizar este estudo por serem representantes de micro-organismos frequentemente encontrados nos esgotos. Estas bactérias são amplamente descritas na literatura e apresentam muitos estudos publicados, o que facilita correlações. Foram utilizadas cepas (linhagens) padrão para que os resultados possam ser reproduzidos.

a) A matriz da *Escherichia coli* (cepa distribuída pela American Type Culture Collection ATCC-25922) foi adquirida da Mogi Glass Artigos para Laboratório Ltda.;

b) A matriz da *Salmonella typhimurium* (cepa distribuída pela American Type Culture Collection ATCC-14028) foi adquirida do mesmo fornecedor.

### 4.2 Metodologia analítica

a) Preparo das culturas iniciais e placas de cultura dos micro-organismos

Para a cultura inicial de *S. typhimurium*, foram dissolvidos 30 g de caldo de soja e caseína (Soyabean Casein Digest Medium, Himedia Laboratório Ltda.) em 1000 mL de água destilada (como recomendado pela ATCC) em um balão de fundo chato. Este caldo foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos e a seguir inoculado com um disco de *S. typhimurium*, mantendo em incubação por um período de 24 horas a  $37 \pm 2$  °C (Figura 11).

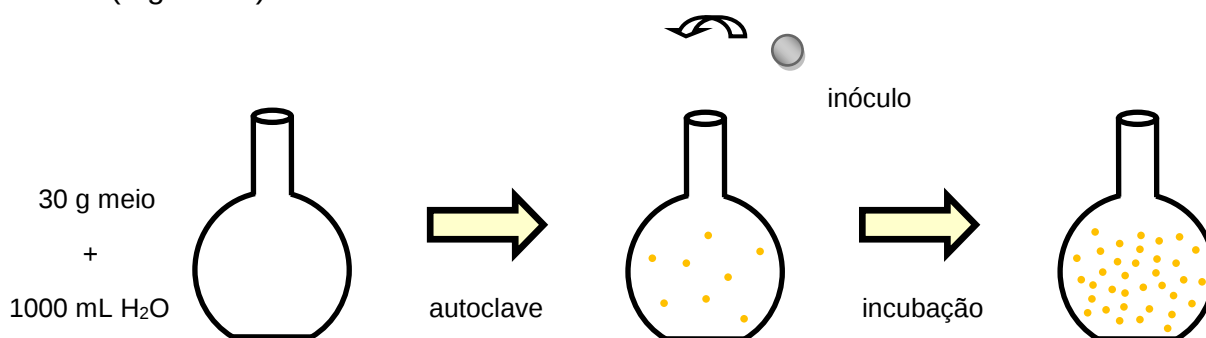
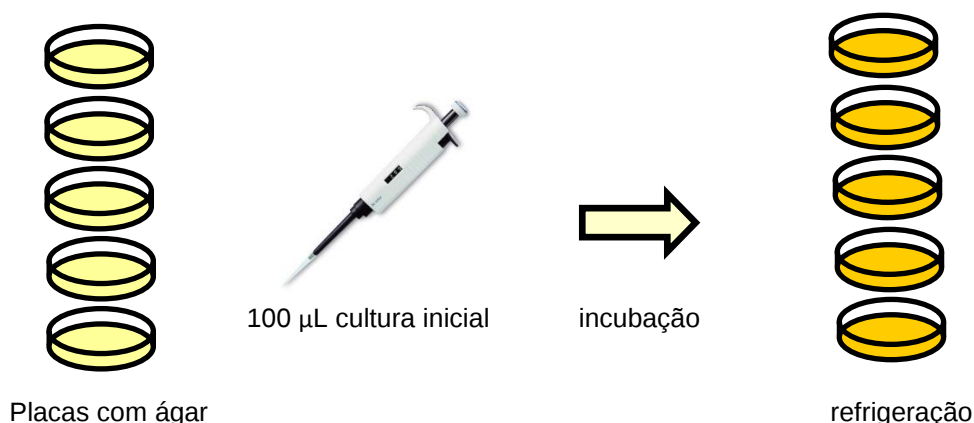


Figura 11: Preparo da cultura inicial de *S. typhimurium*.

Após este período, foram preparadas cinco placas de Petri utilizando agar triptona de soja (Soyabean Casein Digest Agar, Himedia Laboratório Ltda.) na concentração de 40 g de agar em 1000 mL de água destilada. Cada placa recebeu 100  $\mu$ L da cultura inicial com auxílio de uma micropipeta, sendo que esta amostra foi espalhada utilizando-se uma alça de Drigalsky. Após a incubação por 24 horas estas placas foram estocadas a -20 °C até o momento do uso (Figura 12).



**Figura 12: Preparo das placas de cultura de *S. typhimurium*.**

Para a cultura inicial de *E. coli*, foram dissolvidos 8 gramas de caldo nutriente (Nutrient Broth, Neogen Corporation) em 1000 mL de água destilada (como recomendado pela ATCC) utilizando-se um balão de fundo chato. Este caldo foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos e a seguir inoculado com um disco de *E. coli*, permanecendo em incubação por 24 horas em estufa a  $37 \pm 2$  °C (procedimento igual à Figura 11 com alteração do meio e do micro-organismo).

Após este período, foram preparadas cinco placas de Petri utilizando ágar nutriente (Neogen Corporation) na concentração de 23 g em 1000 mL de água destilada. Cada placa recebeu 100  $\mu$ L da cultura inicial com auxílio de uma micropipeta, sendo que esta amostra foi espalhada utilizando-se uma alça de Drigalsky. Após a incubação por 24 horas estas placas foram estocadas a -20 °C até o momento do uso (procedimento igual à Figura 12 com alteração do micro-organismo).

#### b) Preparo das culturas mãe dos micro-organismos

Na véspera dos testes foram preparadas as culturas mãe transferindo-se três alçadas de 10  $\mu$ L (alça de platina calibrada) das placas de cultura para um balão de

fundo chato com capacidade de 1000 mL contendo os respectivos meios de crescimento (caldo de soja e caseína para a *S. typhimurium* e caldo nutriente para *E. coli* previamente autoclavados pelo procedimento descrito acima). Estas culturas mãe foram mantidas em estufa por 24 horas a  $37 \pm 2$  °C para o crescimento dos micro-organismos (Figura 13).



**Figura 13: Preparo da cultura mãe**

### c) Ensaios de inibição de crescimento

Estes ensaios foram realizados conforme descrito por Hébrard et al. (2009) com adaptações. Basicamente, para a realização de cada um dos ensaios com *E. coli* ou *S. typhimurium* foram utilizados seis Erlenmeyers de 500 mL contendo 250 mL do meio líquido adequado e 1000 µL da respectiva cultura mãe. Três destes frascos foram designados “controle” e os restantes foram designados “tratamento” aos quais foram adicionadas quantidades variáveis de cada um dos agentes inibidores (hipoclorito de sódio ou peróxido de hidrogênio) as quais foram definidas ao longo dos ensaios. As densidades ópticas iniciais (tempo de teste igual a zero) foram medidas por espectrofotometria visível em 600 nm, utilizando um espectrofotômetro marca Analyzer (modelo 800M). Todos os frascos foram transferidos para uma estufa a  $37 \pm 2$  °C por um intervalo de tempo igual a uma hora após o qual foram realizadas novas leituras espectrais. Esta rotina foi repetida até completar o período do teste que variou em função do micro-organismo e do agente. Terminados os

testes, as amostras foram descartadas após esterilização por autoclavagem a 121 °C durante 30 minutos. Todas as operações envolvendo os micro-organismos foram realizadas em capela de fluxo laminar vertical marca Pachane modelo PA 300 (Figura 14).



**Figura 14: Teste de inibição realizado em capela de fluxo laminar.**

d) Determinação da concentração das soluções de peróxido de hidrogênio

Considerando-se que o peróxido de hidrogênio é uma substância instável, a concentração exata das soluções utilizadas nos testes de esterilização foi determinada por iodometria seguindo a metodologia descrita por Ohlweiler (1981) com modificações. Para o preparo destas soluções foi utilizado peróxido de hidrogênio P.A. (aproximadamente 35% v/v) sendo preparada uma diluição intermediária de aproximadamente 5% (v/v) sendo que para determinar a concentração exata desta diluição foi transferida uma alíquota de 1,0 mL da mesma para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de água destilada. A seguir foi adicionado 1 g de iodeto de potássio (KI), 5 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2N e 5 gotas de solução 3% (m/v) de molibdato de amônio [(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MoO<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O] que atua como catalisador. Em seguida, a amostra foi titulada com tiosulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 0,1N até coloração amarelo claro. Neste ponto foi feita a adição de 10 gotas de solução indicadora de amido (1% p/v) gerando coloração azul escuro e continuada a titulação até se obter uma solução incolor. A concentração do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é determinada pela equação abaixo:

$$C \text{ (mg/L)} = \frac{N_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \times V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \times 1,7}{V_{\text{H}_2\text{O}_2}}$$

onde C é a concentração do peróxido de hidrogênio (mg/L),  $N_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$  é a normalidade da solução de tiosulfato de sódio,  $V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$  é o volume da solução de tiosulfato de sódio (mL) utilizada na titulação,  $V_{\text{H}_2\text{O}_2}$  é o volume da amostra de peróxido de hidrogênio (mL) e 1,7 é o fator de massa do peróxido de hidrogênio. Utilizando a diluição intermediária foram preparadas as soluções de teste (entre 5 e 200 mg/L) pela adição de água destilada.

#### e) Determinação da concentração das soluções de hipoclorito de sódio

Como o hipoclorito de sódio também é uma substância instável, sua concentração exata foi determinada por iodometria conforme Bassett et al. (1981) com modificações. Para o preparo destas soluções foi utilizado hipoclorito de sódio P.A. (aproximadamente 10% m/v) sendo preparada uma diluição intermediária de aproximadamente 5% (v/v) sendo que para determinar a concentração exata desta diluição intermediária foi transferida uma alíquota de 1,0 mL da mesma para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de água destilada. A seguir foi adicionado 1 g de KI e 5 mL de ácido acético glacial ( $\text{H}_3\text{C}-\text{COOH}$ ). A seguir, a amostra foi titulada com  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,1N até coloração amarelo claro. Neste ponto foi feita a adição de 10 gotas de solução indicadora de amido (1% p/v) produzindo coloração azul escuro e continuada a titulação até se obter uma solução incolor. A concentração do NaClO é determinada pela equação abaixo:

$$C \text{ (mg/L)} = \frac{N_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \times V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \times 5,15}{V_{\text{NaClO}}}$$

onde C é a concentração do hipoclorito de sódio (mg/L),  $N_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$  é a normalidade da solução de tiosulfato de sódio,  $V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$  é o volume da solução de tiosulfato de sódio (mL) utilizada na titulação,  $V_{\text{NaClO}}$  é o volume da amostra de hipoclorito de sódio (mL) e 5,15 é o fator de massa do hipoclorito de sódio. Utilizando esta diluição intermediária, foram preparadas por diluição as soluções de teste entre (5 e 200 mg/L).

### 4.3 Tratamento estatístico

As médias, os desvios-padrão, as curvas e a aplicação da correlação de

Pearson foram obtidos utilizando-se o programa Microsoft Excel® for Windows® versão 2007. Todos os testes foram realizados em triplicata e os valores reportados refletem as médias  $\pm$  desvio-padrão ( $m \pm dp$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 *S. typhimurium*: tratamento com peróxido de hidrogênio

Inicialmente foram realizados testes para se avaliar a sensibilidade da *S. typhimurium* em relação ao peróxido de hidrogênio. Como não foram encontrados valores de referência na literatura consultada, foi realizado um teste piloto com 10 mg/L deste agente para se avaliar o comportamento. Conforme os itens 4.a a 4.c, foram preparadas 3 amostras sem a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (controles C1, C2 e C3) e 3 amostras com a adição de 10 mg/L deste agente (tratamentos TR1, TR2 e TR3), resultando em um gráfico com 6 curvas como visto a seguir (Figura 15).

