

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO DE JOINVILLE
CURSO DE ENGENHARIA NAVAL

FRANCIELE DA SILVA GOMES

FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA USANDO NANOCOMPÓSITO CELULOSE/TIO₂
PARA REDUÇÃO DE IMPUREZAS E BIOINVASÕES DA ÁGUA DE LASTRO

Joinville

2017

FRANCIELE DA SILVA GOMES

FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA USANDO NANOCOMPÓSITO CELULOSE/TIO₂
PARA REDUÇÃO DE IMPUREZAS E BIOINVASÕES DA ÁGUA DE LASTRO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel em Engenharia Naval no curso de Engenharia Naval da Universidade Federal de Santa Catarina, Campus de Joinville.

Orientadora: Profa. Dra. Derce de Oliveira Souza Recouvreux

Joinville

2017

FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA USANDO NANOCOMPÓSITO CELULOSE/TIO₂
PARA REDUÇÃO DE IMPUREZAS E BIOINVASÕES DA ÁGUA DE LASTRO

FRANCIELE DA SILVA GOMES

Esta Monografia foi julgada e aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Naval na Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico de Joinville.

Joinville (SC), 2017.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Derce de Oliveira Souza Recouvreux
Presidente/Orientadora

Prof. Dr. Claudimir Antonio Carminatti
Membro

Prof. Dr. Gabriel Benedet Dutra
Membro

Ms. Vanessa Mendonça Mendes Vargas
Membro

Dedico este trabalho aos meus pais, Oronildo e Josefa Gomes.

AGRADECIMENTOS

A Deus, aos meus pais, Oronildo e Josefa, meu irmão, João Vitor, por iluminarem meus caminhos incondicionalmente, pela confiança, apoio, amor e suporte dado durante toda minha existência.

Ao meu companheiro, Bryan, por toda inspiração e amor que você me traz, sem contar toda a paciência, compreensão e cuidado que sempre teve por mim, sobretudo no período de desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a Ana Lucia, que trouxe ao mundo minha felicidade, e por acreditar em mim, muitas vezes mais do que eu mesma. De mesmo modo, agradeço a minha melhor amiga Luiza, que desde criança compartilha dos meus sonhos estando sempre presente em minhas conquistas.

A minha querida orientadora Derce, cuja calma, competência e dedicação oferecida a mim. As palavras de conforto e segurança, os elogios e todo o incentivo com certeza foram cruciais para a realização deste trabalho. Assim como minha supervisora de estágio Vanessa, que me guiou nessa trajetória me ensinando as práticas de laboratório e compartilhando seus ensinamentos, os quais contribuíram imprescindivelmente a conclusão deste experimento.

Minha sincera gratidão ao professor Thiago Pontin, que possibilitou a mim a oportunidade de expandir meus horizontes para a realização deste trabalho, além dos bons conselhos que me deu durante o período acadêmico. Obrigado por mostrar que a naval de fato é um oceano de possibilidades!

Agradeço aos meus colaboradores desse trabalho, os quais hoje posso chamá-los de amigos. Serei eternamente grata ao Daniel e a Elizabeth, que me proporcionaram bons momentos além da imensa generosidade ao me auxiliarem a enfrentar as adversidades. Entre os colaboradores, deixo meu agradecimento especial a Letícia que sempre muito solícita foi um anjo no laboratório, obrigada por toda a paciência e disposição comigo.

Aos amigos navais, em especial Talyta e Wendel, que me proporcionaram momentos memoráveis oferecendo amizade e cumplicidade durante todos esses anos na graduação, tornando minha vida mais feliz.

Por fim agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina e todos os meus professores, os quais colaboraram e me deram todo o apoio necessário para que eu possa me tornar engenheira.

RESUMO

O setor naval contemporâneo vem se alarmando às questões ambientais incidentes em atividades corriqueiras. A nocividade da questão inicia quando o navio assoma seu destino de carregamento, visto que a água de lastro deve ser lançada promovendo a inserção de bioinvasores em ecossistemas aquáticos diferentes. Ou seja, a demanda de água de lastro necessária aos navios, afim de evitar possíveis comprometimentos estruturais, ao momento de deslastre infere questões de alto potencial de risco até a saúde pública. Isto quer dizer que, os microrganismos estão sobrevivendo durante as rotas, bem como sua proliferação no lodo sedimentado dos tanques de lastro. Portanto, a preocupação com a temática não restringe apenas as entidades ambientais, mas também as autoridades sanitárias, uma vez que abre possibilidade para propagação de doenças patogênicas e até mesmo epidêmicas. Em razão deste contexto e inspirado no método de tratamento por irradiação UV, já consolidado entre as soluções para efluentes navais, este trabalho teve como proposta o tratamento fotocatalítico a água de lastro, utilizando um nanocompósito constituído de nanopartículas de TiO_2 imobilizadas em nanofibras de celulose bacteriana, como catalisador deste sistema. Para comparar o efeito da fotocatalise realizou-se o tratamento da água lastro apenas por fotólise. Os resultados do processo fotocatalítico, de forma qualitativa, apresentaram redução da turbidez. A análise microbiológica mostrou resultados relevantes para o processo de fotocatalise heterogênea, em comparação ao processo de fotólise. Deste modo, a fotocatalise heterogênea, usando o nanocompósito TiO_2 imobilizadas em nanofibras de celulose bacteriana se insere como potencial em tratamento a água de lastro.

Palavras-chave: Água de lastro; Bioinvasores; Celulose bacteriana; Desinfecção; Dióxido de titânio; Fotocatálise.

ABSTRACT

The naval sector is concerned with the environmental problems resulting from routine activities. Among that, when a ship arrives at its loading or delivering destination, the ballast water is disposed into the sea, inserting different microorganisms in anew aquatic ecosystem. In addition to this, ships require a great amount of ballast water, due to structural stability, so that these disposals become a public health issue. In other words, microorganisms are surviving and growing themselves along the route, in the sludge's deposit on the ballast tanks. Therefore, this issue does not concern environmental entities only, but also health authorities, because it opens up the possibilities of spreading pathogenic, or even epidemic diseases. In this context, and inspired by the UV irradiation treatment method as a solutions for marine effluents, this work had as proposal the photocatalytic treatment of ballast water, using a nanocomposite composed of TiO₂ nanoparticles immobilized in nanofibers of bacterial cellulose, as catalyst of this system. In order to compare the effect of the photocatalysis, the treatment of water ballast was performed only by photolysis. The results of the photocatalytic process, in a qualitative way, presented reduction of turbidity. Microbiological analysis showed results relevant to the heterogeneous photocatalysis process, compared to the photolysis process. Thus, heterogeneous photocatalysis using the TiO₂ nanocomposite immobilized on bacterial cellulose nanofibers is inserted as a new ballast water treatment.

Keywords: Ballast water; Bacterial cellulose; Disinfection; Titanium dioxide; Microorganisms; Photocatalysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema de lastro em navios convencionais.....	19
Figura 2 - Possíveis fontes de poluição em navios.....	20
Figura 3 - Processo de tratamento da água de lastro.	24
Figura 4 - Mecanismo da fotocatalise.....	30
Figura 5- Fluxograma com a metodologia utilizada no desenvolvimento deste trabalho.	35
Figura 6- Placa microbiológica com 96 poços com volume de 300 µl cada poço.	36
Figura 7- Arranjo do reator Fotocatalítico de bancada.....	39
Figura 8 -Representação da metodologia do Teste Presuntivo.....	43
Figura 9- Indicação de tubos positivos (presença do Grupo Coliforme).....	43
Figura 10- Fluxograma da metodologia para análise microbiológica pela técnica de tubos múltiplos.....	44
Figura 11 - Inóculo produzido.....	46
Figura 12- Produção Biotecnológica de Nanocelulose.....	47
Figura 13 - Correção do pH das NB após o tratamento alcalino.....	47
Figura 14 – (a) Dispersão aquosa de hidrogel de CB + nanopartículas de TiO ₂ . (b) Nanocompósito de CB/TiO ₂ na forma de hidrogel.....	48
Figura 15- Micrografias obtidas por MEV com ampliação 15.000 ×. Em (a) nanofibras de uma amostra de CB. Em (b) nanofibras de uma amostra do nanocompósito CB/TiO ₂	48
Figura 16- Reator Fotocatalítico de bancada em operação.....	49
Figura 17- Análise qualitativa entre amostra tratada por Fotocatálise Heterogênea (FC) (a) e amostra sem tratamento (b).	50
Figura 18-Tubos positivos resultante do Teste Presuntivo.....	51
Figura 19- Amostras inoculadas em meio C.L resultantes do Teste Presuntivo.....	52
Figura 20 - Representação gráfica do número de tubos positivos resultante do Teste Presuntivo.	52
Figura 21- Amostras inoculadas em meio C.L.V.B resultantes do Teste Confirmativo.....	53
Figura 22- Representação gráfica do número de tubos positivos resultante do Teste Confirmativo.....	54
Figura 23- Amostras inoculadas em meio E.C resultantes do Teste para Coliformes Termotolerantes.....	55