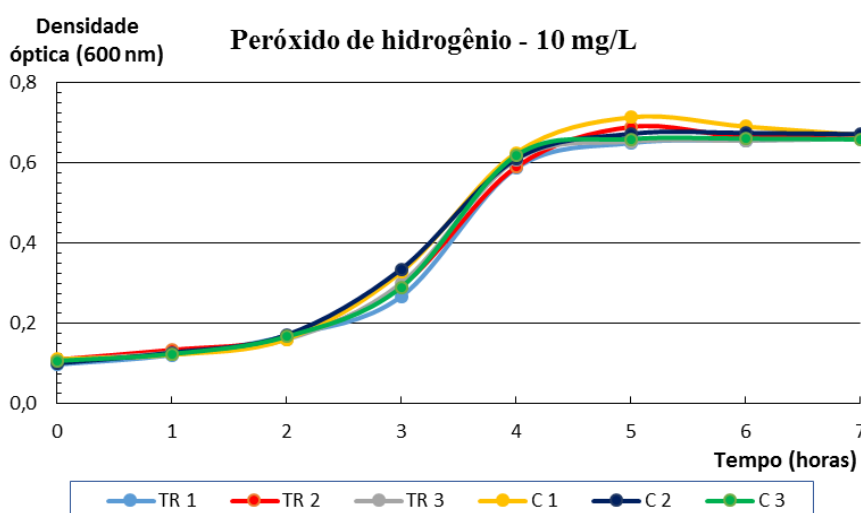


Figura 15: Teste com *S. typhimurium* (C = controle, TR = tratamento com 10 mg/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Uma vez obtido este gráfico que apresentou um período de ensaio igual a 7 horas o qual foi padronizado para o estudo envolvendo *S. typhimurium* e peróxido de hidrogênio, verificou-se a necessidade de tornar a interpretação dos resultados mais objetiva.

A fim de se obter valores mais confiáveis e representativos além de facilitar a interpretação dos dados experimentais, foram feitas as médias das 3 curvas de controles gerando a curva C e dos 3 tratamentos que resultou na curva TR. Desta forma, a Figura 16, vista a seguir, expressa os valores médios para a condição mencionada.

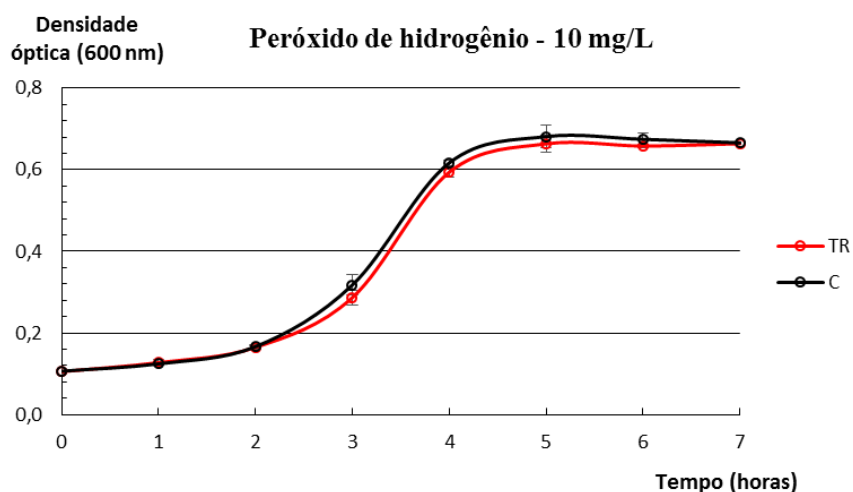


Figura 16: Teste com *S. typhimurium* (C = controle, TR = tratamento com 10 mg/L de  $H_2O_2$ ), valores médios ( $n = 3$ ).

Como pode ser observado na Figura 16, as curvas médias do controle e do tratamento mostraram perfis bastante semelhantes, sugerindo que a concentração utilizada do agente inibidor (10 mg/L) foi insuficiente para causar qualquer efeito mensurável na bactéria *S. typhimurium*. Face aos resultados obtidos, foi decidido aumentar a concentração do  $H_2O_2$  para 50 mg/L para a verificação do efeito. Novamente utilizando os itens 4.a a 4.c, foram preparados 3 controles e 3 tratamentos que geraram 6 curvas. Como o gráfico de médias é mais significativo para a análise dos resultados, o mesmo para 50 mg/L de  $H_2O_2$  está representado na Figura 17.

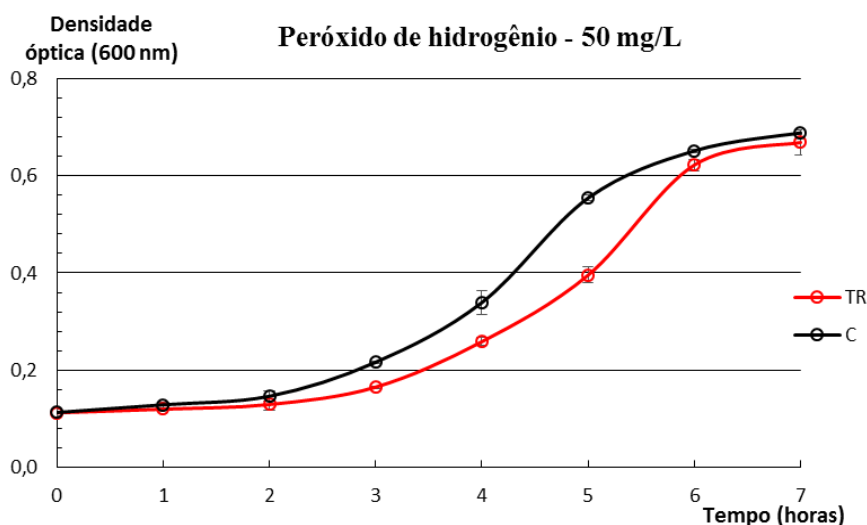
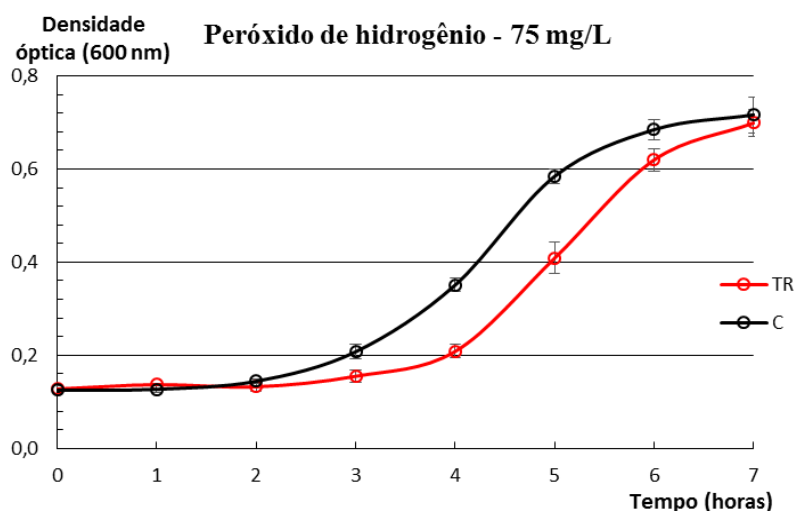


Figura 17: Teste com *S. typhimurium* (C = controle, TR = tratamento com 50 mg/L de  $H_2O_2$ ), valores médios ( $n = 3$ ).

Na Figura 17 já é possível observar um pequeno atraso da fase exponencial de crescimento da *S. typhimurium* devido ao aumento da etapa de latência (lag) quando esta bactéria foi exposta à concentração de 50 mg/L de  $H_2O_2$ . Nota-se ainda que a densidade óptica das curvas controle e tratamento praticamente se sobrepõem a partir de 6 horas de teste, sugerindo que a concentração utilizada apenas resultou em efeito de inibição temporária.

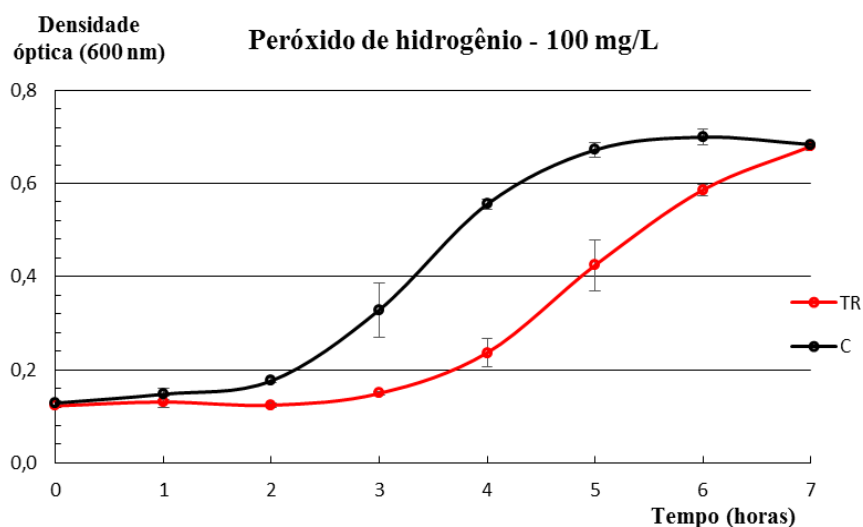
Em função das conclusões obtidas no teste anterior, a concentração foi aumentada para 75 mg/L de  $H_2O_2$ . Pela plotagem dos resultados médios deste novo teste (Figura 18) pode ser observado que os fatos já citados para 50 mg/L foram acentuados, aumentando o atraso na etapa de crescimento da bactéria. Novamente após 7 horas de ensaio observou-se que ocorreu sobreposição quase coincidente das curvas, sugerindo que a concentração de  $H_2O_2$  ainda está resultando em efeito temporário.



**Figura 18:** Teste com *S. typhimurium* (C = controle, TR = tratamento com 75 mg/L de  $H_2O_2$ ), valores médios ( $n = 3$ ).

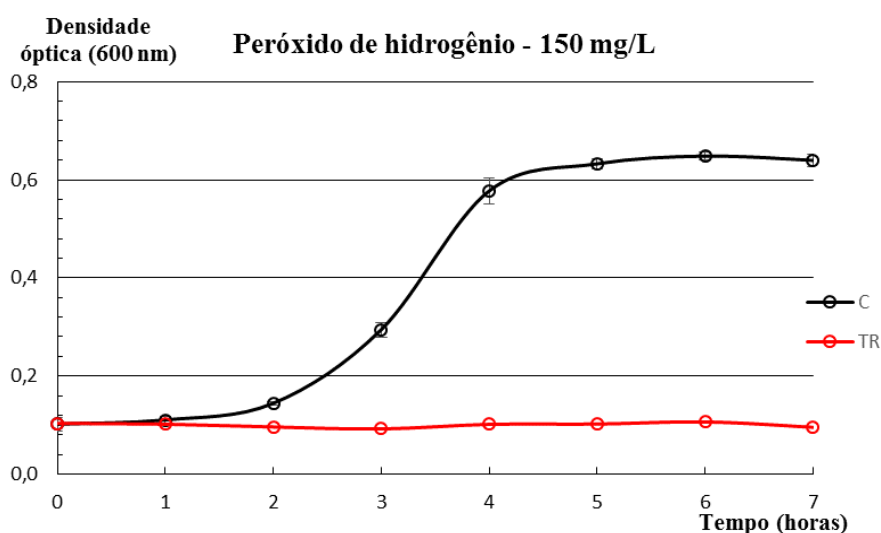
Na continuação do estudo, a concentração foi aumentada para 100 mg/L de  $H_2O_2$ . Novamente foi observado um aumento do tempo de latência, causando uma maior demora para se iniciar a fase exponencial. Como nos testes anteriores, ao final do período de teste (7 horas) observou-se a tendência de superposição dos valores de densidade óptica das amostras de controle e de tratamento, sugerindo que o efeito do  $H_2O_2$  nesta concentração ainda é transitório (Figura 19). Desta forma, o objetivo deste estudo ainda não foi atingido, sendo necessária uma

concentração superior aos valores até então avaliados.



**Figura 19:** Teste com *S. typhimurium* (C = controle, TR = tratamento com 100 mg/L de  $H_2O_2$ ), valores médios ( $n = 3$ ).

Uma vez mais optou-se pela elevação da concentração do agente inibidor, atingindo neste teste o valor de 150 mg/L. Diferentemente dos testes anteriores, não houve nenhum crescimento das bactérias expostas ao  $H_2O_2$  até o período padronizado de 7 horas. (Figura 20)



**Figura 20:** Teste com *S. typhimurium* (C = controle, TR = tratamento com 150 mg/L de  $H_2O_2$ ), valores médios ( $n = 3$ ).