Figura 24- Representação gráfica do número de tubos positivos resultante do Teste para Coliformes Termotolerantes	56
Figura 25- Representação gráfica do número de tubos positivos resultante do Teste de Fermentação por Tubos Múltiplos.....	57
Figura 26-Amostras não filtradas sujeitas a Técnica de Cultivo em Profundidade para Contagem de Bactérias.....	58
Figura 27 - Amostras filtradas sujeitas a Técnica de Cultivo em Profundidade para Contagem de Bactérias.....	59
Figura 28- Amostra (B) e (B) (F) inoculadas em meio C.L.V.B sujeitas a Técnica de Cultivo em Profundidade para Contagem de Bactérias.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Bioinvasores oriundos da água de lastro e os prejuízos causados a sociedade	21
Tabela 2 – Penalidades e sanções adotados para minimizar os riscos causados pela água de lastro na Austrália, Estados Unidos e Nova Zelândia.	23
Tabela 3- Níveis de dose de UV-C em função do micro-organismo para que sejam 99,9% dizimados.....	26
Tabela 4 – Sistemas Típicos de Processos de Oxidação Avançados.....	28
Tabela 5 - Estudos encontrados sobre o método de fotocatalise heterogênea aplicado a água de lastro	32
Tabela 6- Requisitos para um suporte adequado ao TiO ₂	34
Tabela 7- Preparação do Meio de Cultivo	36
Tabela 8 - Materiais e quantidades para a imobilização de TiO ₂ em naofibras de CB.	37
Tabela 9- Preparação da Solução de Tiosulfato de Sódio a 10%	38
Tabela 10- Resumo das amostras para execução da análise microbiológica.	38
Tabela 11 - Parâmetros operacionais no processo fotocatalítico preliminar.	40
Tabela 12- Preparação do meio de cultura: Caldo Lactosado (C.L)	41
Tabela 13- Preparação do meio de cultura: Caldo Lactosado com verde brilhante e bile a 2% (C.L.V.B).....	41
Tabela 14- Preparação do meio de cultura para Coliformes Termotolerantes (E.C)	42
Tabela 15-Preparação do meio de cultura para contagem de bactérias heterotróficas.....	42
Tabela 16- NMP para presença de Coliformes Totais com limite de confiança de 95% para as combinações de resultados positivos quando cinco tubos são usados para cada diluição (10 ml, 1,0 ml e 0,1 ml).....	54
Tabela 17- NMP para presença de Coliformes Termotolerantes com limite de confiança de 95% para as combinações de resultados positivos quando 5 tubos são usados para cada diluição (10 ml, 1,0 ml e 0,1 ml).	56
Tabela 18- Síntese dos resultados obtidos pelo emprego da Técnica de Cultivo em Profundidade para Contagem de Bactérias.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	Elemento Prata da Tabela Periódica
ANTAQ	Agência Nacional de Transportes Aquaviários
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
B	Branco ou Tempo zero
BWM	Ballast Water Management
CB	Celulose Bacteriana
C.L	Caldo Lactosado
ClO₂	Dióxido de Cloro
C.L.V.B	Caldo Lactosado Verde Brillhante e Bile a 2%
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E.C	Meio de Cultivo para Coliformes Termotolerantes
FC	Fotocatálise Heterogênea
Fe	Elemento Ferro da Tabela Periódica
FT	Fotólise
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GLOBALLAST	Global Ballast Water Management Programme
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
IMO	International Maritime Organization
NORMAM	Norma da Autoridade Marítima
NMP	Número Mais Provável
O₃	Ozônio
OH·	Hidroxila
PCA	Meio para Contagem de Bactérias Heterotróficas
POA's	Processos de Oxidação Avançados
TiO₂	Dióxido de Titânio
THM	Trihalometano
UNCED	Conferência Internacional das Nações Unidas para o Meio Ambiente e Desenvolvimento
UV/UVA	Radiação Ultravioleta
UV-C	Germicida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS.....	16
1.1.1	Objetivo geral	16
1.1.2	Objetivos específicos.....	16
1.2	ESTRUTURA DO DOCUMENTO	17
2	REVISÃO TEÓRICA	18
2.1	MOTIVAÇÃO PARA O ESTUDO DA TEMÁTICA.....	18
2.2	DEFINIÇÕES PARA ÁGUA DE LASTRO.....	18
2.3	IMPACTOS DA ÁGUA DE LASTRO.....	19
2.3.1	Grupo coliforme	21
2.3.1.1	<i>Escherichia coli</i>	22
2.4	LEGISLAÇÃO INTERNACIONAL	23
2.5	LEGISLAÇÃO BRASILEIRA	23
2.6	MÉTODO DE DESLASTREAMENTO.....	24
2.7	MÉTODOS DE TRATAMENTO A BORDO.....	24
2.7.1	Filtração	25
2.7.2	Aquecimento	25
2.7.3	Ultravioleta.....	25
2.7.4	Cloração	27
2.7.5	Ozonização	27
2.7.6	Eletrólise.....	28
2.8	OS PROCESSOS DE OXIDAÇÃO AVANÇADOS INSERIDOS AO TRATAMENTO DE ÁGUA DE LASTRO	28
2.9	FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA.....	29
2.10	DIÓXIDO DE TITÂNIO	31
2.11	FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA APLICADA À ÁGUA DE LASTRO	31
2.12	NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS E NANOCELULOSE	33
2.12.1	Nanocompósito de Celulose Bacteriana + Dióxido de Titânio	34

3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1	PRODUÇÃO DO NANOCOMPÓSITO DE CELULOSE/ TiO ₂	35
3.1.1	Microrganismo e Preparação do Inóculo.....	36
3.1.2	Produção Biotecnológica de Celulose Bacteriana.....	36
3.1.3	Incorporação de Dióxido de Titânio em nanocelulose	37
3.1.4	Caracterização Morfológica de CB e do Nanocompósito CB/TiO₂	37
3.2	COLETA DA AMOSTRA.....	38
3.3	PROCESSO DE FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA APLICADO A ÁGUA DE LASTRO EM ESCALA DE BANCADA	39
3.3.1	Tratamento Fotocatalítico Preliminar.....	39
3.4	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	40
	Caldo Lactosado (C.L) - concentração dupla	41
	Caldo Lactosado (C.L) - concentração simples	41
	Caldo Lactosado Verde Brilhante e Bile a 2% (C.L.V.B)	41
	Meio para Coliformes Termotolerantes (EC)	42
	Meio para contagem de bactérias heterotróficas (PCA).....	42
3.4.1	Técnica de fermentação em Tubos Múltiplos para determinação do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais e Coliforme Termotolerantes	42
3.4.1.1	<i>Teste Presuntivo</i>	42
3.4.1.2	<i>Teste Confirmativo</i>	44
3.4.1.3	<i>Teste para Coliformes Termotolerantes.....</i>	44
3.4.2	Técnica de Cultivo em Profundidade para Contagem de Bactérias.....	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	PRODUÇÃO DO NANOCOMPÓSITO DE CELULOSE/TiO ₂	45
4.1.1	Produção Biotecnológica de Nanocelulose	46
4.1.2	Incorporação de Dióxido de Titânio em nanocelulose	47
4.2	TRATAMENTO DA ÁGUA DE LASTRO POR MEIO DA APLICAÇÃO DE FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA EM ESCALA DE BANCADA	49
4.2.1	Tratamento fotocatalítico Preliminar.....	49

4.2.2	Análise Qualitativa da amostra.....	50
4.3	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	51
4.3.1	Técnica de Fermentação por Tubos Múltiplos	51
4.3.1.1	<i>Teste Presuntivo para o tratamento fotocatalítico preliminar.....</i>	<i>51</i>
4.3.1.2	<i>Teste Presuntivo para a amostra coletada do Tanque de Lastro.....</i>	<i>52</i>
4.3.1.3	<i>Teste Confirmativo para a amostra coletada do Tanque de Lastro.....</i>	<i>53</i>
4.3.1.4	<i>Teste para Coliformes Termotolerantes para a amostra coletada do Tanque de Lastro.....</i>	<i>55</i>
4.3.2	Técnica de Cultivo em Profundidade para Contagem de Bactérias.....	57
5	CONCLUSÃO	61
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	62
	REFERÊNCIAS	63
	APÊNDICE A	69
	APÊNDICE B.....	72
	ANEXO A.....	75

1 INTRODUÇÃO

De acordo com *Program according the provisions of the international Ballast Water Convention* mostrado por Oliveira (2008) e Carmo (2008) indicam que o transporte marítimo movimenta de modo expressivo as viagens mundiais, e transfere internacionalmente cerca de 10 bilhões de toneladas de água de lastro ao ano. Em adição a isto, Vasconcelos (2008) relata que no Brasil 95% do comércio com outros países é feito por mar. Ainda sob o mesmo ponto de vista, em uma única viagem, a embarcação carrega/descarrega a água do lastro em diferentes portos internacionais. Tal condição dispõe misturas de diferentes águas no interior do tanque de lastro.

A partir dessa perspectiva, numerosos navios de viagens oceânicas usufruem de diferentes rotas, e executam navegações com distintas condições de carregamento. Em conjuntura a vazio, o navio deve respeitar determinadas características de operação, como o calado, estabilidade, tensões estruturais, condições de manobras (imersão do hélice e do leme) e a segurança da embarcação (CARMO, 2008).

Em contrapartida, o cenário naval enfrenta relevante impasse em relação ao panorama ambiental sob a ótica da água de lastro. Tendo em vista as consequências da transferência de volumes de água de lastro cada vez maiores e da bioincrustação nos cascos dos navios, que introduzem espécies marinhas exóticas em diferentes ecossistemas, um dos problemas mais reconhecidos em relação à água de lastro, de fato circunda âmbitos ecológicos.

Em acordo com o contexto mencionado, Pereira (2008) enfatiza que a água de lastro está entre as quatro ameaças enfáticas do prisma oceânico. As demais são oriundas da alteração e destruição de regiões costeiras dos países, poluição marinha por fontes terrestres e exploração excessiva dos recursos advindos do mar. Todavia, o tratamento recorrente a água de lastro até então apresenta insuficiência em termos de eficiência, uma vez que o panorama ambiental marinho carece de novas tecnologias a serem empregadas (ALBERTINI, 2009).

Em alusão a isto Teran (2014) acrescenta que a partir do crescente interesse em novas tecnologias para a desinfecção de efluentes, os Processos de Oxidação Avançados (POA) se

sobressaem em relação aos demais existentes devido a capacidade de converter poluentes em espécies químicas inócuas.

Nesse sentido, a água de lastro caracteriza-se como um tipo de água residual, encaixando-se nas balizas dos POA. Entre os sistemas mencionados que definem essa tecnologia, a fotocatalise heterogênea tem sido estudada em função de seu potencial de degradação frente a diversos compostos de interesse, a partir do emprego de diferentes fontes de radiação e catalisadores.

Neste contexto, o presente trabalho visou utilizar um nanocompósito constituído de nanopartículas de TiO_2 imobilizadas na rede de nanofibras de celulose bacteriana como catalisador para o processo de fotocatalise heterogênea em água de lastro. Para avaliar o tratamento fotocatalítico foram realizadas análises microbiológicas do tipo fermentação por tubos múltiplos e de cultivo em profundidade para contagem de bactérias. Deste modo, foi possível avaliar a eficiência do método na redução do grupo coliforme em comparação a água de lastro não tratada.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a fotocatalise heterogênea utilizando nanopartículas de TiO_2 imobilizadas em nanofibras de celulose bacteriana no tratamento da água de lastro visando a redução de impurezas e bioinvasões.

1.1.2 Objetivos específicos

- i. Produzir e caracterizar morfológicamente o nanocompósito constituído por nanopartículas de TiO_2 imobilizadas em uma rede polimérica de celulose bacteriana.
- ii. Determinar o tempo necessário de tratamento por fotocatalise heterogênea, para redução de impurezas e bioinvasões em água;
- iii. Realizar o tratamento por fotólise e fotocatalise heterogênea em água de lastro utilizando o nanocompósito produzido;
- iv. Analisar microbiologicamente, por meio de Colimetria, a eficiência do tratamento de fotólise e fotocatalise heterogênea.

1.2 ESTRUTURA DO DOCUMENTO

No capítulo 1 é apresentada a introdução do trabalho com a definição da problemática, a justificativa, além dos objetivos para elaboração do mesmo.

O capítulo 2 insere a revisão teórica para que haja entendimento do tema abordado, em termos de definições, impactos da temática tanto sobre o ecossistema marinho quanto saúde humana. Em adição a isso, conta com as legislações internacionais e como atua no Brasil, incluído os métodos de tratamento existentes para a água de lastro a bordo, e novas tecnologias para tratamento da água de lastro, como os Processos de Oxidação Avançados. Além da produção do nanocompósito de Celulose/TiO₂ e análise microbiológica por meio da técnica de fermentação por tubos múltiplos e técnica de cultivo em profundidade para contagem de bactérias.

No capítulo 3 há o detalhamento dos materiais e métodos empregados para a produção do nanocompósito de Celulose/TiO₂ e a execução da aplicação fotocatalítica em um arranjo com catalisador nanocompósito. Além da análise microbiológica realizada por meio de técnicas para determinar a Colimetria.

O capítulo 4 se dedica a apresentação dos resultados obtidos, bem como a discussão envolvida.

Por fim, no capítulo 5 são apresentadas as conclusões e considerações dos resultados obtidos com o tratamento fotocatalítico para a água de lastro, assim como sugestões para melhorias dessa tecnologia desenvolvida em nível de bancada.

2 REVISÃO TEÓRICA

Nessa seção é apresentada a fundamentação necessária para o entendimento do tema, e de como ele se tornou um problema, assim como uma breve contextualização dos métodos de tratamento existentes para água de lastro a bordo.