A fim de se obter mais informações sobre o mecanismo de inibição de crescimento, este ensaio foi prolongado até 24 horas observando-se que a média

das densidades ópticas dos controles apresentou apenas um pequeno aumento pois o crescimento já estava limitado pelos nutrientes do meio de cultura (de 0,640 UA após 7 horas para 0,682 UA após 24 horas). Por outro lado, a média das densidades ópticas dos tratamentos se manteve na faixa próxima a 0,100 UA, indicando que nenhum crescimento foi observado mesmo após este longo período.

Na sétima hora de incubação foi feita a repicagem dos cultivos TR transferindo-se 1 mL de cada teste em andamento para um Erlenmeyer contendo 250 mL de meio de cultura estéril isento do agente inibidor. Após 24 horas de observação, não se detectou aumento da DO, sendo possível concluir que a concentração de 150 mg/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exerceu efeito bactericida sobre a espécie *S. typhimurium*. Como a finalidade desta repicagem foi verificar a viabilidade dos micro-organismos após exposição ao agente inibidor, não foi realizada a repicagem das amostras C.

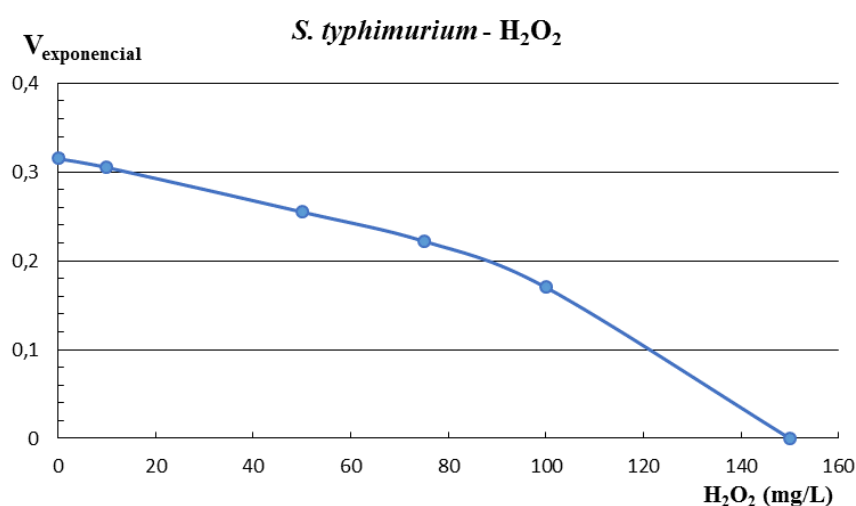
Após 7 horas de teste do TR, também foi analisada a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente no meio de crescimento conforme descrito no item 4.2.d, sendo que este agente inibidor não foi mais detectado. Este fato já era esperado pois o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é uma substância oxidante forte que apresenta baixa estabilidade. Mesma após a degradação total do agente utilizado, não foi observado nenhum crescimento nas amostras TR pois a ação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi bactericida.

Conforme Hérbrard et al. (2009), Madigan et al. (2010), Zhou et al. (2011) e Li et al. (2014), dois parâmetros bastante utilizados em estudos de crescimento bacteriano são o tempo de latência (lag) e a velocidade exponencial ( $V_{exp}$ ). O primeiro representa o tempo de adaptação dos micro-organismos ao meio, sendo que neste intervalo praticamente não ocorre reprodução. O segundo representa a variação da concentração (ou da densidade óptica) em função do tempo na fase exponencial que ocorre logo após o período de latência, sendo que nesta etapa o número de bactérias duplica a intervalos de tempo regulares (tempo de geração ou tg). Desta forma, estes dois parâmetros foram considerados para avaliar o efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no crescimento da *S. typhimurium*.

A partir das curvas de crescimento foram calculadas as  $V_{exp}$  médias para cada concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizando a equação 4

$$V_{exp} = \frac{\Delta DO}{\Delta t} \quad (\text{equação 4})$$

onde  $V_{\text{exp}}$  é a velocidade exponencial (variação da densidade óptica por hora),  $\Delta DO$  é a variação da densidade óptica (adimensional) e  $\Delta t$  é a variação do tempo (horas) (MADIGAN et al. 2010; LI et al. 2014). Como recomendado, esta equação foi aplicada nos limites da fase exponencial de crescimento, gerando os valores exibidos na Figura 21.



**Figura 21:** Velocidade exponencial ( $V_{\text{exp}}$ ) versus concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mg/L) para *S. typhimurium*, valores médios ( $n = 3$ ).

Como visualizado na Figura 21, a  $V_{\text{exp}}$  apresentou resultados decrescentes em função do aumento da concentração do agente inibidor, atingindo o valor nulo na concentração de 150 mg/L quando o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> passou a apresentar efeito bactericida. Este comportamento foi bastante lógico uma vez que maiores concentrações do agente inibidor tendem a reduzir a velocidade de reprodução das bactérias, chegando ao limite no qual a reprodução ficou inviável (incapacitação ou morte dos micro-organismos). Aplicando-se o teste de Pearson para as variáveis concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e  $V_{\text{exp}}$  no intervalo entre 0 e 100 mg/L, obteve-se uma correlação linear, negativa e estatisticamente significativa igual a -0,9932 ( $p < 0,05$ ).

Como mencionado por Li (2014), o tempo de latência define a fase inicial de processos microbiológicos na qual o crescimento é praticamente nulo. A fim de converter este conceito em um valor numérico, o tempo de latência foi padronizado como aquele necessário para a duplicação da DO inicial

(estabelecimento do primeiro ciclo de divisão celular). Nesta padronização, os tempos de latência foram calculados a partir das curvas de crescimento e os resultados estão exibidos na Figura 22 segundo a qual, pode ser visto que as amostras controle apresentaram tempo de latência médio de aproximadamente 2,5 horas e este tempo foi aumentando para maiores concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Assim como para a  $V_{\text{exp}}$ , a dependência do tempo de latência com a concentração do  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi bastante lógica, apresentando uma correlação linear, positiva e estatisticamente significativa igual a 0,9661 ( $p < 0,05$ ).

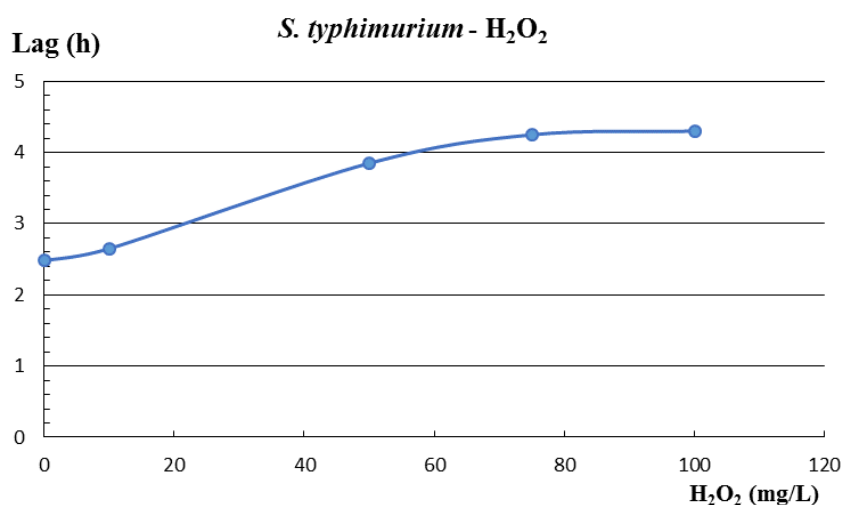


Figura 22: Tempo de latência (Lag) versus concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (mg/L) para *S. typhimurium*, valores médios ( $n = 3$ ).

## 5.2 *E. coli*: tratamento com peróxido de hidrogênio

Na sequência foi realizada uma nova série de ensaios para se avaliar a sensibilidade da *E. coli* ao peróxido de hidrogênio. Não dispondo de valores de referência, foi realizado um teste piloto com 5 mg/L deste agente para verificar o comportamento. Conforme descrito em Materiais e Métodos, foram preparadas 3 amostras de controle (C1, C2 e C3) e 3 amostras de tratamento (TR1, TR2 e TR3) sendo que a estas últimas foram adicionados 5 mg/L de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Obtidas as 6 curvas, os resultados das mesmas foram utilizados para a elaboração do gráfico de médias das curvas C e TR, as quais podem vistas na Figura 23. Este gráfico indicou a necessidade de um período de ensaio de 8 horas que foi padronizado para o estudo envolvendo a *E. coli* e peróxido de hidrogênio.

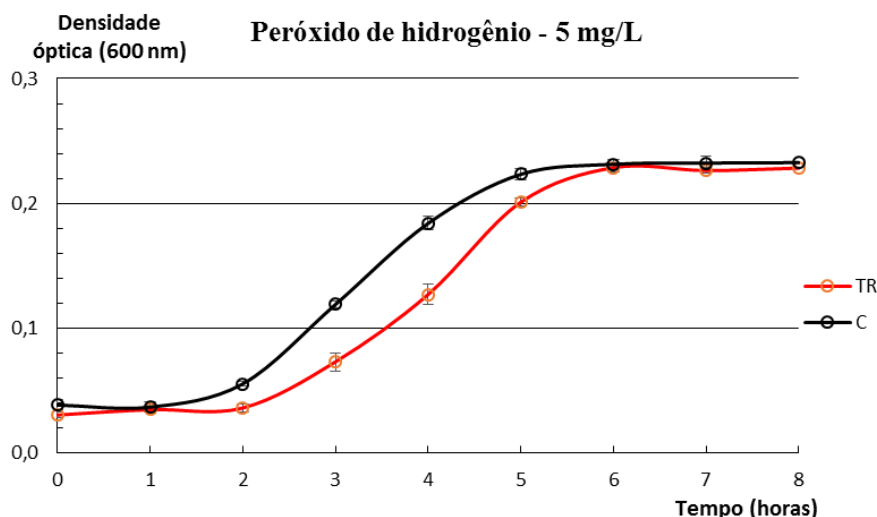


Figura 23: Teste com *E. coli* (C = controle, TR = tratamento com 5 mg/L de  $H_2O_2$ ), valores médios ( $n = 3$ ).

Observa-se na Figura 23 um discreto mas mensurável aumento na fase de latência, com pequena redução da velocidade exponencial. Este fato sugere que a *E. coli* é mais sensível ao  $H_2O_2$  que a *S. typhimurium* que só apresentou este efeito na concentração de 50 mg/L. Assim como no caso anterior, após 6 horas de testes as densidades ópticas do controle e do tratamento já apresentavam valores similares. Desta forma, decidiu-se aumentar a concentração de  $H_2O_2$  para 10 mg/L para a verificação do efeito e os resultados obtidos podem ser observados na Figura 24.

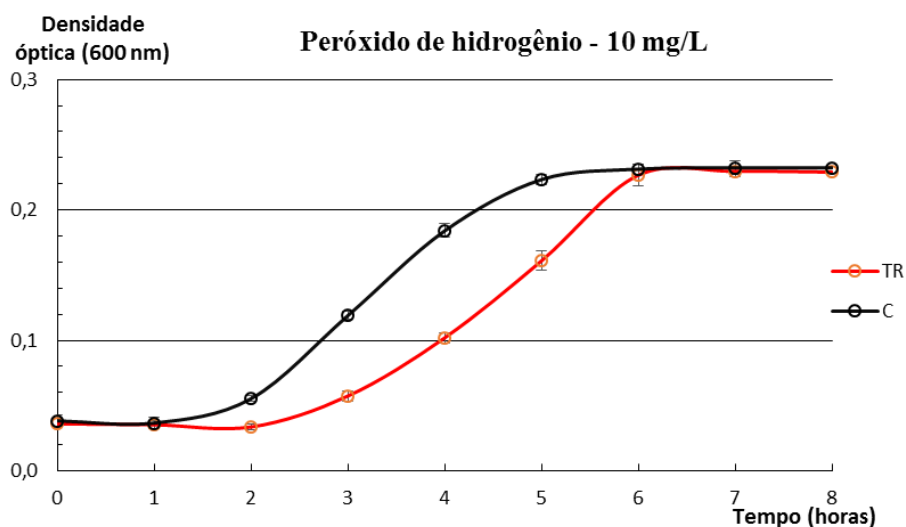


Figura 24: Teste com *E. coli* (C = controle, TR = tratamento com 10 mg/L de  $H_2O_2$ ), valores médios ( $n = 3$ ).