2.1 MOTIVAÇÃO PARA O ESTUDO DA TEMÁTICA

Segundo a matéria do Jornal Ciência (2009), no mundo globalizado, o comércio internacional, as viagens de negócio e o turismo estão disseminando um impacto ambiental. A fonte do prejuízo são as chamadas espécies exóticas invasoras. Elas chegam a regiões onde antes não existiam, encontram ótimas condições para se desenvolver e transformam-se em praga. Oriundas do transporte de água de lastro, os bioinvasores causam destruição ao competir com as espécies nativas desses novos lugares, desequilibrando os ecossistemas e atingindo atividades produtivas.

2.2 DEFINIÇÕES PARA ÁGUA DE LASTRO

Albertini (2009) expõe que a água de Lastro, segundo o documento MEPC 49/2/3¹ que contém a minuta da Convenção Internacional sobre o Controle e Gestão da Água de Lastro de Navios e Sedimentos – Convenção BWM 2004, em seu Artigo 1º, Inciso IV, Título I – define como “[...] água com seu material em suspensão tomada a bordo do navio para controlar trim², adernamento³, calado⁴, estabilidade ou tensões de um navio (ação de forças internas e externas)”. Além disso, a Agência Nacional de Transportes Aquaviários (ANTAQ, 2016), se refere à

¹ Disponível em: <[http://imo.udhb.gov.tr/dosyam/EKLER/MEPC.107\(49\).pdf](http://imo.udhb.gov.tr/dosyam/EKLER/MEPC.107(49).pdf)> Acesso: 30 jan. 2017.

² Trim - é a inclinação para uma das extremidades; o navio está pesado de proa, abicado, ou tem trim pela proa, quando estiver inclinado para vante. Estará pesado de popa, apocado, derrabado, ou terá trim pela popa, quando estiver inclinado para ré. Trim é também a medida da inclinação, isto é, a diferença entre os calados avante e a ré; é expresso em metros ou em pés ingleses, dependendo da medida empregada no calado do navio. (FONSECA, 2010).

³ Adernamento - é a inclinação da embarcação sobre um dos seus bordos, *bombordo ou estibordo/boreste* (FERREIRA, 1995).

⁴ Calado - é a distância vertical entre a superfície da água em que a embarcação flutua e a face inferior da sua quilha. É a profundidade mínima de água necessária para a embarcação flutuar (FERREIRA, 1995).

água de lastro por navios como correção do decréscimo de peso recorrente ao descarregamento de carga.

Segundo a Cartilha de Conhecimentos Básicos (2009), o recolhimento e armazenagem da água de lastro no interior dos tanques varia de embarcação para embarcação. Por exemplo, os navios pioneiros ao uso da água de lastro transportavam-na dentro dos porões de carga. Além disso, em geral há dificuldades para acesso aos tanques de lastro, esses são caracterizados como insalubres, baixa luminosidade e pouca ventilação, obstando inspeções. A Figura 1 trata do convés de um navio que não dispõe de escotilha aos tanques de lastro.

Figura 1 - Sistema de lastro em navios convencionais.



Fonte: Pereira (2012).

Uma vez que a água de lastro pode ser coletada por mais de um lugar em uma mesma embarcação, Carlton (1995) enfatiza os organismos vivos transportados no interior dos tanques de lastro de navios construídos em aço, os quais comprometem a fauna aquática nativa da região onde a água de lastro é transferida, impactando negativamente. Pereira e Brinati (2008) concordam e acrescentam que essa adversidade pode inserir graves consequências à economia, ao setor industrial, e à saúde humana, mas principalmente ao cenário ambiental.

2.3 IMPACTOS DA ÁGUA DE LASTRO

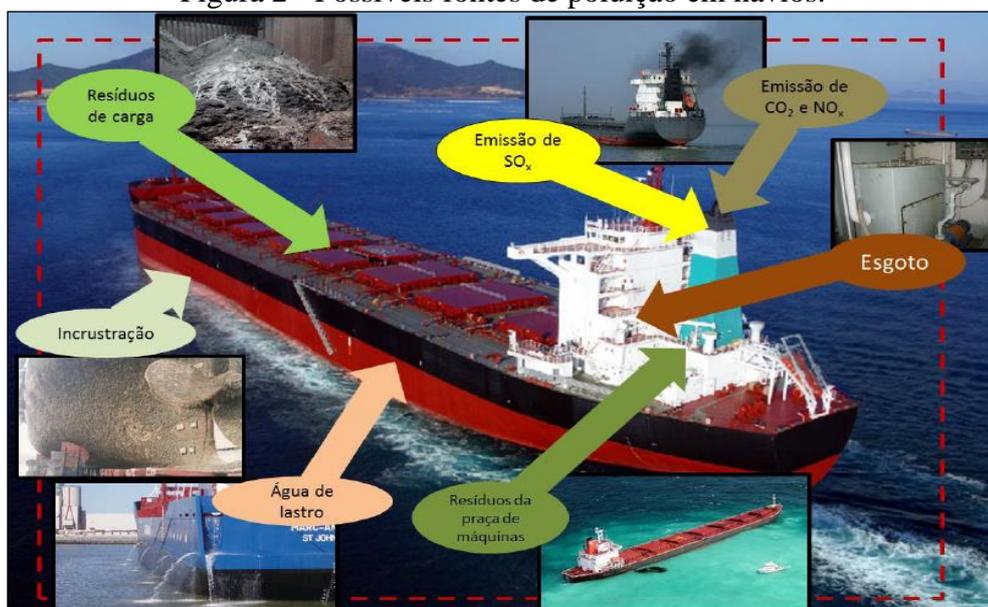
Segundo Albertini (2009), devido a expressiva intensidade e abrangência do tráfego marítimo internacional, a água de lastro se comporta como enfático vetor, o qual desempenha a movimentação transoceânica e interoceânica de organismos costeiros. Sendo assim, impacta negativamente ao introduzir bioinvasores exóticos e/ou nocivos, resultando no desequilíbrio ecológico das áreas invadidas, perda de biodiversidade, prejuízos em atividades econômicas, utilizadores de recursos naturais afetados e consequente desestabilização social de comunidades

tradicionais, além da disseminação de enfermidades em populações costeiras, causadas pela introdução de organismos patogênicos.

Ibrahin (2012) corrobora com os argumentos citados anteriormente e apresenta uma visão mais drástica ao salientar que o transporte de bionvasores apresenta possibilidade de disseminar novas espécies no local de destino, “[...] se a nova espécie encontra condições ambientais favoráveis e ausência de predadores ou competidores naturais locais, pode-se fixar e multiplicar-se, constituindo-se em uma *praga invasora*.”

Portanto, a inserção de bioinvasores em novos ambientes ocorre pela água de lastro, incrustações nos cascos e por outros fatores. Entretanto a água de lastro segundo o Ministério do Meio Ambiente, se posiciona em quarto lugar entre as maiores ameaças aos oceanos do mundo. A Figura 2 indica as fontes de poluição de uma embarcação.

Figura 2 - Possíveis fontes de poluição em navios.



Fonte: Pereira (2012).

A Figura 2 concorda com a matéria do Jornal Ciência (2009), a qual apresentou um levantamento realizado para a Convenção da Diversidade Biológica no Reino Unido, Índia, Estados Unidos, Austrália, África do Sul e Brasil, o qual relata a existência de 120 mil espécies exóticas introduzidas pelos modais existentes, como acontece com a água de lastro dos navios.

Em consequência disso, na China o prejuízo monetário estima perdas de US\$ 80 milhões por ano pelo caso do besouro *Linomyza sativae*. Outro exemplo de prejuízos são os Estados Unidos que perdem aproximadamente US\$ 200 milhões por ano com a com a bioinvasão.

Conforme o contexto mencionado, a Tabela 1 apresenta alguns casos de Bioinvasão que resultaram em prejuízos significativos.

Tabela 1 – Bioinvasores oriundos da água de lastro e os prejuízos causados a sociedade

Espécie	Local	Ano	Prejuízos
Dinoflagelados Tóxicos	Austrália	-	Possuem toxinas paralisantes e, por serem alimento de organismos filtradores, como ostras, mexilhões e peixes, podem entrar na cadeia alimentar do homem e causar paralisia respiratória e até mesmo a morte.
Mexilhão Zebra – <i>Dreissena polymorpha</i>	EUA - Grandes Lagos	Década de 80	US\$ 5 bilhões
Água Viva – <i>Mnemiopsis leidyi</i>	EUA – Mar Negro	Entre 1989 e 2000	Atingiu densidades de 1 kg de biomassa por m ² . Isso esgotou os estoques do <i>plâncton</i> nativo de tal maneira que contribuiu para o colapso de toda a pesca comercial da região.
Mexilhão Dourado - <i>Limnoperna fortunei</i>	Brasil - Sul, Sudeste e Centro-Oeste	1991	Aglomerações em admissões e descargas das tubulações e o seu consequente bloqueio, deterioração e a obstrução precoce de filtros e grades onde se incrustam, mau cheiro, além de US\$ 1 milhão a cada dia de paralisação da usina de Itaipu.
Alga - <i>Comby jelly</i>	EUA – Mar Negro	-	US\$500 milhões por ano
Siri-bidu - <i>Charybdis hellerii</i>	Costa Meridional brasileira	1993	-
Peixe Bentônica - <i>Omobranchus punctatus</i>	Brasil	2000	-

Fonte: Castro (2008).

Além dos bioinvasores, outro impacto existente refere-se à doenças patogênicas devido a bactérias presentes na água de lastro. Um estudo realizado em 2002 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) detectou a presença de bactérias marinhas cultiváveis em 71% das amostras de água de lastro analisadas, variando de 1000 até 5,4 milhões de bactérias por litro de amostra.

2.3.1 Grupo coliforme

Entre o grupo coliforme, destaca-se para este trabalho, o grupo de coliformes totais, definido como grupo de bactérias constituído por bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativos, capazes de crescer na presença de sais biliares ou outros compostos ativos de superfície, que fermentam lactose com produção de ácido e gás a 35°C. O grupo inclui os seguintes gêneros: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*.

Acresce a isto, o grupo de coliformes termotolerantes, o qual se refere aos coliformes capazes de se desenvolver e fermentar a lactose com produção de ácido e gás a temperatura de 44,5°C em 24 horas. O principal componente deste grupo é a *Escherichia coli* (FRANCO, 1983).

2.3.1.1 *Escherichia coli*

Franco (1983) define a *E. coli* como a principal bactéria do grupo de termotolerantes, associada às fezes de animais de sangue quente. Em adição a isso, pertencente à família *Enterobacteriaceae* que faz parte da microbiota normal entérica animal e humana. Segundo Castro (2003), a água do mar e a radiação solar tem efeito tóxico sobre o crescimento desta bactéria. Além disso, nos dias nublados e/ou chuvosos elas podem sobreviver por um período ainda maior, em razão disto, pode causar determinado aumento no risco de transmissão de doenças à população.

Portanto em função dos graves impactos ambientais fez-se necessário uma política e legislação adequadas para o problema da água de lastro. O Programa *GloBallast*⁵ define-se como um programa com duração de quatro anos⁶, com um orçamento total de US\$ 10,2 milhões, onde realiza assistência técnica com conscientização, avaliação de riscos, levantamento da biodiversidade local, amostragem das águas de lastro, treinamentos, assistência à elaboração de leis e regulamentos e mecanismos de autofinanciamento (CARTILHA DE CONHECIMENTOS BÁSICOS, 2009).

⁵ O Programa Global de Gestão de Água de Lastro - *GloBallast* é uma iniciativa da IMO que conta com o apoio de seus Estados Membros e da indústria do transporte marítimo, e objetiva apoiar países em desenvolvimento no manejo do problema de água de lastro e bioinvasão (BRASIL, 2004).

⁶ Inicialmente eram três anos, de março de 2000 a março de 2003. Entretanto houve uma extensão de um ano finalizando em março de 2005 (BRASIL, 2004).

2.4 LEGISLAÇÃO INTERNACIONAL

Em 1992, a Organização Marítima Internacional (IMO)⁷ a partir de solicitação da Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento (UNCED), deu início a uma abordagem sistemática para a questão da água de lastro, buscando a definição de regras adequadas, para evitar a disseminação de organismos aquáticos não nativos das regiões nas quais as descargas são realizadas. Conforme o contexto mencionado a Tabela 2 apresentam alguns países que estabeleceram penalidades e sanções extras para minimizar os riscos causados pela água de lastro.

Tabela 2 – Penalidades e sanções adotados para minimizar os riscos causados pela água de lastro na Austrália, Estados Unidos e Nova Zelândia.

País	Penalidades	Sanções
Nova Zelândia	Até 12 meses de prisão	NZ\$50,000 para o Comandante e NZ\$ 100,000 para a Companhia de Navegação.
Austrália	Proibição do navio descarregar sua água de lastro.	
Estados Unidos	Até 12 anos de prisão	De US\$ 250.000,00 (individual) até US\$ 500.000,00 por dia.

Fonte: Cartilha de Conhecimentos Básicos (2009).

2.5 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

As diretrizes impostas pela IMO estabelecem que os Estados Membros tenham determinada flexibilidade para determinar a natureza e a extensão de seus regimes nacionais de controle de água de lastro. Entretanto, no Brasil, as Normas da Autoridade Marítima para Tráfego e Permanência de Embarcação em Águas sob Jurisdição Nacional (NORMAM 08, 2000), exige que para os navios que descarregarem suas águas de lastro em águas jurisdicionais brasileiras, deve preencher o Relatório de Águas de Lastro em duas vias, uma das quais deve permanecer a bordo para eventuais fiscalizações e a outra deve ser recolhida pelo órgão federal competente.

⁷ Criada em 1948, em Genebra, a Organização Marítima Internacional (IMO) é a agência especializada das Nações Unidas que tem como objetivo instituir um sistema de colaboração entre governos no que se refere a questões técnicas que interessam à navegação comercial internacional, bem como encorajar a adoção geral de normas relativas à segurança marítima e à eficácia da navegação (Laboratório de Tecnologia e Sistemas de Informação, USP, 2004).

2.6 MÉTODO DE DESLASTREAMENTO

Conforme o mencionado anteriormente, a IMO dita as diretrizes relacionadas ao controle do transporte marítimo e gestão da água de lastro em âmbito internacional, sendo assim, o método recomendado consiste na troca oceânica da água de lastro. Segundo Procopiak (2009) e Zanella (2010), este é o único procedimento atualmente disponível em larga escala para reduzir o risco epidemiológico e ambiental dos deslastreamentos.

Assim, o procedimento baseia-se em duas propostas, sendo elas concentração de organismos que via de regra, apresenta-se menor em alto mar do que em áreas costeiras; e a probabilidade de sobrevivência de espécies oceânicas nas áreas periféricas dos portos.

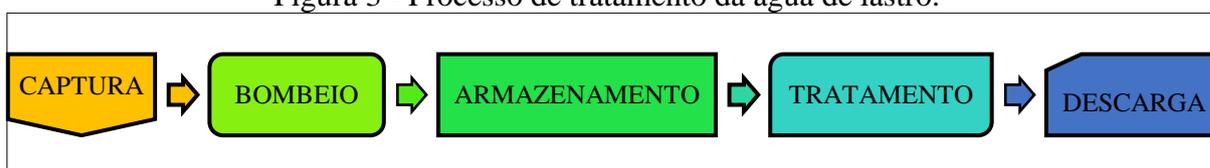
Em contrapartida, os sistemas de bombeamento da água e o desenho estrutural dos tanques de lastro, associados às limitações operacionais sob condições desfavoráveis do mar, acarretam na não realização de uma troca oceânica completa.

Portanto, nessas condições, diversas espécies sobrevivem até o fim da rota, ou seja, o porto de destino. Por fim, a troca oceânica vem se tornando opção obsoleta, visto que novas tecnologias para o tratamento da água de lastro possam ser implementadas em novas embarcações, além de adaptadas nas que já estão em operação. Outras opções em análise compreendem os métodos de tratamento a bordo (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2004).

2.7 MÉTODOS DE TRATAMENTO A BORDO

A liberação comercial de qualquer alternativa de tratamento de água de lastro passa por diversos trâmites impostos pela IMO. A Figura 3 mostra o processo e coleta de tratamento da água de lastro.

Figura 3 - Processo de tratamento da água de lastro.



Fonte: Pereira (2012).

As técnicas a seguir explanadas apresentam eficiência limitada e para alcançar valores maiores costuma-se combinar as técnicas, entretanto essa apresenta uma eficiência média de 85% em relação ao tratamento da água de lastro (PEREIRA, 2012).

2.7.1 Filtração

O sistema de filtração já existe para impedir o acesso aos tanques de organismos maiores, embora vários aspectos na engenharia dos navios precisem ser adequados à filtração para remoção de espécies indesejáveis na água de lastro, como a remoção de *zooplâncton*⁸ e algas do *fitoplâncton* (IMO, 2016).

O alto fluxo e a grande quantidade de volume, associados à carga e descarga, são desafios especiais no uso da filtragem. Além da complexidade do equipamento a ser utilizado, é necessária a análise dos custos dos filtros, que aumentam com a quantidade de organismos removidos.

2.7.2 Aquecimento

O aquecimento da água dos tanques é uma providência efetiva sem prejuízo ao meio ambiente. Este tipo de tratamento geraria algumas modificações na engenharia dos navios, pois o aquecimento causa expansão, que se estenderia por várias partes, não apenas às áreas-alvo, e assim poderia causar estresse à estrutura dos navios.

Uma ressalva faz-se necessária quanto ao tratamento térmico, pois o nível de aquecimento para mortandade das diversas espécies ainda não é totalmente conhecido e pode variar consideravelmente nos estágios de vida dos organismos envolvidos. Além disso, estágios císticos de vários organismos aquáticos podem ser resistentes a esse tipo de tratamento (RIGBY, 1994).

2.7.3 Ultravioleta

O sol emite uma luz invisível conhecida como raios ultravioleta. Este fenômeno natural é reproduzido dentro dos equipamentos de tratamento de água de lastro, ou seja, usando lâmpadas poderosas que incorporam a tecnologia necessária para emitir os raios UV-C (CASTRO, 2003).

De acordo com Mesbahi (2004), o melhor comprimento de onda para a inativação de microrganismos (vírus, bactérias, algas, fungos, bolores) é de 254 nanômetros. Assim, a luz UV-C penetra no interior do DNA dos microrganismos, perturbando o metabolismo de suas

⁸ *Zooplâncton*: Pequenos animais marinhos.

células. Em alusão a isso, a Tabela 3 apresenta os níveis de dose de UV-C (expressos em milijoules (mJ/cm^2) necessários para erradicar 99,9% dos microrganismos.

Tabela 3- Níveis de dose de UV-C em função do micro-organismo para que sejam 99,9% dizimados.

Bactéria	Doses UV-C
<i>Bacillus anthracis</i>	8,5 mJ/cm^2
<i>Escherichia coli</i>	10,5 mJ/cm^2
<i>Legionella pneumophila</i>	6,9 mJ/cm^2
<i>Salmonella enteridis</i>	9 mJ/cm^2
<i>Streptococcus faecalis</i>	10 mJ/cm^2
Algas	Doses UV-C
<i>Chlorella vulgaris</i>	22 mJ/cm^2
Protozoários	Doses UV-C
<i>Cryptosporidium</i>	16 mJ/cm^2
Vírus	Doses UV-C
<i>Hepatitis</i>	8 mJ/cm^2

Fonte: Mesbahi (2004)

A dose de UV é equivalente à energia UV que o microrganismo vivo tem que absorver para ser inativado. No âmbito de efluentes navais, um sistema apropriado com um reator UV em geral é instalado na sala da bomba central classificando-a como uma área perigosa, por exemplo, em navios petroleiros, plataformas flutuantes de produção de petróleo e em navios que transportam materiais combustíveis. Devido à demanda da fonte luminosa para que haja a eficiência do tratamento, altas tensões são necessárias para operar o reator ultravioleta.

As vantagens da implementação desse tratamento para a água de lastro se dá pela solução que reduz ou elimina o uso de químicos, respeita o meio ambiente sendo ecologicamente sustentável e pode ser usado em combinação com outras soluções de tratamento (MESBAHI, 2004). Por outro lado, Pereira (2012) acrescenta que este método perde eficiência para organismos maiores, bem como a turbidez ocasionada pelos sólidos suspensos, pois, neste caso, há redução da irradiação da luz ultravioleta.

2.7.4 Cloração

O cloro é o agente biocida mais utilizado em tratamentos de água, tendo sua eficiência comprovada principalmente em água doce. Logo, ele tem sido apontado como um método de tratamento da água de lastro de fácil aplicação, baixo custo e capaz de tratar grandes volumes de água, além da possibilidade de acrescentar esse elemento à água de lastro ou gera-lo eletroliticamente pela água do mar (ARAÚJO, 2012; SILVA E FERNANDES, 2004).

Este método já são usados a bordo de navios, não para tratamento nos tanques de lastro. Ainda que algumas embarcações não trabalhem com cloro, navios rotineiramente carregam compostos industriais perigosos e lubrificantes necessários a sua operação; logo, a preocupação com segurança em relação ao manuseio de produtos químicos a bordo não seria um impeditivo ao uso do cloro. Em virtude da formação de Trihalometanos⁹ (THM), alternativas à cloração vêm sendo utilizadas. Dióxido de cloro (ClO₂) e O₃ são desinfetantes efetivos, apesar de mais caros e de difícil aplicação e controle, mas os riscos associados aos seus subprodutos são menores do que o uso do cloro (ARAÚJO, 2012).

2.7.5 Ozonização

O ozônio é definido como um biocida, o qual é usado no tratamento de água potável e em indústrias, não formando subprodutos tóxicos em água doce. Essa substância se caracteriza como um poderoso agente, a qual elimina vírus e bactérias, incluindo esporos, quando usado como desinfetante nos tratamentos de água convencional (ARAÚJO, 2012).

No entanto Silva e Fernandes (2004) alertam que este biocida em contato com água salgada e salobra produz os mesmos resíduos que o cloro, sendo que o ozônio é um gás instável e altamente corrosivo, além de muito caro. Do mesmo modo, Wu *et al* (b) (2011) afirma que a ozonização apresenta excelente tecnologia para a desinfecção de água. Entretanto determinados microrganismos, como o nodavírus do alabote do Atlântico (AHNV) e o vírus da anemia

⁹ O THM é formado na mistura de cloro com compostos orgânicos presentes naturalmente na água, e é classificado como cancerígeno. Os níveis de THM tendem a aumentar com o pH, a temperatura, o tempo e com a quantidade de matéria orgânica presente. O cloro é o agente biocida mais utilizado no mundo para tratamento de esgotos. Em geral, costuma-se neutralizar a água antes de utilizar o cloro. As desvantagens em utilizar o cloro em água de lastro é porque a água do mar possui pH alcalino em torno de 8, resultando na produção de THM, e “uma vez liberado, este produto persiste no meio ambiente, espalhando-se através da cadeia trófica, acumulando-se no tecido adiposo, destruindo e bloqueando o sistema hormonal.” (JENNER *et al.*, 1997 *apud* SILVA; FERNANDES, 2004, p. 28).

infeciosa do salmão (ISAV), mostraram elevada resistência à água do mar ozonizada, limitando o processo para o tratamento da água de lastro.