Neste último teste observou-se um aumento mais acentuado da fase Lag com redução adicional da  $V_{exp}$ . Como no teste anterior, a partir de 6 horas, as densidades ópticas das amostras do controle e tratamento tornaram-se equivalentes.

Nos testes subsequentes a concentração do  $H_2O_2$  foi aumentada para 15 e 20 mg/L, observando-se as mesmas tendências já discutidas (aumento da fase de latência e redução progressiva da  $V_{exp}$ ). Estes resultados podem ser vistos nas Figuras 25 e 26, respectivamente, que sugerem que nestas concentrações, o  $H_2O_2$  está atuando como agente inibidor temporário uma vez que no final dos testes, os valores das DO das amostras C e TR praticamente se equivaleram.

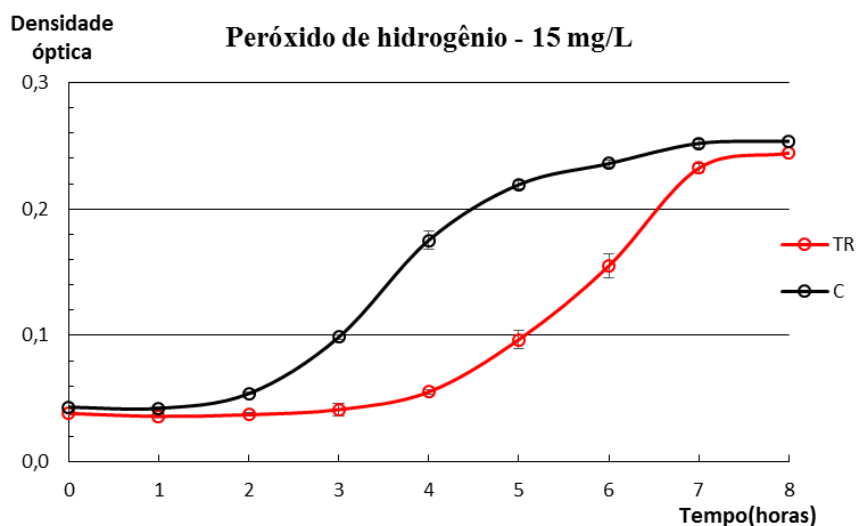


Figura 25: Teste com *E. coli* (C = controle, TR = tratamento com 15 mg/L de  $H_2O_2$ ), valores médios ( $n = 3$ ).

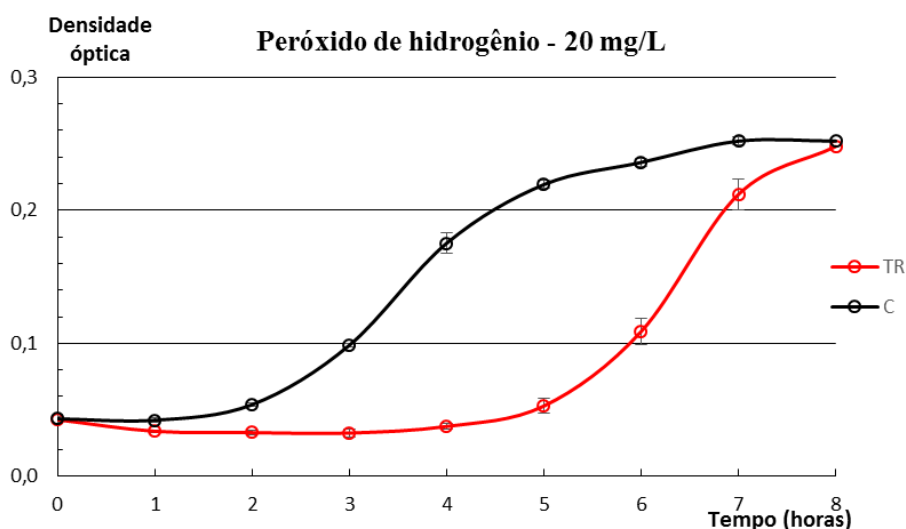


Figura 26: Teste com *E. coli* (C = controle, TR = tratamento com 20 mg/L de  $H_2O_2$ ), valores médios ( $n = 3$ ).

Visando-se identificar a concentração para promover um efeito inibidor permanente, optou-se pelo aumento da concentração de peróxido de hidrogênio para 25 mg/L. Diferentemente do observado no experimento com *S. typhimurium* (ítem 5.1), não houve qualquer desenvolvimento celular nas amostras TR da *E. coli*, mesmo após o prolongamento dos testes até 8 horas (Figura 27).

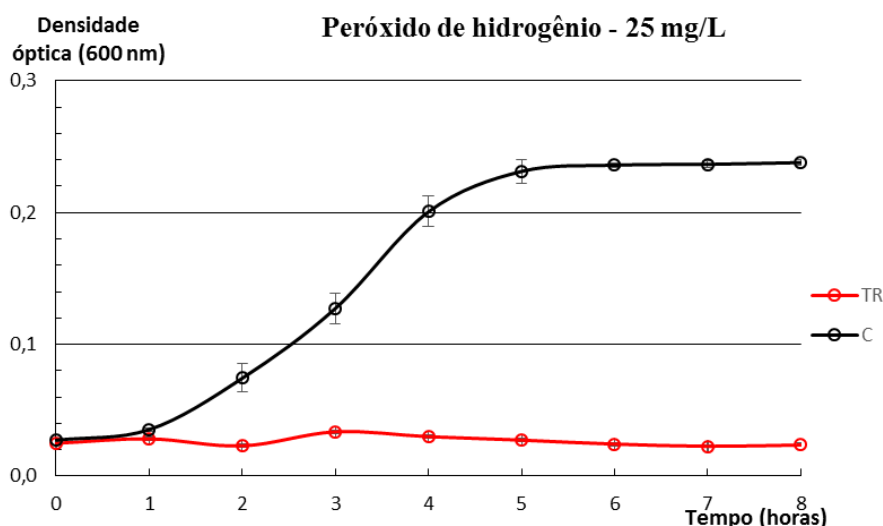


Figura 27: Teste com *E. coli* (C = controle, TR = tratamento com 25 mg/L de  $H_2O_2$ ), valores médios (n = 3).

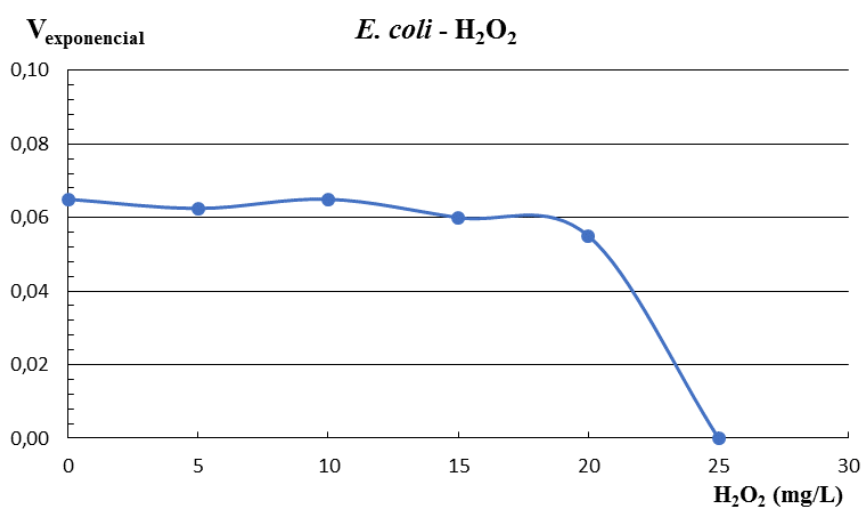
Com o objetivo de se identificar a ação do  $H_2O_2$  sobre a *E. coli*, este ensaio foi prolongado até 24 horas. Após este período, observou-se que a densidade óptica das amostras C mantiveram-se em valores próximos a 0,240 UA (crescimento adicional nulo limitado pelo meio de cultura), porém a densidade óptica das amostras TR apresentaram aumento progressivo, tendendo a se igualar aos valores dos testes C (próximo a 0,240 UA). Este fato sugeriu que a concentração de 25 mg/L de  $H_2O_2$  resultou em efeito bacteriostático, sem provocar a morte dos micro-organismos.

Na oitava hora de incubação foi feita a repicagem apenas dos cultivos TR (pelo motivo já mencionado acima), sendo que 1 mL de cada teste foi transferido para um Erlenmeyer contendo 250 mL de meio de cultura estéril isento do agente inibidor. Após 24 horas, observou-se abundante crescimento bacteriano, atingindo valores de DO próximos a 0,250 UA. Estes resultados confirmaram que a concentração de 25 mg/L de  $H_2O_2$  exerceu efeito bacteriostático sobre a espécie *E. coli*.

Após as 8 horas padronizadas de teste, foi quantificada a concentração de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente no meio de crescimento conforme descrito no item 4.2.d, sendo que o agente inibidor não foi detectado em quantidades mensuráveis. Este fato justifica a ausência de crescimento no período inicial dos testes (presença do agente) e crescimento nas fases tardias do teste (ausência do agente).

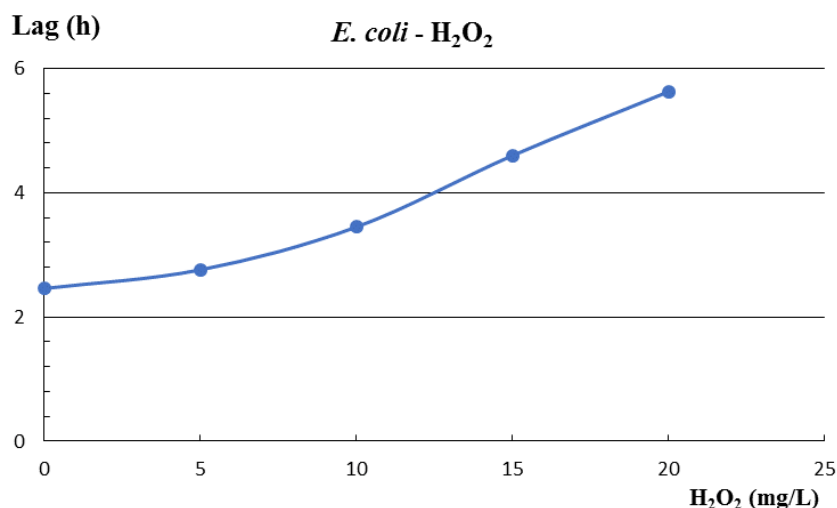
Por semelhança ao realizado para a *S. typhimurium* e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foram determinados os valores de  $V_{exp}$  médios para cada uma das concentrações do agente inibidor e os resultados estão apresentados na Figura 28.



**Figura 28: Velocidade exponencial ( $V_{exp}$ ) versus concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mg/L) para *E. coli*, valores médios ( $n = 3$ ).**

Pode ser verificado nesta última figura que a  $V_{exp}$  praticamente não apresentou variação com concentrações de peróxido de hidrogênio entre 5 e 20 mg/L, comportamento totalmente distinto do observado para a *S. typhimurium*. Com 25 mg/L observou-se  $V_{exp}$  nula após 8 horas de experimento. Deve ser destacado que na sequência do teste até 24 horas, estes mesmos frascos voltaram a apresentar crescimento bacteriano. Aplicando-se o teste de Pearson para as variáveis concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e  $V_{exp}$  no intervalo entre 0 e 20 mg/L, obteve-se uma correlação linear e negativa igual a -0,8504 mas não estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

Assumindo-se a mesma padronização já citada para o cálculo do tempo de latência, os valores para este parâmetro foram calculados a partir das curvas de crescimento da *E. coli*, sendo que os resultados podem ser visualizados na Figura 29.



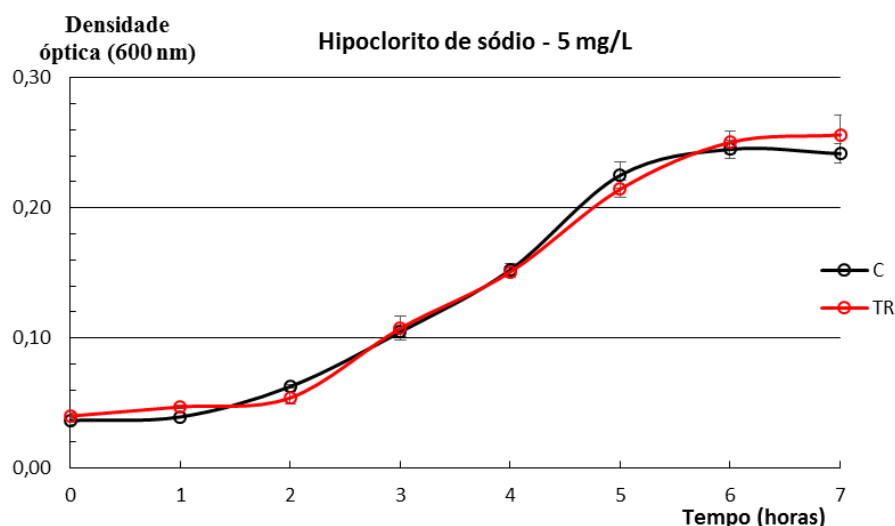
**Figura 29:** Tempo de latência (Lag) versus concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mg/L) para *E. coli*, valores médios (n = 3).

Para a dependência do tempo de latência com a concentração do agente inibidor observou-se tendência bastante semelhante à obtida para a *S. typhimurium*. Partindo-se de um tempo de latência de 2,5 horas para o controle, os valores nas amostras TR aumentaram gradativamente até alcançar 5,5 horas quando o tempo padronizado de 8 horas foi atingido. Neste caso, a dependência do tempo de latência com a concentração do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também foi bastante lógica, sendo que a aplicação do teste de Pearson apresentou uma correlação linear, positiva e estatisticamente significativa igual a 0,9786 ( $p < 0,05$ ).

### 5.3 *E. coli*: tratamento com hipoclorito de sódio

Nesta terceira etapa foram realizados os testes para se avaliar a sensibilidade da *E. coli* à presença de hipoclorito de sódio. A concentração escolhida para o ensaio inicial foi de 5 mg/L, sendo os controles e tratamentos realizados em triplicata como previamente descrito (C1, C2, C3 e TR1, TR2, TR3). Este valor inicial foi definido conforme a referência Jordão e Pessoa (2011), a qual cita que a dosagem de cloro adicionada a esgotos brutos varia entre 6 e 12 mg/L.

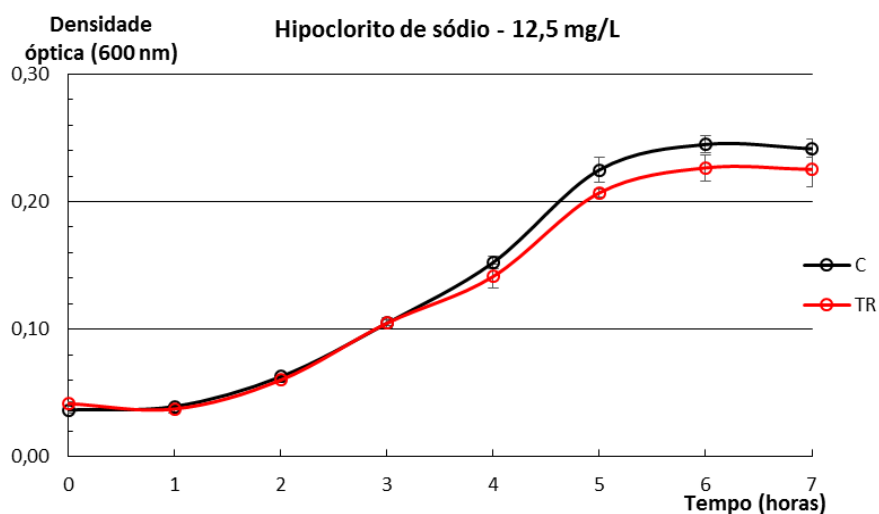
Da mesma forma que nos itens anteriores, foram obtidas 6 curvas que após os cálculos da média e desvios padrão, resultaram na Figura 30. O estudo envolvendo a *E. coli* e o agente inibidor hipoclorito de sódio apresentou um período de ensaio de 7 horas, o qual foi padronizado neste item.



**Figura 30:** Teste com *E. coli* (C = controle, TR = tratamento com 5 mg/L de NaClO), valores médios (n = 3).

Observa-se de forma bastante conclusiva na Figura 30 que as curvas de crescimento da *E. coli* das amostras controle e tratamento praticamente se sobrepõem, não sendo observado qualquer efeito inibidor na reprodução microbológica nesta concentração. Para as duas curvas foram obtidos tempos de latência de aproximadamente 2,5 horas e DO em torno de 0,240 UA após as 7 horas de teste.

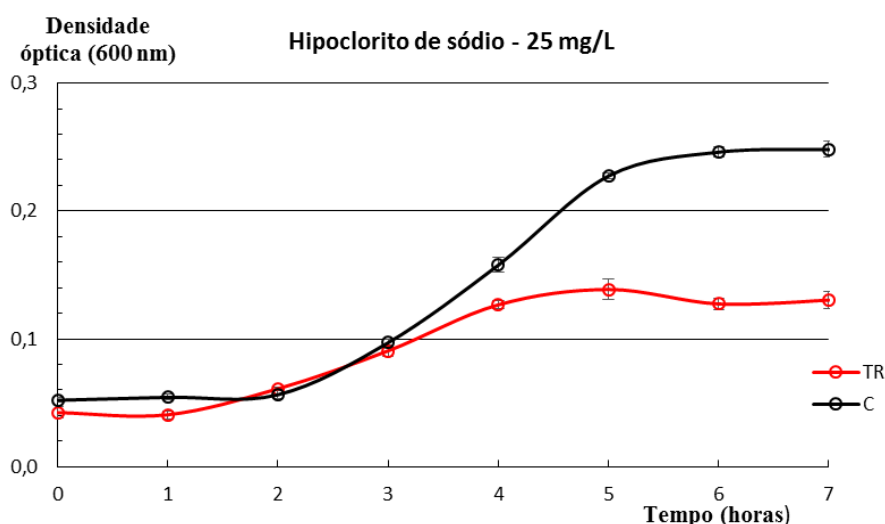
Na sequência e para atender aos objetivos do estudo, optou-se pelo tratamento com hipoclorito de sódio a 12,5 mg/L cujos valores podem ser vistos na Figura 31.



**Figura 31:** Teste com *E. coli* (C = controle, TR = tratamento com 12,5 mg/L de NaClO), valores médios (n = 3).

Neste segundo tratamento, pouca diferença foi observada no crescimento bacteriológico comparando-se as curvas C e TR. Os tempos de latência mantiveram-se iguais, havendo apenas uma pequena redução na  $V_{exp}$  do TR, resultando em uma DO um pouco inferior no tempo final do ensaio. Uma vez que o efeito inibidor desejado ainda não pode ser observado, optou-se por dobrar a concentração do hipoclorito de sódio.

No teste exibido na Figura 32 (25 mg/L do agente inibidor) constata-se uma redução sensível no crescimento da *E. coli* nas amostras TR. O tempo de latência aumentou para cerca de 2,7 horas com redução bastante acentuada na  $V_{exp}$ . Verifica-se que as densidades ópticas finais apresentaram valores bastante diferentes, o que já sugere um efeito mensurável do hipoclorito de sódio no desenvolvimento desta bactéria.



**Figura 32:** Teste com *E. coli* (C = controle, TR = tratamento com 25 mg/L de NaClO), valores médios ( $n = 3$ ).

A fim de se obter o efeito desejado no estudo, foi realizado mais um experimento utilizando-se 30 mg/L de NaClO (Figura 33). Nessas condições pode ser observado que a curva média de crescimento das amostras TR foi muito limitada, não sendo possível se determinar o tempo de latência utilizando-se o conceito descrito anteriormente (primeiro ciclo de divisão celular). Adicionalmente ao discutido, a variação da DO foi muito pequena, o que resultou em valores de  $V_{exp}$  quase nulos, mesmo quando considerado o tempo total de ensaio igual a 7 horas.

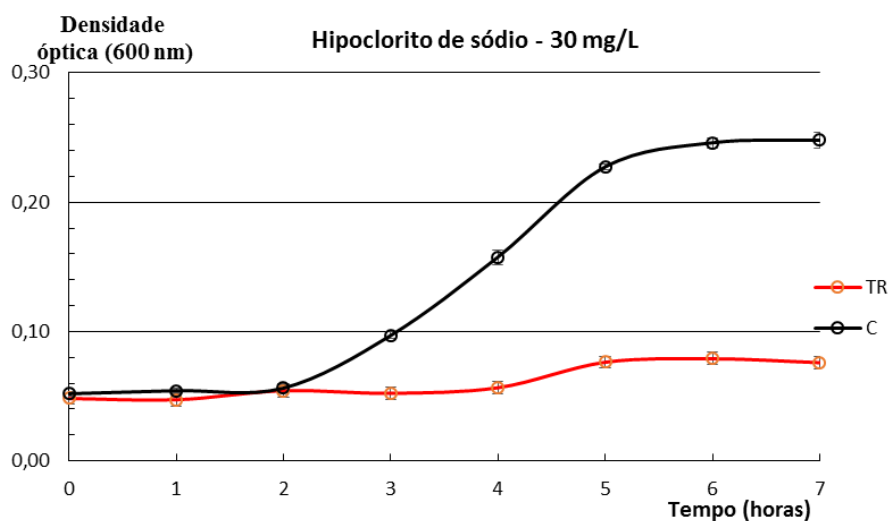


Figura 33: Teste com *E. coli* (C = controle, TR = tratamento com 30 mg/L de NaClO), valores médios (n = 3).

Como último ensaio foram utilizados 50 mg/L de hipoclorito de sódio sendo que não foi observado qualquer desenvolvimento celular nas amostras TR da *E. coli*, mesmo após as 7 horas de experimento (Figura 34).

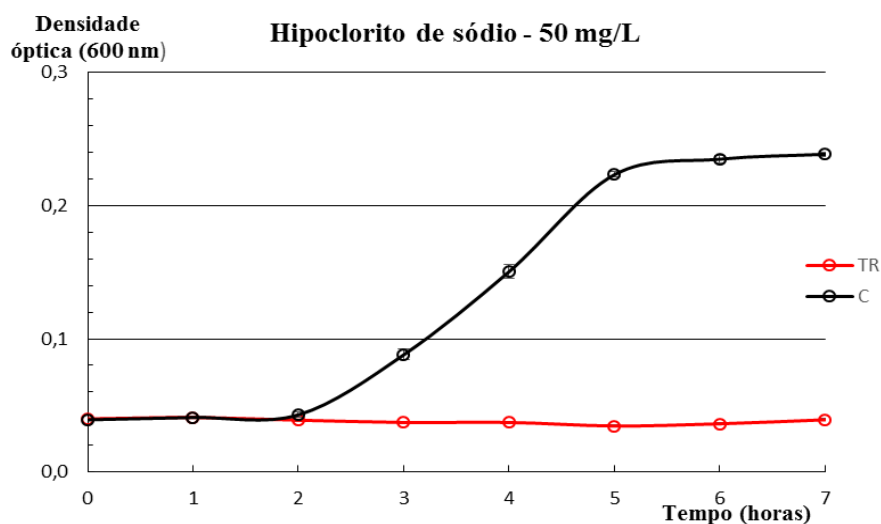


Figura 34: Teste com *E. coli* (C = controle, TR = tratamento com 50 mg/L de NaClO), valores médios (n = 3).

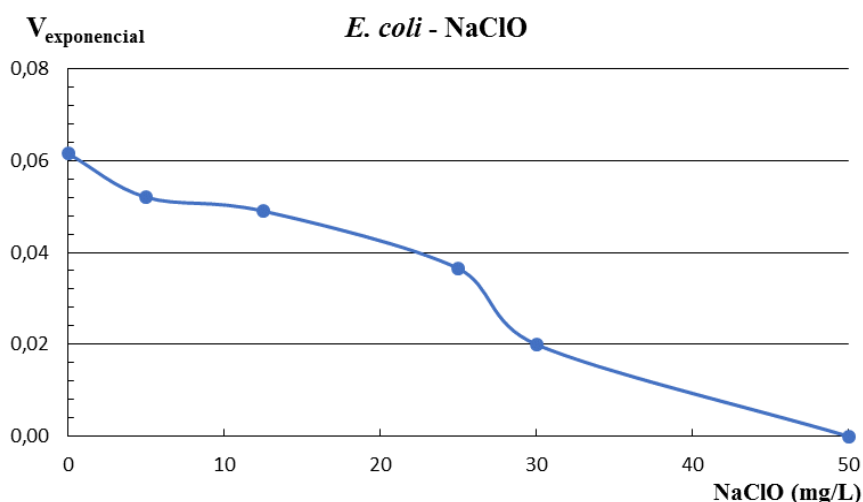
Para coletar informações adicionais da ação deste agente inibidor sobre a *E. coli*, este último ensaio foi estendido até 24 horas de incubação. Após este período, as amostras C apresentaram apenas um discreto crescimento bacteriológico adicional atingindo o valor médio de 0,298 UA (provavelmente por limitação de nutrientes do meio de cultura) mas as amostras TR, inicialmente sem crescimento,

apresentaram intenso desenvolvimento atingindo cerca de 70% do valor médio do controle (0,212 UA). Este fato sugere que o NaClO apresentou efeito bacteriostático sobre a *E. coli*.