2.7.6 Eletrólise

O método é composto por um sistema de eletrólise que envolve a desinfecção da água de lastro através da geração de radicais livres de cloro, hipoclorito de sódio e hidroxila, sem a adição ou mistura de quaisquer outros produtos químicos. Entretanto, o hipoclorito contido na água de lastro eletrolítica é introduzido no restante da água de lastro para ser esterilizado.

Além disso, essa técnica não requer o armazenamento de produtos químicos a bordo do navio, o que evita problemas de segurança, mas essa tecnologia é restrita aos navios que operam em água salgada ou salobra (ARAÚJO, 2012).

2.8 OS PROCESSOS DE OXIDAÇÃO AVANÇADOS INSERIDOS AO TRATAMENTO DE ÁGUA DE LASTRO

Brito e Silva (2012) concordam que há expressiva eficiência em termos de tecnologia para tratamento de efluentes no que diz respeito à degradação de substâncias contaminantes, a fim de caracterizá-las como compostos inóxicos ou até mesmo inertes.

Aprofundando o tratamento da questão, Mourão et al. (2009) consideram que os Processos de Oxidação Avançados, expressos na Tabela 4, são oriundos das reações de oxidação-redução, onde a mecânica vital constitui na concepção de agentes demasiadamente reativos, ou seja, instruídos na remoção dos substratos de interesse.

Tabela 4 – Sistemas Típicos de Processos de Oxidação Avançados.

Processo	Homogêneo	Heterogêneo
Com Irradiação	O ₃ /UV	Fotocatálise Heterôgenea TiO ₂ /O ₂ /UV
	H ₂ O ₂ /UV	
	O ₃ /H ₂ O ₂ /UV	
	Fe ²⁺ /H ₂ O ₂ /UV (Foto- Fenton)	
Sem Irradiação	O ₃ /OH [•]	O ₃ /Catalisador
	O ₃ /H ₂ O ₂	
	Fe ²⁺ /H ₂ O ₂ (Reativo de Fenton)	

Fonte: Fioreze, Santos e Schmachtenberg (2014).

Interpolando uma posição mais completa, Souza et al. (2013) descreve os POA em sistemas homogêneos e heterogêneos, onde os radicais hidroxila (OH[•]) são gerados com ou sem irradiação ultravioleta.

Abordando a questão com uma maior amplitude, Lacey e Schirme (2008) postulam que o mecanismo da fotocatalise, expresso na Figura 5, “[...] consiste na quebra de uma molécula (*lise* ~ quebra), por meio do uso de cargas positivas e negativas que são formadas na superfície de um catalisador que é, por sua vez, excitado pela luz (*foto* ~ luz) ”.

Vale ressaltar que os POA's são processos limpos e não seletivos, ou seja, são capazes de efetuar a degradação de inúmeros compostos sem que haja à presença de outros. Além de apresentarem benefícios em relação ao elevado poder oxidante, a custo, qualidades organolépticas da água tratada, entre outros (ANDREOZZI et al., 1999).

Tendo em vista que a água de lastro pode ser caracterizada como uma água contaminada por compostos orgânicos, os POA's apresentam-se como uma alternativa promissora para o tratamento da água de lastro. Do mesmo modo que Mourão et al. (2009) consideram que nos últimos anos tem havido um crescente interesse nos POA's como uma opção para desinfecção de efluentes contendo microrganismos.

2.9 FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA

Rosa (2014), Rodrigues et al. (2000) e Sirtori (2006) revelam perspectivas semelhantes sobre a correlação entre a estrutura cristalina do catalisador e suas características com o princípio fundamental da fotocatalise heterogênea. Do mesmo modo que Lacey e Schirme (2008) consideram que a nanoestrutura cristalina do catalisador influi no contato com as moléculas futuramente deterioradas, faz-se necessário entender os conceitos da nanotecnologia¹⁰.

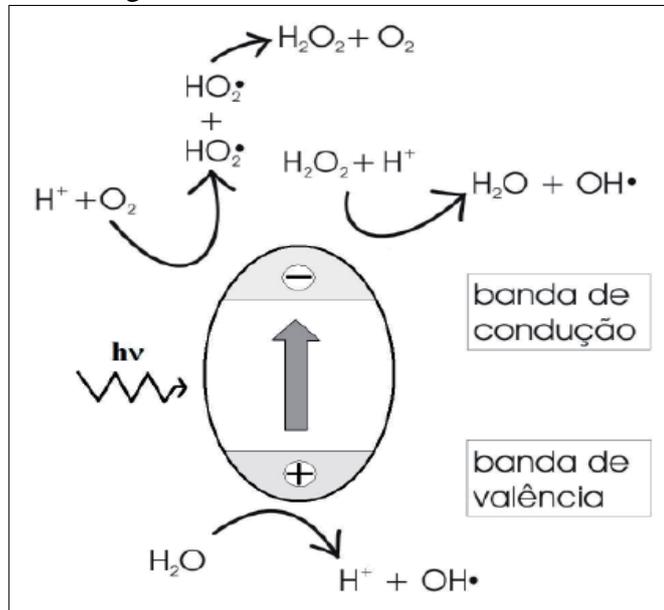
Feng, Xu, e Liu (2015) é favorável a visão de Zhang, Hu e Shan (2014) no que se refere aos compostos de oxigênio (O₂), radicais hidroxila (OH[·]), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), como componentes intermediários de cunho reativo elevado, produzidos a partir do processo da fotocatalise. Em adição a isso, Sirtori (2006) e Cruz et al. (2010) revelam perspectivas semelhantes sobre os radicais gerados a partir da suficiente irradiação de uma fonte energética luminosa sobre o composto fotocatalisador, capaz de suprir a energia de *bandgap*¹¹. Sendo assim, há formação de duas *bandas*, uma de valência, onde o elétron foi retirado e

¹⁰ A nanotecnologia é a ciência da pesquisa e produção na escala nano, ou escala atômica. O princípio básico da nanotecnologia é a construção de estruturas e novos materiais a partir dos átomos.

¹¹ Define-se como a energia necessária para promover elétrons da banda de valência para a banda de condução (LACEY; SCHIRME, 2008).

formou-se uma lacuna, e outra de condução, onde o elétron foi depositado, como o representado pela Figura 4.

Figura 4 - Mecanismo da fotocatalise.



Fonte: Lacey e Schirme (2008).

Entretanto, quando há interrupção do fornecimento de energia luminosa, o fotocatalisador retorna ao seu estado inicial inativo (VARGAS, 2015). Wu et al. (a) (2011) e Wu et al. (b) (2011) afirmam que uma molécula de água quando entra em contato com o catalisador no seu estado excitado reage com o par elétron/lacuna em sua superfície e geram $\cdot OH$.

Reforçando essa ideia, Paschoalino (2006) complementa que estas lacunas mostram potenciais bastante positivos, na faixa de +2,0 a +3,5 V, dependendo do semicondutor e do pH. O potencial gerado é suficientemente positivo para gerar radicais OH^\bullet a partir de moléculas de água adsorvidas na *banda* de valência do semicondutor. Em contrapartida, o elétron da *banda* de condução reage com o oxigênio do ar, gerando espécies reativas como o peróxido e ânions superóxidos.

Conforme Rodrigues *et al.* (2000) consideram profícuo o processo de desinfecção por fotocatalise heterogênea, pois atua tanto a oxidação quanto a diminuição de poluentes orgânicos e inorgânicos.

Sirtori (2006) é favorável a visão de Ferreira (2005) do processo de fotocatalise heterogênea, no que se refere a manutenção do catalisador eletricamente neutro ocorrer simultaneamente com o efeito da oxidação e redução, tal preservação possibilita a ação da lacuna e dos elétrons fotogerados, respectivamente. Nesse sentido, a eficiência fotocatalítica

emana da relação competitiva entre a recombinação elétron-lacuna e os processos de reação do elétron com as espécies químicas da superfície do catalisador.

De acordo com Mourão et al. (2009), a fotocatalise heterogênea se difere dos sistemas típicos de Processos De Oxidação Avançados (POA's) em relação ao consumo de energia, uma vez que as técnicas atribuídas a ativação dos catalisadores carecem de fontes de luz que podem ser renováveis. Sob tal enfoque, Vargas (2015) acrescenta que entre os catalisadores utilizados em questões ambientais destaca-se o dióxido de titânio (TiO_2), por apresentar características inertes, estáveis frente a fotocorrosão do ponto de vista biológico e químico, além do menor custo em relação aos outros catalisadores disponíveis.

2.10 DIÓXIDO DE TITÂNIO

O TiO_2 é a substância mais largamente utilizada no mundo como pigmento branco. Ele é estável quimicamente, não apresenta toxicidade e é de custo relativamente baixo. Segundo Paschoalino (2006) houve diversos estudos que explanam a ação biocida do processo de fotocatalise heterogênea utilizando o TiO_2 como semicondutor. Entre eles destacam-se a ação oxidante referente ao método envolvendo a luz ultravioleta como mencionado anteriormente. Tendo em vista a desinfecção de efluentes, o método em questão causa danos na parede celular e na membrana citoplasmática, elevando gradativamente a permeabilidade celular, viabilizando a fluência do conteúdo intracelular, que destina à morte do microrganismo.

Além disso, Wu et al. (b) (2011) ponderam que recentemente, as técnicas que englobam a inativação de microrganismos por meio fotocatalítico (UV/ TiO_2), não geram compostos halogêneos com odores indesejáveis. Por sua vez, Rodrigues et al. (2000) retratam a desinfecção por luz ultravioleta (UV) em relação a remoção de bactérias eficiente, uma vez que a mesma não consegue a recuperação dos danos oriundos da radiação.

Considerando a água de lastro como substrato para a desinfecção, o processo de fotólise, ou seja, sem a presença do semicondutor, expressa maior conhecimento em estudos e equipamentos para sua utilização como o descrito anteriormente. Em relação ao uso da fotocatalise heterogênea (UV/ TiO_2) na desinfecção de água de lastro, os estudos ainda se mostram embrionários como o exposto no tópico a seguir.

2.11 FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA APLICADA À ÁGUA DE LASTRO

O refinamento bibliográfico foi oriundo de bibliotecas digitais e sites para pesquisas científicas, a fim de assegurar a confiabilidade do embasamento teórico envolvido no trabalho em questão. Tendo em vista que o Portal de Periódicos da Capes compreende em seu acervo mais de 37 mil publicações periódicas, internacionais e nacionais, e à diversas bases de dados que reúnem inúmeros tipos de materiais, os quais cobrem todas as áreas do conhecimento (BRASIL, 2017), vale ressaltar que ao examinar a base de dados do Portal de Periódicos da Capes com as palavras chaves: ‘*water ballast treatment*’ e ‘*photocatalysis*’, verificou-se exíguos estudos relacionados ao tema, como mostra a Tabela 5 a seguir.