A fim de confirmar esta conclusão, na sétima hora de incubação foi feita a repicagem de 1 mL apenas dos testes TR (pelo motivo já mencionado anteriormente) para Erlenmeyers de 250 mL contendo meio de cultura estéril e isento de NaClO. Após 24 horas de incubação, estas amostras também apresentaram intenso aumento da DO, confirmando o efeito bacteriostático do NaClO nesta concentração.

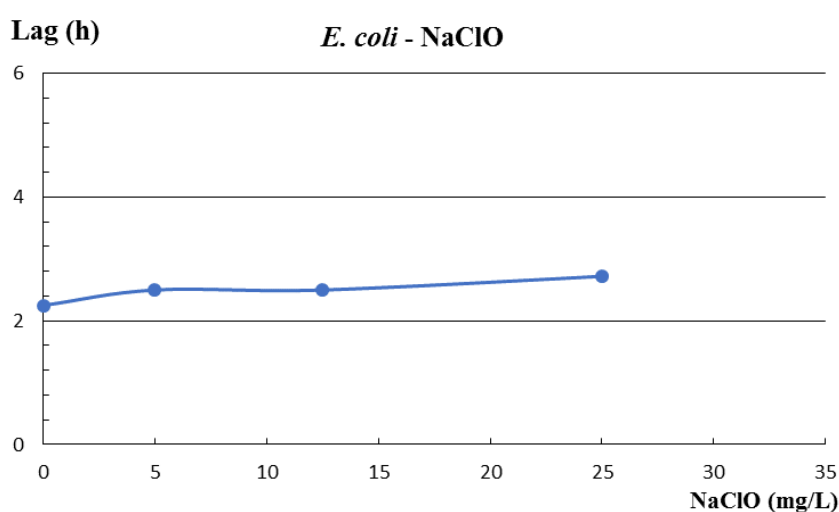
Após as 7 horas padronizadas de teste, foi quantificada a concentração de NaClO no meio de crescimento dos testes TR conforme descrito no item 4.2.e, sendo que o agente inibidor não foi detectado. Assim como no item 5.2, a degradação do NaClO justifica a ausência de crescimento no período inicial dos testes (presença do agente bacteriotático) e crescimento nas etapas posteriores do teste (ausência do agente bacteriostático).

A seguir foram calculadas as  $V_{exp}$  para o intervalo de concentrações de NaClO avaliado. Estes resultados podem ser vistos na Figura 35 a qual indica tendência inversamente proporcional entre a concentração de hipoclorito de sódio e o crescimento bacteriológico. Esta tendência foi avaliada através da correlação de Pearson no intervalo de 0 a 30 mg/L, obtendo-se uma correlação linear, negativa e estatisticamente significativa igual a -0,9637 ( $p < 0,05$ ).



**Figura 35: Velocidade exponencial ( $V_{exp}$ ) versus concentração de NaClO (mg/L) para *E. coli*, valores médios ( $n = 3$ ).**

Ao estudar a fase de latência da *E. coli* em função da concentração do agente inibidor, observou-se que estes tempos permaneceram quase constantes, independente da concentração do NaClO utilizada, conforme visto na Figura 36. Este comportamento sugere a existência de algum mecanismo enzimático de defesa deste micro-organismo, o qual será discutido posteriormente neste estudo. A ausência de dependência das variáveis mencionadas indica pouca validade estatística para o teste de Pearson que, por este motivo, não foi aplicado.



**Figura 36:** Tempo de latência (Lag) versus concentração de NaClO (mg/L) para *E. coli*, valores médios (n = 3).

#### **5.4 *S. typhimurium*: tratamento com hipoclorito de sódio**

Na última etapa prevista para este estudo foram realizados os mesmos testes para se avaliar a sensibilidade da bactéria *S. typhimurium* em relação a presença do agente oxidante hipoclorito de sódio.

A concentração selecionada para o ensaio inicial foi arbitrariamente definida como sendo igual a 75 mg/L (por falta de maiores informações na literatura consultada), sendo os controles e tratamentos realizados em triplicata conforme já descrito anteriormente (C1, C2, C3 e TR1, TR2, TR3). Como nos itens anteriores, foram obtidas 6 curvas de crescimento, as quais após os cálculos de média resultaram na Figura 37 (vista a seguir), que apresenta as curvas médias C e TR.

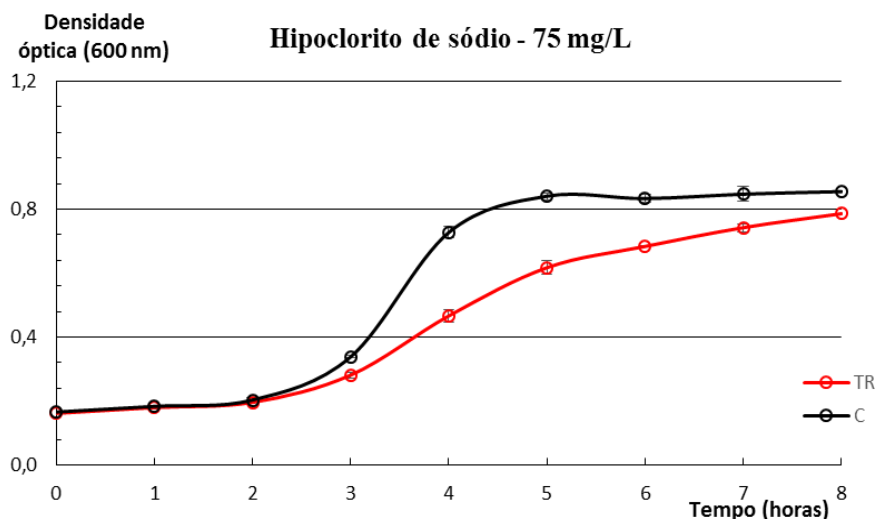


Figura 37: Teste com *S. typhimurium* (C = controle, TR = tratamento com 75 mg/L de NaClO), valores médios (n = 3).

Nesta figura foi possível observar que o tratamento da *S. typhimurium* com 75 mg/L de NaClO já resultou em alterações cinéticas na curva de crescimento TR quando comparada a curva C. Foi verificado um discreto efeito inibidor, sendo que o controle apresentou o tempo lag equivalente a 3,18 horas enquanto que nos testes TR foi obtido um valor para esta variável igual a 3,35 horas e  $V_{exp}$  igual a  $0,175 \Delta DO/\Delta h$ .

Na sequência dos ensaios, foi realizado outro tratamento aumentando-se a concentração do NaClO para 100 mg/L. Após a execução do teste, foram obtidos os valores que podem ser visualizados na Figura 38.

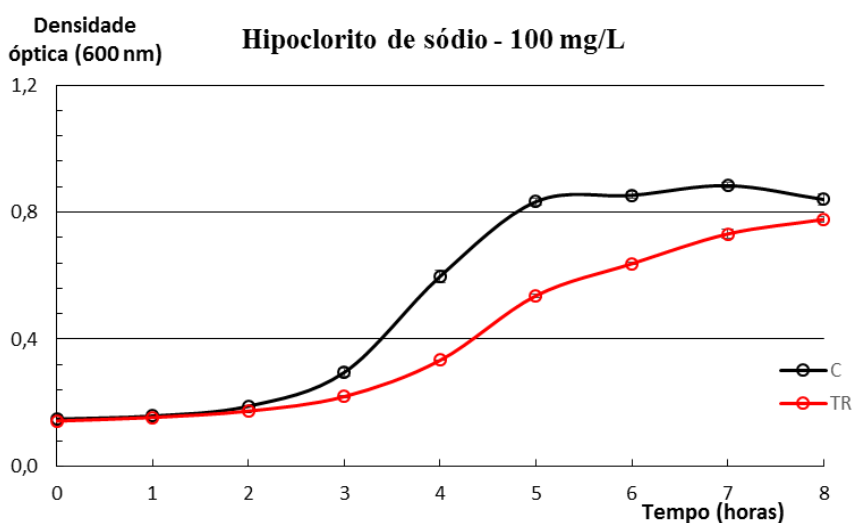
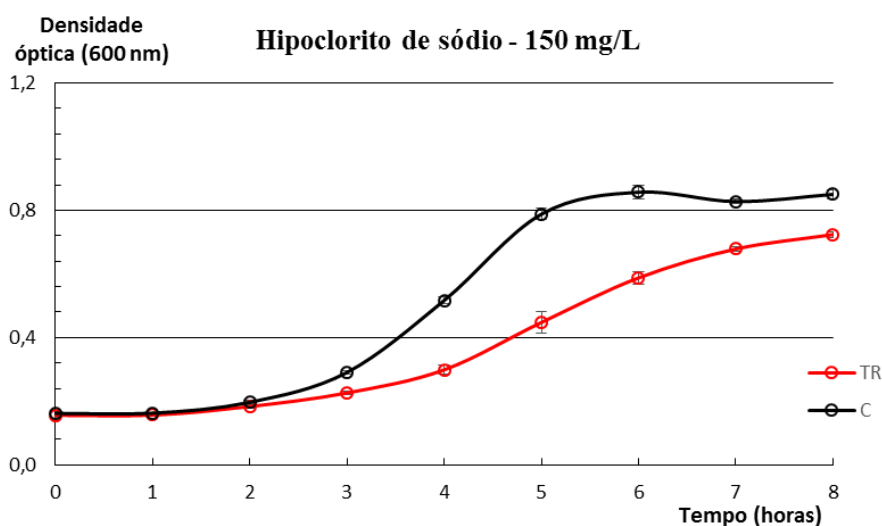


Figura 38: Teste com *S. typhimurium* (C = controle, TR = tratamento com 100 mg/L de NaClO), valores médios (n = 3).

Na concentração de 100 mg/L de NaClO, constatou-se um efeito um pouco mais acentuado do agente inibidor sobre o crescimento da *S. typhimurium* verificado pela redução da  $V_{exp}$  ( $0,155 \Delta DO/\Delta h$ ) e pelo aumento do tempo de latência (3,70 horas). Como ocorreu crescimento das bactérias no final deste teste, há indícios que o agente ainda está apresentando efeito temporário.

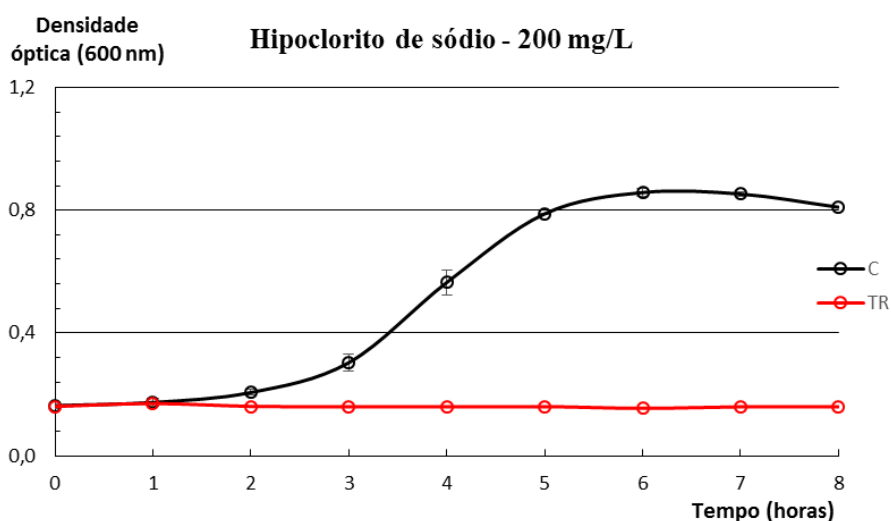
A seguir, a concentração do NaClO foi aumentada para 150 mg/L para a verificação do efeito. De modo análogo ao observado nos tratamentos anteriores, o efeito do hipoclorito de sódio na reprodução da *S. typhimurium* mostrou uma tendência dose dependente, visto que com este aumento de concentração, a  $V_{exp}$  diminuiu ( $0,145 \Delta DO/\Delta h$ ) e o tempo de latência aumentou (4,00 horas) em relação aos testes que utilizaram dosagens mais baixas (Figura 39).



**Figura 39:** Teste com *S. typhimurium* (C = controle, TR = tratamento com 150 mg/L de NaClO), valores médios ( $n = 3$ ).

Na sequência foi realizado mais um teste utilizando concentração igual a 200 mg/L de NaClO, cujos resultados estão apresentados na Figura 40. Neste ensaio foi possível verificar a ausência de reprodução uma vez que os valores das densidades óptica das amostras TR não se alteraram, mesmo após 8 horas de experimento. No sentido de verificar o mecanismo de inibição do agente utilizado, estes testes foram estendidos até 24 horas de incubação. Ao final do mesmo, observou-se apenas um discreto aumento da DO média dos controles (0,873 UA) mas as amostras TR passaram a apresentar acelerado crescimento, sendo que o valor médio final atingiu 0,707 UA, o que equivale a cerca de 81% do controle,

sugerindo um efeito bacteriostático.



**Figura 40:** Teste com *S. typhimurium* (C = controle, TR = tratamento com 200 mg/L de NaClO), valores médios (n = 3).

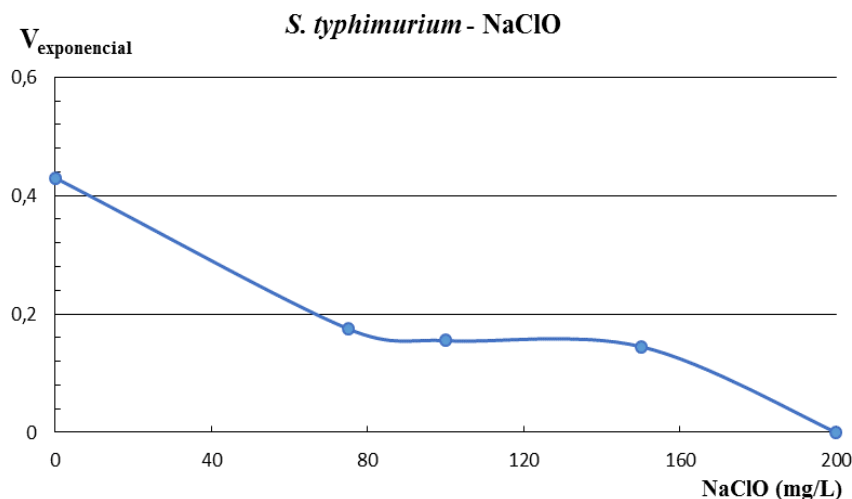
Na oitava hora de incubação, foi feita a repicagem dos cultivos TR e uma alíquota de 1 mL de cada teste foi transferido para um Erlenmeyer contendo 250 mL de meio de cultura estéril isento do agente químico. Após 24 horas, observou-se intenso crescimento da *S. typhimurium* mensurada pelo aumento da DO, sugerindo que na concentração de 200 mg/L o NaClO exerceu efeito bacteriostático sobre esta bactéria.

Seguindo a padronização de 8 horas de teste, foi quantificada a concentração de NaClO no meio de crescimento das amostras TR conforme descrito no item 4.2.e, sendo que o agente inibidor não foi detectado. A existência do NaClO justifica a ausência de crescimento no período inicial dos testes (presença do agente bacteriostático) e o crescimento nas etapas tardias do teste (ausência do agente bacteriostático por degradação).

Após os ensaios descritos acima, foi construída a curva que representa os valores de  $V_{exp}$  médios para cada uma das concentrações testadas do agente inibidor (Figura 41).

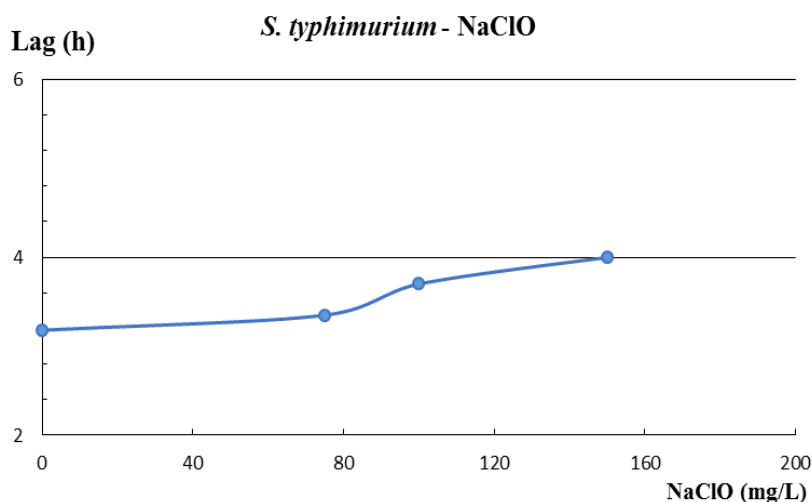
Como pode ser visualizado nesta figura, há uma tendência inversamente proporcional entre concentração de NaClO e o crescimento microbiano medido pela DO da amostra. Esta tendência foi avaliada através da correlação de Pearson para as variáveis concentração de NaClO e  $V_{exp}$  no intervalo entre 0 e 150 mg/L,

obtendo-se uma correlação linear, negativa e estatisticamente significativa igual - 0,9054 ( $p < 0,05$ ).



**Figura 41:** Velocidade exponencial ( $V_{\text{exp}}$ ) versus concentração de NaClO (mg/L) para *S. typhimurium*, valores médios ( $n = 3$ ).

Para a bactéria *S. typhimurium*, ao estudarmos a dependência da fase lag em função da concentração do hipoclorito de sódio (Figura 42), foi possível observar um discreto aumento do tempo de latência em maiores concentrações do agente inibidor.



**Figura 42:** Tempo de latência (Lag) versus concentração de NaClO (mg/L) para *S. typhimurium*, valores médios ( $n = 3$ ).

O tempo de latência inicial foi de 3,18 horas (obtido nas amostras do controle) o qual aumentou para 3,35 horas com 75 mg/L nas amostras de

tratamento, para 3,70 horas com 100 mg/L e finalmente 4,00 horas na concentração de 150 mg/L.

Observamos neste estudo, que a dependência do tempo de latência em relação a concentração do hipoclorito de sódio foi bastante lógica. O teste de Pearson foi aplicado e apresentou uma correlação linear, positiva e estatisticamente significativa igual a 0,9483 ( $p < 0,05$ ).

### **5.5 Efeitos de concentrações crescentes do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre a velocidade exponencial de crescimento e tempo de latência**

De acordo com a Figura 21, as velocidades exponenciais de crescimento da *S. typhimurium* variaram em função das concentrações crescentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> segundo um padrão inversamente proporcional. No entanto o mesmo padrão não foi observado para experimentos utilizando a *E. coli* (Figura 28).

Em relação aos tempos de latência, observamos que tanto *S. typhimurium* (Figura 22) quanto *E. coli* (Figura 29), o tempo da fase lag é diretamente proporcional à concentração do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

O agente inibidor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atua no genoma da bactéria causando mutagênese. Ao mesmo tempo atua em proteínas e lipídeos causando danos oxidativos com consequente morte celular.

A *E. coli* possui mecanismos de reparo do DNA cuja função é a de recuperar a sua integridade, sendo eles por remoção de base nitrogenada, por remoção de nucleotídeo ou por recombinação. Outro importante mecanismo é a ativação dos sistemas de defesa antioxidante OxyR e SoxRS (ASAD et al. 2004). Já Arenas et al. (2011) relata que a *E. coli* sintetiza enzimas antioxidantes somente em resposta à presença de espécies reativas de oxigênio como os ânions superóxido e peróxidos no meio de cultura.

Em relação à *S. typhimurium*, estudos mostram que a mesma vive e se replica no interior dos macrófagos durante o curso da infecção, suportando a exposição a vários agentes estressantes, muitos deles com ação pró-oxidante (HÉBRARD et al. 2009). Este mesmo autor destaca que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é formado no interior das células fagocíticas por meio da dismutação do ânion superóxido que pode ocorrer de forma espontânea ou mediada por enzimas ou pode ser gerado no “burst” respiratório por meio da atividade da NADPH oxidase. Uma vez fagocitada, a *Salmonella* identifica a

presença de peróxidos e regula a sua expressão gênica a fim de neutralizá-los. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  presente é rapidamente neutralizado por atividade enzimática da catalase e da alquil hidroperóxido redutase. Um dado interessante é que o genoma da *Salmonella* contém dois genes que codificam a enzima alquil hidroperóxido redutase que são o *ahpC* e o *tsaA* enquanto que um único gene protetor é encontrado na *E. coli* (*ahpC*). Tais informações da literatura justificam o fato da *S. typhimurium* ser mais tolerante a concentrações mais elevadas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  comparada a *E. coli*, como observado no presente estudo.

A *E. coli* também possui mecanismos de combate ao estresse oxidativo causado pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  que permitem que a  $V_{\text{exp}}$  varie muito pouco (em torno de 0,06 DO/hora) entre as concentrações zero e 20 mg/L. Ao se atingir 25 mg/L de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , as células apresentaram crescimento nulo sem, no entanto, causar sua morte (efeito bacteriostático). Após a decomposição do agente inibidor para níveis suportáveis pelo micro-organismo, seu crescimento foi restaurado.

Em relação à *S. typhimurium*, até a concentração de 10 mg/L de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a velocidade exponencial é semelhante ao tratamento controle. A partir desta concentração, as velocidades de crescimento passam a ser sensíveis ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  até atingir a concentração de efeito bactericida igual a 150 mg/L. Horst et al. (2010) mostraram que linhagens de *S. typhimurium* expostas a 2 mmol/L (68 mg/L) de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante até 9 horas, exibiram diminuição na capacidade de formar colônias, portanto tiveram sua capacidade reprodutiva afetada.

A análise dos dados indicou que a bactéria *S. typhimurium* é capaz de se adaptar fisiologicamente à presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  até 150 mg/L quando é atingida a sua concentração letal. Já a *E. coli* manifesta inibição de crescimento em menores concentrações (25 mg/L) mas a mesma tem caráter bacteriostático.

## **5.6 Efeitos de concentrações crescentes de NaClO sobre a velocidade exponencial de crescimento e tempo de latência**

Segundo Morales et al. (2012), os agentes  $\text{H}_2\text{O}_2$  e HOCl atravessam as membranas externas das bactérias Gram-negativas por meio de porinas. Na *Salmonellas* e na *E. coli*, a expressão das porinas para  $\text{H}_2\text{O}_2$  é inibida quando o meio contém 1,5 mM (51 mg/L) de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou 0,53 mM (27,8 mg/L) de HOCl.

O HOCl é sintetizado pelas células fagocitárias através da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), em uma reação que depende da presença de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  em ambiente ácido. Tanto o  $\text{H}_2\text{O}_2$  quanto o HOCl reagem com as sulfidrilas das proteínas, com sais de cobre ou ferro e com o ferro ligado ao grupo prostético heme, produzindo radicais hidroxilas ( $^*\text{OH}$ ) que podem causar danos oxidativos às proteínas, aos lipídeos e ao DNA.

Segundo Haenen e Bast (2014), a glutathione é a principal defesa antioxidante contra a ação do hipoclorito. Tióis de baixo peso molecular também atuam nas bactérias, mantendo as sulfidrilas das proteínas no estado reduzido. A deficiência destes compostos torna as bactérias mais susceptíveis à ação do hipoclorito.

Conforme a Figura 41, as velocidades exponenciais de crescimento de *S. typhimurium* variaram em função das concentrações crescentes de NaClO segundo um padrão inversamente proporcional. Com este agente inibidor, este padrão também foi observado nos ensaios com a *E. coli* (Figura 35).

Em relação às fases lag, observamos que tanto para *S. typhimurium* (Figura 42) como para a *E. coli* (Figura 37), os tempos de latência não variaram expressivamente em relação a presença de concentrações crescentes de hipoclorito de sódio no meio.