Tabela 5 - Estudos encontrados sobre o método de fotocatalise heterogênea aplicado a água de lastro

Fotocatálise	Objetivo	Conclusão	Referência
TiO ₂ Imobilizado por luz pulsada.	Inativação da alga <i>Heterosigma akashiwo</i>	Apresenta bom potencial para o tratamento da água de lastro	Feng, Xu e Liu (2015)
UV/TiO ₂	Prevenção a invasão de espécies	Eficiente e relativamente rentável para o tratamento a bordo	Zhang, Hu e Shan (2014)
UV/Ag–TiO ₂ /O ₃	Inativação da bactéria <i>Amphidinium sp</i>	O processo apresenta flexibilidade em lidas com diferentes águas de lastro, além de ser considerada uma boa solução ao considerar as restrições dos navios em relação a custo e/ou espaço e o potencial de corrosão.	Wu et al (a). (2011)
UV/Ag–TiO ₂ /O ₃	Inativação da bactéria <i>Escherichia coli</i>	Eficiente para a inativação da bactéria encontrada na água de lastro	Wu et al (b). (2011)
UV-C + TiO ₂	Desinfecção da água de lastro	A fotocatalise pode acelerar os processos de lastreamento e deslastreamento, se a quantidade de luz ultravioleta for inferior do que o pretendido.	Martínez et al. (2014)

Fonte: Brasil (2017).

O conteúdo exposto na Tabela 6 representa recentes publicações, ou seja, oferece um vasto campo a ser estudado, bem como diversos aspectos a serem explorados. Martínez *et al* (2014) ressaltam a aplicação eficiente da fotocatalise com dióxido de titânio (UV/TiO₂) para a inativação de organismos encontrados na água de lastro comparado à aplicação da fotólise (UV). Em alusão a isso, pesquisas recentes apontam a substituição de partículas de dióxido de titânio (TiO₂) por filmes finos desse semicondutor para o tratamento de água de lastro por meio do catalisador imobilizado. A explicação para essa substituição aplica-se a dificuldade exercida pelos processos de separação e reutilização. Reforçando essa ideia, Feng, Xu e Liu (2015)

consideram que a taxa de degradação fotocatalítica aumenta com o número de camadas aplicadas do filme fino de dióxido de titânio (TiO₂). Conforme o experimento para a inativação da alga *Heterosigma akashiwo*, o valor mais elevado atinge 67,1%, após 150 minutos da degradação, com três camadas do fotocatalisador.

Diante ao conteúdo abordado pelos trabalhos abrangidos neste tema, Zhang, Hu e Shan (2014) e Wu *et al* (b) (2011) expressam a combinação de um método convencional ao processo fotocatalise heterogênea para o tratamento da água de lastro, cuja a finalidade é garantir eficiência necessária para sobressair aos métodos quando aplicados isoladamente. Pela observação dos aspectos analisados, vale ressaltar as novas configurações de catalisador implementadas aos processos fotocatalíticos, como nanopartículas imobilizadas em nanopolímeros transfigurando-os em nanocompósitos para desinfecção e degradação. Em face a essa realidade, Rosa (2014) acresce que os resultados desse tipo de configuração vêm sendo satisfatórios em termos de eficiência.

2.12 NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS E NANOCELULOSE

Koo (2006), autor especialista em polímeros, define os nanocompósitos poliméricos como materiais formados a partir da dispersão de nanopartículas, com ao menos uma das dimensões em 100 nm, em uma matriz polimérica. Portanto, o novo material formando possui características e funcionalidades que não estão presentes em cada um deles quando sozinhos.

A classificação apresentada por Pradella (2006) diz que os biopolímeros são polímeros ou copolímeros produzidos a partir de matérias-primas de fontes renováveis, como: milho, cana-de-açúcar, celulose, quitina, e outras. Os nanocompósitos de matriz biopolimérica apresentam maior fotoestabilidade e maior eficiência na transferência de elétrons, o que permite diversas aplicações importantes.

Então, sob tal ponto de vista Eichhorn et al.(2001) enfatiza que a celulose desponta como um material promissor, uma vez que esse polissacarídeo é relativamente inerte frente a muitos solventes, possui propriedades mecânicas elevadas, boa resistência térmica, densidade baixa, é biodegradável, além de ser o polímero natural mais abundante na Terra. Além disso, as fibras naturais de celulose apresentam morfologia de ordem nanométrica permitindo métodos relativamente simples, ambientalmente corretos, com baixo custo, os quais que podem levar a formação de nanoestruturas sofisticadas (KEMELL et al., 2005).

2.12.1 Nanocompósito de Celulose Bacteriana + Dióxido de Titânio

A celulose bacteriana (CB) se classifica como biopolímero de alta resistência à tração, biocompatibilidade, elevada capacidade de absorção e cristalinidade. A CB, constituída por uma rede de nanofibras, tem uma elevada capacidade de absorver e reter uma quantidade de água superior a 90% do seu volume. Além disso, a água absorvida e retida pode ser removida por meio de um processo de secagem. Todavia, após a secagem, a reabsorção é limitada aproximadamente 6% em volume. (RECOUVREUX et al., 2011; KRAMER et al., 2006; KLEMM et al., 2006)

Em alusão a isto, Brandes (a) (2017) propõe em seu estudo, a produção de um nanocompósito constituído por nanofibras de CB e nanopartículas de TiO_2 (CB/ TiO_2), em função das propriedades das nanofibras de CB para imobilizar as nanopartículas de TiO_2 . Visto que para aplicações elétricas, fotocatalíticas e biomédicas, a importância do emprego dessas nanopartículas devem respeitar os requisitos expostos na Tabela 6.

Tabela 6- Requisitos para um suporte adequado ao TiO_2

Requisitos para um suporte adequado ao TiO_2		
Boa estabilidade mecânica;	Apresentar boa capacidade de adsorção para os compostos orgânicos a serem degradados;	Ser quimicamente inerte;
Translúcido a radiação UV;	Apresentar configuração física que favoreça a separação fase sólida- fase líquida;	Facilitar processos de transferência de massa;

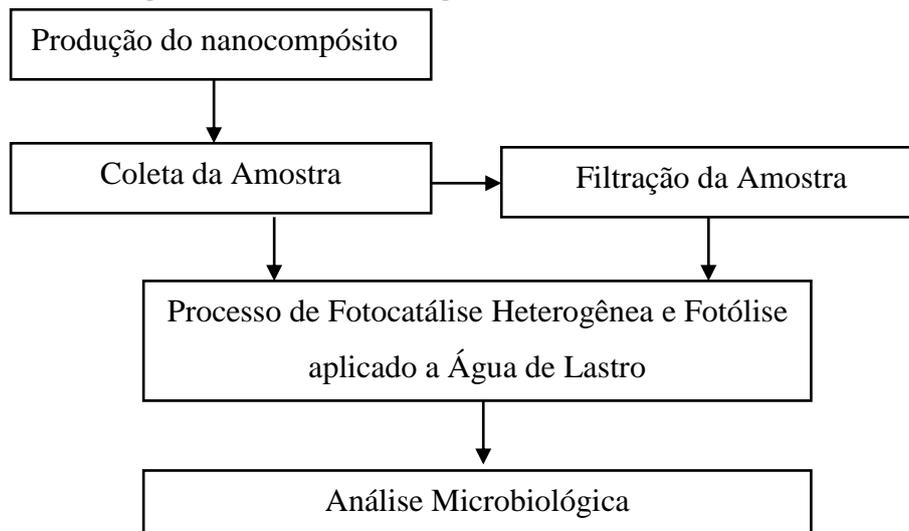
Fonte: Paschoalino (2006).

Pela observação dos aspectos analisados, o trabalho em questão aplica o estudo realizado por Brandes (b) (2017), em processo fotocatalítico para tratamento da água de lastro de cunho inovador. Uma vez que não há contribuições dessa natureza disponíveis na literatura.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo será apresentado o conjunto de processos, técnicas e ferramentas utilizadas no desenvolvimento deste trabalho. A metodologia inclui: a produção de um nanocompósito polimérico, constituído de nanopartículas de dióxido de titânio imobilizadas na rede de nanofibras de CB; o tratamento por fotocatalise da água de lastro, utilizando o nanocompósito polimérico produzido; e a análise microbiológica realizada para detectar a presença do grupo coliforme na água de lastro com e sem tratamento fotocatalítico. A Figura 5 resume a metodologia dos ensaios realizados para o desenvolvimento deste trabalho.

Figura 5- Fluxograma com a metodologia utilizada no desenvolvimento deste trabalho.



Fonte: A autora (2017).

Os testes executados foram realizados nas dependências do CTJ/UFSC de Joinville, no Laboratório de Polímeros e Materiais Compósitos (LPMC).

3.1 PRODUÇÃO DO NANOCOMPÓSITO DE CELULOSE/ TiO₂

A produção do nanocompósito de Celulose/TiO₂ foi separada em duas etapas: produção biotecnológica da celulose bacteriana, ou seja, a matriz polimérica do material

compósito, seguindo pela imobilização de nanopartículas em dióxido de titânio na matriz de CB produzida.

3.1.1 Microrganismo e Preparação do Inóculo

A bactéria *Komagataeibacter hansenii*, ATCC 23769, obtida da Coleção de Culturas Tropicais (CCT) - Fundação André Tosello, foi utilizada para a produção dos discos de nanofibras de CB para este estudo. Para a preparação do meio de cultivo, tanto para o inóculo quanto para a produção dos discos de CB, utilizaram-se as quantidades da Tabela 7. As quantidades foram homogêneas e autoclavadas a 121°C por 20 minutos para a esterilização.

Tabela 7- Preparação do Meio de Cultivo

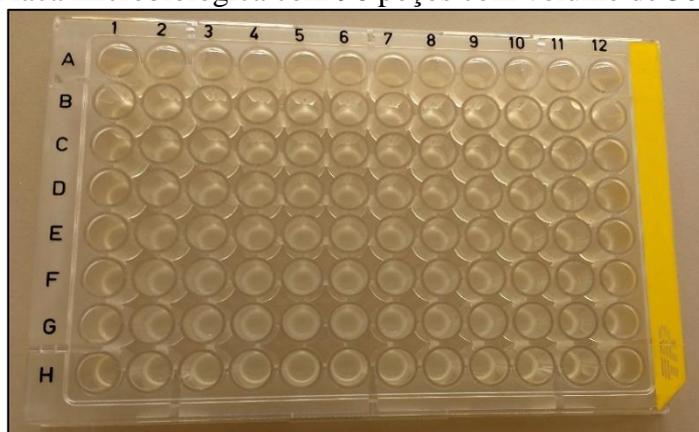
Materiais	Quantidade
Manitol	25 g·L ⁻¹
Extrato de levedura	5 g·L ⁻¹
Peptona	3 g·L ⁻¹
Água Destilada	1000 ml

Fonte: A autora (2017).

3.1.2 Produção Biotecnológica de Celulose Bacteriana

Os discos de CB para a incorporação do TiO₂ foram preparados da seguinte forma: foi preparada uma solução contendo o meio de cultivo descrito na Tabela 7, estéril, e 10% (v/v) do inóculo previamente preparado. Então foram distribuídas 100 µl desta solução em cada poço das placas de cultura (Figura 6) e mantidos a 30°C durante quatro dias, em condições estáticas.

Figura 6- Placa microbiológica com 96 poços com volume de 300 µl cada poço.



Fonte: A autora (2017).

Após este período os discos de CB produzidos foram coletados e submetidos a um processo de purificação em uma solução de NaOH 0,1 M a 60°C por 24 h. Na sequência os

discos foram lavados com água até pH neutro e submetidos ao processo para a incorporação do TiO_2 .

3.1.3 Incorporação de Dióxido de Titânio em nanocelulose

Esta etapa finaliza o processo de formação do material nanocompósito. Para tal fase, o método estudado por Brandes (a) (2017) foi utilizado, o qual expressa a solução aquosa pelas quantidades mostradas pela Tabela 8.

Tabela 8 - Materiais e quantidades para a imobilização de TiO_2 em nanofibras de CB.

Materiais	Quantidade
Dióxido de Titânio (Evonik Degussa, P-25)	0,5 g
Água deionizada	25,0 ml
CB em estado hidrogel	2,0 g

Fonte: Brandes (2017).

Foi preparada uma dispersão aquosa de nanopartículas de TiO_2 em água deionizada e adicionou-se os discos de CB (hidrogel). Na sequência, colocou-se a dispersão de TiO_2 + CB (hidrogel) sob agitação mecânica, por meio do agitador Orbital (Tecnal TE-424) durante 3 h, a 150 rpm, em uma temperatura constante de 30°C. Por fim, com a incorporação finalizada, os discos do nanocompósito CB/ TiO_2 formados foram lavados com água destilada até pH neutro, congelados e secos por liofilização. A liofilização é uma técnica de desidratação em que o produto congelado é mantido a temperatura de -50°C e a água congelada da amostra é retirada sob vácuo, ou seja, é sublimada. O processo de liofilização permite retirar a água das amostras e manter a sua estrutura tridimensional, sem que as nanofibras de celulose sejam colapsadas. Isto permite maior interação do TiO_2 com as nanofibras.

Após o processo a solução aquosa de dióxido de titânio residual foi depositada em uma placa de Petri e seca em estufa à 30°C até massa constante para o reaproveitamento do TiO_2 .

3.1.4 Caracterização Morfológica de CB e do Nanocompósito CB/ TiO_2

A caracterização morfológica de amostras de CB e do nanocompósito CB/ TiO_2 foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. Para as observações de MEV as amostras liofilizadas de CB e do nanocompósito CB/ TiO_2 foram colocadas sobre um suporte de alumínio e a superfície foi recoberta com uma camada de ouro, utilizando um metalizador Leica EM

SCD 500. As visualizações foram realizadas em um microscópio da marca JEOL modelo JSM-6390 LV. Os elétrons foram acelerados com uma tensão de 10kV.

3.2 COLETA DA AMOSTRA

As amostras da água de lastro utilizadas para o experimento em questão foram cedidas por uma Companhia de Navegação Nacional, a qual prefere manter sua propriedade intelectual em sigilo. Os frascos de coleta foram previamente autoclavados com oito gotas de solução de Tiosulfato de Sódio como mostra a Tabela 9.

Tabela 9- Preparação da Solução de Tiosulfato de Sódio a 10%

Solução de Tiosulfato de Sódio a 10%	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Foi dissolvido 10 gramas de Tiosulfato de Sódio em 100 ml de água destilada; ▪ Esterilizou-se à 121°C em autoclave durante 20 minutos.
---	---

Fonte: A autora (2017).

Após o recebimento das amostras, estas foram acondicionadas em caixa isotérmica com gelo, transportadas ao laboratório e mantidas sob refrigeração até o início das análises, em período não superior a vinte e quatro horas, conforme recomenda Funasa (2013).

▪ Filtração Prévia

A filtração realizada na amostra foi por meio de papel filtro qualitativo confeccionados manualmente em forma de funil, esterilizados à 121°C em autoclave durante 20 minutos.

Ao fim da realização dos tratamentos da amostra coletada, a Tabela 10 expressa um resumo das amostras para execução da análise microbiológica. Portanto, as amostras sujeitas a análise microbiológica, estão representadas de acordo com o seu processo e sua condição prévia. As amostras previamente filtradas estão descritas pela letra (F), assim como as amostras sujeitas ao processo Fotocatalítico são retratadas pelas letras (FC), bem como o processo de Fotólise pelas letras (FT). Entretanto, para que houvesse efeito comparativo aos métodos de tratamento, a amostra sem tratamento (ou amostra ‘branco’), representada pela letra (B), fez-se necessária para que houvesse a comparação da eficiência do processo.

Tabela 10- Resumo das amostras para execução da análise microbiológica.

Identificação da Amostra	Processo Prévio ao Tratamento	Tipo de Tratamento
(FC) (F)	Filtração	Fotocatálise
(FC)	Nenhum	Fotocatálise

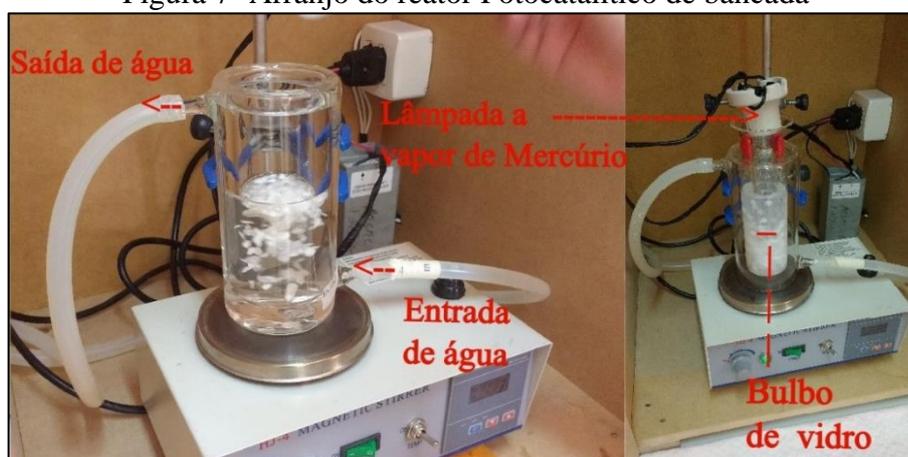
(FT) (F)	Filtração	Fotólise
(FT)	Nenhum	Fotólise
(B) (F)	Filtração	Nenhum
(B)	Nenhum	Nenhum

Fonte: A autora (2017).

3.3 PROCESSO DE FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA APLICADO A ÁGUA DE LASTRO EM ESCALA DE BANCADA

O arranjo experimental fotocatalítico empregado no tratamento da água de lastro foi baseado no estudo realizado por Cruz et al. (2010). A disposição do sistema para a execução do tratamento de fotocatalise é constituído de uma câmara de proteção confeccionada em madeira, um reator com sistema de refrigeração por água e agitação, uma lâmpada de vapor de mercúrio (Philips HPL-N 125 W) com bulbo de vidro (pyrex), posicionada no interior do reator, havendo circulação da amostra a ser tratada ao redor do bulbo, conforme pode ser observado na Figura 7.

Figura 7- Arranjo do reator Fotocatalítico de bancada



Fonte: A autora (2017).

Os parâmetros empregados neste processo fotocatalítico foram determinados a partir do experimento preliminar explanado no próximo subtópico.

3.3.1 Tratamento Fotocatalítico Preliminar

Visando obter os parâmetros operacionais relativos ao tempo de tratamento fotocatalítico realizou-se um estudo preliminar, variando o tempo de tratamento e mantendo-se fixa a quantidades do nanocompósito CB/TiO₂. Para isto, utilizou-se amostra de água oriunda

da Baía da Babitonga, coletada no trapiche do Parque Porta do Mar em Joinville. O tempo de reação utilizado nos testes está exposto na Tabela 11, com a massa constante de nanocompósito equivalente a 10 gramas. A melhor condição deste experimento foi aplicada aos tratamentos fotocatalíticos realizados com água de lastro.

Tabela 11 - Parâmetros operacionais no processo fotocatalítico preliminar.

Tempo de Reação	Massa do Nanocompósito
20 minutos	10 g
40 minutos	10 g
60 minutos	10 g

Fonte: A autora (2017).

O tratamento consistiu em utilizar o reator, com fluxo de água para refrigeração, como mostrado na Figura 7, para expor a amostra de água ao processo fotocatalítico. Para isto, 150 ml de amostra de água filtrada e não filtrada, na presença no nanocompósito CB/TiO₂, foram mantidos expostos a uma lâmpada de vapor de mercúrio, sob agitação, diante aos tempos de reação equivalente a 20, 40 e 60 minutos. Na sequência foi realizada a análise microbiológica por meio da Técnica de Fermentação por Tubos Múltiplos.

.Processo de Fotólise aplicado a Água de Lastro

Em alusão ao processo de Fotocatálise, este processo isenta-se de catalisador. Ou seja, realiza a desinfecção da água de lastro unicamente por meio de radiação UVA, a fim de realizar a comparação entre os métodos, uma vez que o tratamento através da radiação UVA já existe no âmbito dos tratamentos de efluentes navais.

Portanto, analogamente foi utilizado o mesmo arranjo do processo fotocatalítico, com 150 ml da amostra da água de lastro filtrada e não filtrada, porém sem a presença do nanocompósito CB/TiO₂, diante ao tempo de reação equivalente a 40 minutos. Na sequência foi realizada a análise microbiológica por meio da Técnica de Fermentação por Tubos Múltiplos.

3.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Segundo Franco (1983), a análise microbiológica da água pode ser conduzida para investigar a presença ou a ausência de microrganismos, afim de quantificá-los, identificá-los e caracterizá-los nas diferentes espécies microbianas. Com o intuito de realizar a análise microbiológica faz-se necessário determinados meios de cultivo para inoculações posteriores.

A Tabela 12 expressa o feitiço do meio de cultura Caldo Lactosado, representado pelas letras C.L, é definido como meio de enriquecimento, no qual as concentrações de lactose e peptona fornecem condições ótimas para o crescimento de bactérias do grupo coliforme.

Tabela 12- Preparação do meio de cultura: Caldo Lactosado (C.L)

<p>Caldo Lactosado (C.L) - concentração dupla (Válido por uma semana)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Foi dissolvido 1,3 gramas do meio de cultivo em 50 ml de água destilada; ▪ Distribui-se 9 ml do meio em cada tubo de ensaio, contendo o tubo Durham para que todos os tubos fossem tampados; ▪ Esterilizou-se a 121°C em autoclave durante 20 minutos.
<p>Caldo Lactosado (C.L) - concentração simples (Válido por uma semana)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Foi dissolvido 1,3 gramas do meio de cultivo em 100 ml de água destilada; ▪ Distribui-se 9 ml do meio em cada tubo de ensaio, contendo o tubo Durham para que todos os tubos fossem tampados; ▪ Esterilizou-se a 121°C em autoclave durante 20 minutos.

Fonte: FUNASA (2013).

Já a Tabela 13 expressa o feitiço do meio de cultura Caldo Lactosado Verde Brilhante e Bile a 2%, representado pelas letras C.L.V.B, o qual define-se como meio seletivo em que ocorre inibição de bactérias Gram-positivas e de bactérias esporuladas fermentadoras de lactose, permitindo um bom desenvolvimento de bactérias do grupo coliforme.

Tabela 13- Preparação do meio de cultura: Caldo Lactosado com verde brilhante e bile a 2% (C.L.V.B)

<p>Caldo Lactosado Verde Brilhante e Bile a 2% (C.L.V.B) (Válido por uma semana)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Foi dissolvido 6 gramas do meio de cultivo em 150 ml de água destilada; ▪ Distribui-se 10 ml do meio em cada tubo de ensaio, contendo o tubo Durham para que todos os tubos fossem tampados; ▪ Esterilizou-se a 121°C em autoclave durante 20 minutos.
---	--

Fonte: FUNASA (2013).