Concentrações de hipoclorito entre 75 e 150 mg/L produzem uma  $V_{\text{exp}}$  quase constante em torno de 0,175 DO/hora para a *S. typhimurium*, refletindo as defesas intracelulares exercida pelos tióis de baixo peso molecular (incluindo a glutathione) que, dentre outras funções, neutraliza o hipoclorito. Na concentração de 200 mg/L, a capacidade antioxidante é esgotada e a partir desta, a célula necessita regenerar glutathione reduzida a partir da glutathione oxidada. Nestas concentrações mais elevadas o agente atua como bacteriostático, mas o crescimento é retomado após o tempo necessário para a degradação do NaClO.

Considerando o efeito do hipoclorito sobre a curva de crescimento de *E. coli*, pode ser observado que entre as concentrações de 5 a 30 mg/L do agente inibidor, a  $V_{\text{exp}}$  variou entre 0,052 e 0,020 DO/hora, refletindo a capacidade de neutralização do hipoclorito também por meio da glutathione reduzida. A partir da concentração de 50 mg/L que apresenta atividade bacteriostática, evidencia-se a necessidade da reposição da glutathione oxidada pelo hipoclorito.

## 6. CONCLUSÕES

Após a execução da fase experimental desta pesquisa, foi possível obter as conclusões sumarizadas a seguir.

- a) A *S. typhimurium* adapta-se mais rapidamente ao estresse oxidativo imposto por  $H_2O_2$  ou NaClO em comparação com a *E. coli*, resultando numa maior resistência aos agentes avaliados;
- b) Para a *S. typhimurium*, o  $H_2O_2$  na concentração de 150 mg/L tem ação bactericida, enquanto que o NaClO na concentração de 200 mg/L tem ação bacteriostática;
- c) Para a *E. coli*, as concentrações de 25 mg/L de  $H_2O_2$  e 50 mg/L de NaClO mostraram-se bacteriostáticas;
- d) Mesmo para as maiores concentrações testadas, após 8 horas de ensaio os agentes oxidantes não foram detectados no meio de cultura, possibilitando a retomada do crescimento em quase todos os testes;
- e) As concentrações de hipoclorito de sódio utilizadas para a etapa de cloração durante o tratamento de esgoto (6 a 12 mg/L) não se revelaram suficientes para reduzir a carga microbiana, pois neste intervalo o lag não é afetado e a  $V_{exp}$  é minimamente afetada tanto para *S. typhimurium* quanto para *E. coli*;

Para estudos futuros, podem ser desenvolvidos ensaios para se dosar as atividades das enzimas antioxidantes nas linhagens estudadas e relacionar com os resultados obtidos neste trabalho.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 9.648: **Estudo de concepção de sistemas de esgoto sanitário**. Rio de Janeiro: ABNT, 1986.
- ALMEIDA, R.A., OLIVEIRA, L. F. C., KLIEMAN, H. J. **Eficiência de espécies vegetais na purificação de esgoto sanitário**. Pesquisa Agropecuária Tropical. 2007, 37: 1-9.
- ALVARENGA, O. T. **Desinfecção e esterilização química**. Jornal dos Farmacêuticos. 1998.
- AMARAL, L. A.; NADER FILHO, A.; ROSSI JUNIOR, O. D.; FERREIRA, F. L. A.; BARROS, L. S. S. **Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais**. Revista de Saúde Pública. 2003, 37: 510-514.
- ARAÚJO, R. O esgoto sanitário. In: NUVOLARI, A. (Coord.). **Esgoto sanitário: coleta, transporte, tratamento e reuso agrícola**. 2. ed. São Paulo: Blücher, 2011. 565 p.
- ARENAS, F. A., COVARRUBIAS, SANDOVAL, J.M.P.C, DONOSO, J. M. P., IMLAY, J. A., VASQUEZ, C.C. **The *Escherichia coli* BtuE Protein Functions as a Resistance Determinant against Reactive Oxygen Species**. PLOS ONE. 2011
- ASAD, N.R, ASAD, L. M. B. O., ALMEIDA, C. E. B., FELZENSZWALB, I., CABRAL, J. B., LEITÃO, A.C. **Several pathways of hydrogen peroxide action that damage the *E.coli* genome**. Genetics and Molecular Biology. 2004, 27 (2): 291-303.
- BAIRD, C. **Química ambiental**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2011. 844 p.
- BORSOI, Z.; CAMISÃO, M. L.; LANARI, N.; TORRES, S.; GOMES, S. M. **Tratamento de esgotos: tecnologias acessíveis**. Disponível em [www.baraoemfoco.com.br/noticias/ete/tecnologias.htm](http://www.baraoemfoco.com.br/noticias/ete/tecnologias.htm). Acesso em: 21 out. 2014.
- BASSETT, J.; DENNEY, R.C.; JEFFERY, G.H.; MENDHAM, J.; **Vogel: Análise Inorgânica Quantitativa**. Guanabara Dois S.A.: Rio de Janeiro, 1981. 115 p.
- BRAGA, E. S.; et al. **Eutrophication and Bacterial Pollution Caused by Industrial and Domestic Wastes at the Baixada Santista Estuarine System Brazil**. Marine Pollution Bulletin, 2000, 40 (2): 165-173.
- BRAGA, B.; et al. **Introdução à engenharia ambiental**. 2. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005. 318 p.

- BRASIL (1981) **Política Nacional do Meio Ambiente**. Lei 6.938 de 31 de agosto de 1981. Presidência da República – sub chefia para assuntos jurídicos. Disponível em: [http:// planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l6938compilada.htm](http://planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l6938compilada.htm). Acesso em: 30 ago. 2014.
- BRITTO, J. M., RANGEL, M. C. **Processos Avançados de Oxidação de Compostos Fenólicos em Efluentes Industriais**. Química Nova. 2008. 31(1): 114-122.
- CANEDO, P. **Água maltratada: da riqueza à escassez**. Disponível em: [www.faperj.br/downloads/revista/03.pdf](http://www.faperj.br/downloads/revista/03.pdf) 2003. Acesso em: 10 out. 2014.
- CHERNICHARO, C.; DANIEL, L. A.; SENS, M.; CORAUCCI FILHO, B. **Pós-tratamento de efluentes anaeróbios por sistemas de desinfecção**. Disponível em: [www.finep.gov.br/prosab/livros/ProsabCarlos/Cap.7.pdf](http://www.finep.gov.br/prosab/livros/ProsabCarlos/Cap.7.pdf) em 2001, Acesso em: 05 out. 2014.
- CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. **Rapid and simple determination of *Escherichia coli* phylogenetic group**. Applied and Environmental Microbiology. 2000, 66: 4555-4558.
- FRANCO, R. M. B. **Protozoários de veiculação hídrica**. Revista Panamericana de Infectologia. 2007, 9: 36-43.
- GILES, C. L. **Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview**. Journal of Animal Science. 2007, 85: 45-62.
- GRISI, S. J. F. E.; EJZENBERG, B.; RODRIGUES NETO, A.; KIMURA, H.; BELLIZIA NETO, L.; HORITA, S.; BALDACCI, E. **Bacteremia por *Salmonella typhimurium* e acometimento pulmonar**. Pediatria. 1983, 5: 313-316.
- GONÇALVES, F. ***Escherichia coli***. Disponível em: <https://pt.scribd.com/doc> em 08/2011, Acesso em: 07 out. 2014.
- HAENEN, G., BAST, A. **Glutathione revisited: a better scavenger than previously thought**. Frontiers in Pharmacology, 2014
- HÉBRARD, M.; VIALA, J. P. M.; MÉRESSE, S.; BARRAS, F.; AUSSEL, L. **Redundant Hydrogen Peroxide Scavengers Contribute to *Salmonella* Virulence and Oxidative Stress Resistance**. Journal of Bacteriology, 2009, 191 (14): 4605–4614
- HORST, S. A., JAEGER, T. , DENKEL, L.A., ROUF, S.F., RHEN, M., BANGE, F.C. **Thiol Peroxidase Protects *Salmonella enterica* from Hydrogen Peroxide Stress In Vitro and Facilitates Intracellular Growth**. Journal of

- Bacteriology, 2010, 192 (11): 2929–2932
- IBGE. **Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios** - PNAD 2003. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 10 set. 2013
- JORDÃO, E. P.; PESSOA, C. A. **Tratamento de esgotos domésticos**. 6. ed. Rio de Janeiro: ABES, 2011. 969 p.
- LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 1273 p.
- LI, W.R., SHI, Q.S., LIANG, Q., XIE, X. B., HUANG, X. M., CHEN, Y. B. **Antibacterial Activity and Kinetics of *Litsea cubeba* Oil on *Escherichia coli***. PLOS ONE. 2014
- LIBÂNIO, M. **Fundamentos de qualidade e tratamento de água do**. 3. ed. São Paulo: Átomo, 2010. 494 p.
- MCDONNELL, G., RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, 1999, 12(1): 147-179
- MADIGAN, M.T, MARTINKO, J.M., DUNLAP, P.V., CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. São Paulo: Artmed, 2010. 1128 p.
- MARTINS, L. M. **Estudo de *Salmonella typhimurium* de origem aviária: perfil genotípico, colonização e invasão**. Dissertação (Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2010.
- MATTOS, I. L.; SHIRAISHI, K. A.; BRAZ, A. D.; FERNANDES, J. R. **Peróxido de hidrogênio: importância e determinação**. Química Nova. 2003, 26, 373-380.
- MORALES, E. H. et al. **Hypochlorous acid and hydrogen peroxide-induce negative regulation of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* ompW by the response regulator ArcA**. BMC Microbiology, 2012, 12: 63.
- MOTA, M. B. R.; MANZANARES, M. D.; SILVA, R. A. L. **Viabilidade de reutilização da água para vasos sanitários**. Revista Ciências do Ambiente. 2006, 2, 24-29.
- OHLWEILER, O. A., **Química Analítica Quantitativa**, Ed. Livros Técnicos Científicos S.A. 1981. 191 p.
- PENNA, T. C. V. **Métodos de Desinfecção e Esterilização**. In: Marco Fabio Mastroeni. (Org.). Biossegurança aplicada a laboratórios e serviços de saúde. 2ed. São Paulo: Atheneu, 2006. P135-168
- PINTO, P. S. A. **Aspectos sanitários da salmonelose como zoonose**. Revista Higiene Alimentar. 2000, 74(13): 39-43.

- PIVELI, R. P.; KATO, M. T. **Qualidade das águas e poluição: aspectos físico-químicos**. São Paulo: ABES, 2006. P 285.
- REBOUÇAS, A da C. **Água doce no mundo e no Brasil**. In: REBOUÇAS, A. da C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J. G. (Orgs.). Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação. 3. ed. São Paulo: Escrituras Editora, 2006. P. 1-35.
- RIBEIRO, L. F. **Aplicação de dióxido de cloro como alternativa para desinfecção de esgotos sanitários tratados através de lagoas de estabilização**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária e Ambiental), Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2001.
- SABEI, T. R.; BASSETTI, F. J. **Alternativas ecoeficientes para tratamento de efluentes em comunidades rurais**. Fórum Ambiental da Alta Paulista 9: 487-503. 2013.
- SALATI, E., LEMOS, H.M., SALATI, E. **Água e o desenvolvimento sustentável**. In: REBOUÇAS, A. da C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J. G. (Orgs.). Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação. 3. ed. São Paulo: Escrituras Editora, 2006. P. 37-62.
- SANTANNA, G. L. **Tratamento Biológico de Efluentes – Fundamentos e Aplicações**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2013. 381p.
- SILVA, G. A.; KULAY, L. A. **Água na indústria**. In: REBOUÇAS, A. da C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J. G. (Orgs.). Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação. 3. ed. São Paulo: Escrituras Editora, 2006. P. 367-398.
- SPERLING, M. V. **Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias – Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 4 ed. Minas Gerais: ABES, 2014. 452 p.
- SPIRO, T. G.; STIGLIANI, W. M. **Química ambiental**. 2. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2009. 334 p.
- SUBTIL, E. L. **Tratamento de águas residuárias utilizando emissários submarinos: avaliação do nível de tratamento para uma disposição oceânica ambientalmente segura**. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- TANG, K. **The microorganisms found in sewage**. eHow Education. Disponível em: <http://www.ehow.com/how>. Acesso em: 24 out. 2014
- TEIXEIRA, W. et al. **Decifrando a Terra**. 2 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2009. 623 p.

ZHOU, K., GEORGE, S. M., MÉTRIS, A., LI, P. L., BARANYI, J. **Lag Phase of *Salmonella enterica* under Osmotic Stress Conditions.** Applied and Environmental Microbiology. 2011, 77(5): 1758-1762.