Similarmente, a Tabela 14 expressa a preparação do meio de cultura para Coliformes Termotolerantes E.C. Este meio de cultivo define-se como seletivo para detecção de coliformes termotolerantes, em que os sais biliares inibem o crescimento de formas esporuladas e de bactérias Gram-positivas, cuja incubação a $44,2 \pm 0,5^\circ \text{C}$ permite a seleção dos coliformes de origem fecal (coliformes termotolerantes).

Tabela 14- Preparação do meio de cultura para Coliformes Termotolerantes (E.C)

Meio para Coliformes Termotolerantes (EC) (Válido por 96 horas).

- Foi dissolvido 5,55 g do meio de cultivo em 150 ml de água destilada;
- Então distribui-se 10 ml do meio em cada tubo de ensaio, contendo o tubo Durham para que todos os tubos fossem tampados;
- Esterilizou-se a 121°C em autoclave durante 20 minutos.

Fonte: FUNASA (2013).

Por fim, a Tabela 15 expressa o feitiço do meio de cultura para contagem de bactérias heterotróficas.

Tabela 15-Preparação do meio de cultura para contagem de bactérias heterotróficas

Meio para contagem de bactérias heterotróficas (PCA)

- Foi dissolvido 5 g de Peptona ou Triptona + 2,5 gramas de Extrato de levedura + 1 g de Glicose + 15 g de Agar em 1000 ml de água destilada;
- O pH da solução foi corrigido para 7,0;
- Esterilizou-se a 121°C em autoclave durante 20 minutos.

Fonte: FUNASA (2013).

Além dos meios de cultura expostos, a análise microbiológica foi dividida em dois métodos: Primeiramente pela Técnica de Fermentação por Tubos Múltiplos, seguido com a Contagem de bactérias Heterotróficas.

3.4.1 Técnica de fermentação em Tubos Múltiplos para determinação do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais e Coliforme Termotolerantes

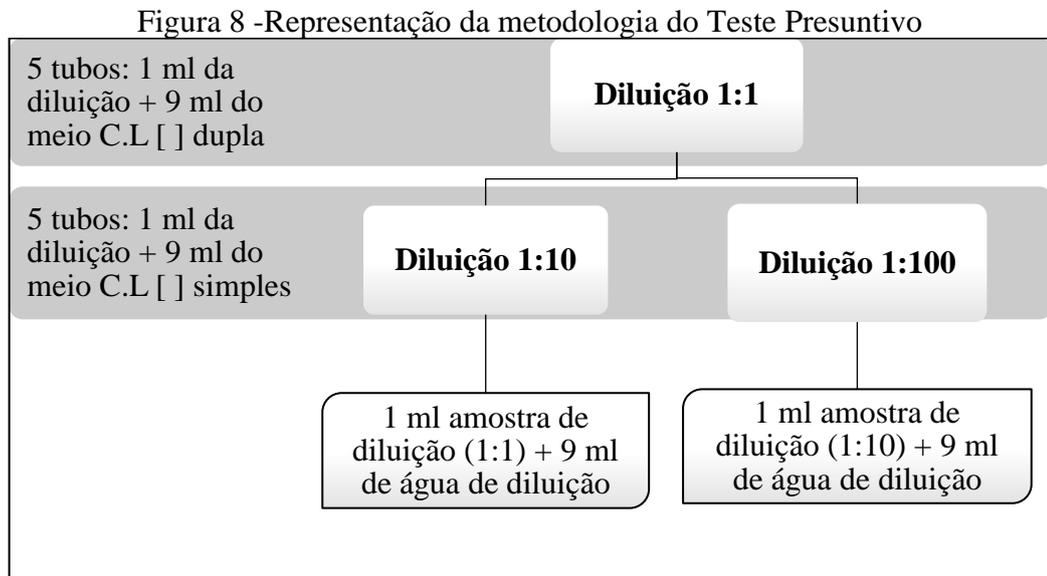
Esta técnica é a mais tradicional para a análise do Grupo Coliforme. Tal metodologia permite a quantificação por Número Mais Provável (NMP¹²) de microrganismos, sendo dividida em dois testes sucessivos, um Presuntivo e outro Confirmativo. Assim, o último teste realiza-se somente se houver crescimento positivo na etapa Presuntiva.

3.4.1.1 Teste Presuntivo

O procedimento do Teste Presuntivo consiste em fazer a homogeneização e diluições da amostra para os tubos de ensaio (Figura 8), contendo, no fundo, um tubo invertido para coleta

¹² NMP: É a estimativa da densidade de bactérias em uma amostra, calculada a partir da combinação de resultados positivos e negativos, obtidos através da aplicação da Técnica de Fermentação por Tubos Múltiplos.

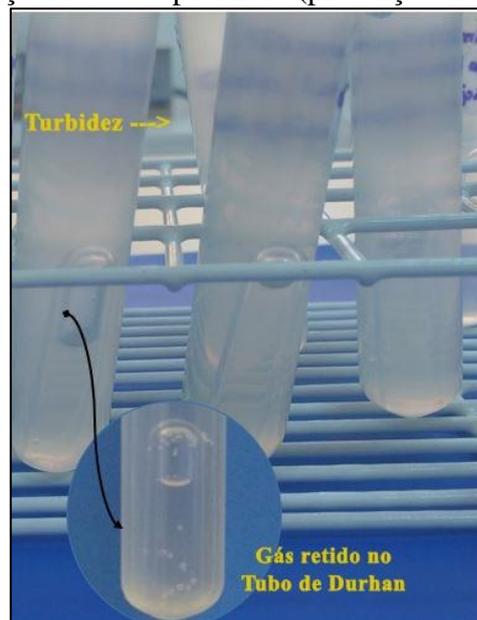
de gás (tubo de Durhan), e o meio C.L. Todos os tubos foram incubados à $35 \pm 0,5^\circ \text{C}$ durante 24/48 horas e sujeitos a identificação dos tubos que apresentarem crescimento de Coliformes Totais (positivo).



Fonte: A autora (2017).

Os tubos expressam crescimento da bactéria, em virtude da ocorrência de fermentação (turbidez, coloração amarelada) e/ou produção de gás (retida no tubo de Durhan), conforme expressa a Figura 9.

Figura 9- Indicação de tubos positivos (presença do Grupo Coliforme)



Fonte: A autora (2017).

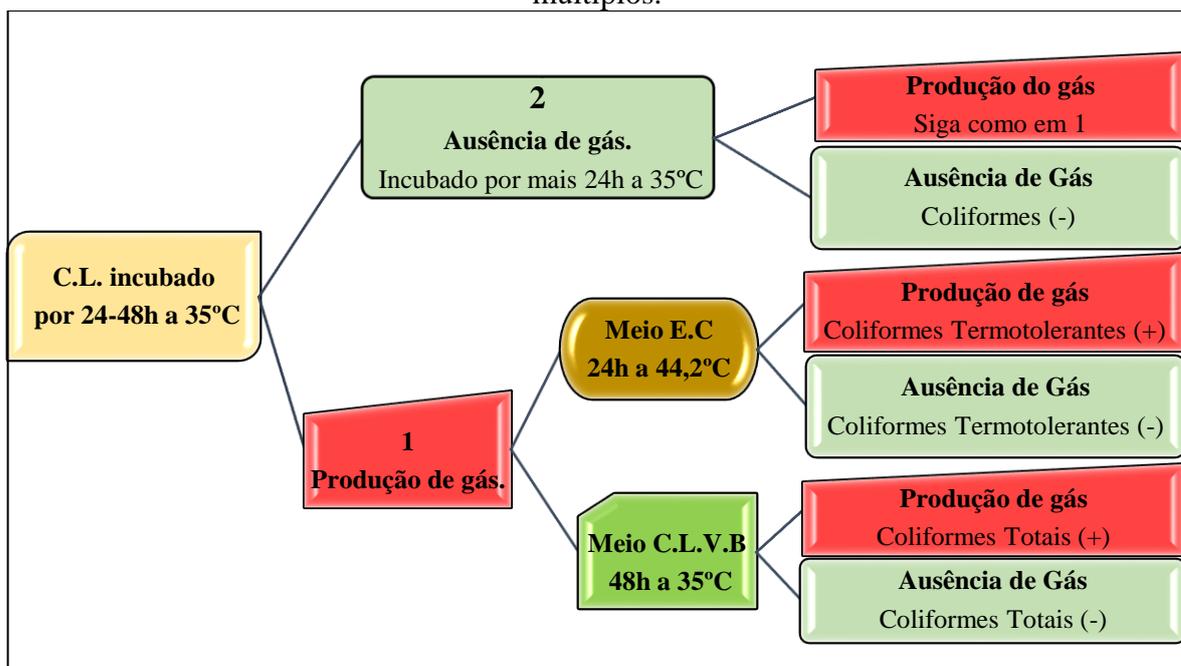
3.4.1.2 Teste Confirmativo

No procedimento do Teste Confirmativo, efetua-se o repique (transferência de alíquotas com alça de platina) dos tubos positivos resultantes do Teste Presuntivo, para tubos contendo meio C.L.V.B e um tubo invertido para coleta de gás (tubo de Durhan). Todos os tubos foram incubados à $35 \pm 0,5^\circ \text{C}$ durante 24/48 horas e sujeitos a identificação dos tubos que apresentarem crescimento de Coliformes Totais (positivo).

3.4.1.3 Teste para Coliformes Termotolerantes

De modo simultâneo ao Teste Confirmativo, empregou-se o Teste para Coliformes Termotolerantes, o qual serve para identificação de *E.coli*. O procedimento demanda o feito do repique (transferência de alíquotas com alça de platina) dos tubos positivos, resultante do Teste Presuntivo, para tubos contendo o meio E.C e um tubo invertido para coleta de gás (tubo de Durhan). Todos os tubos foram incubados em banho a $44,2^\circ \text{C} \pm 0,5^\circ \text{C}$. Em síntese, todo este procedimento totaliza no mínimo 72 horas para obtenção de resultado positivo para Coliformes Termotolerantes. A Figura 10 apresenta um fluxograma da metodologia empregada para o teste de fermentação por tubos múltiplos.

Figura 10- Fluxograma da metodologia para análise microbiológica pela técnica de tubos múltiplos.



Fonte: A autora (2017).

De acordo com o número de tubos positivos em cada uma das diluições e dos Testes Confirmativo e para Coliformes Termotolerantes executados, determina-se o NMP, tendo como base tabelas estatísticas (Apêndice A).

3.4.2 Técnica de Cultivo em Profundidade para Contagem de Bactérias

Para contagem de bactérias utilizou-se a Técnica de Cultivo em Profundidade (*Pour Plate Method*) empregando-se o meio de cultura para contagem de bactérias heterotróficas, seguindo as orientações da Fundação Nacional de Saúde (FILHO; DIAS, 2008). Em cada uma de duas placas de Petri foi distribuído 12 ml de meio PCA fundido e 1,0 ml da amostra.

As amostras inoculadas nas placas de Petri para contagem foram todas resultantes do Teste para Coliformes Termotolerantes na diluição 1:100, entretanto antes de adicionar 1 ml na placa, foram diluídas com água de diluição para 10^{-8} e 10^{-9} . As placas foram homogeneizadas e, após solidificação do meio, incubadas em posição invertida por 48 ± 3 horas a $35 \pm 0,5^\circ$ C.

Após a incubação foi feita a leitura do número de colônias nas duas placas e calculou-se a média das contagens obtidas. O resultado foi expresso em Unidades Formadoras de Colônias/ml (UFC/ml).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados referentes a metodologia descrita no capítulo anterior, bem como as possíveis discussões e justificativas.

4.1 PRODUÇÃO DO NANOCOMPÓSITO DE CELULOSE/TiO₂

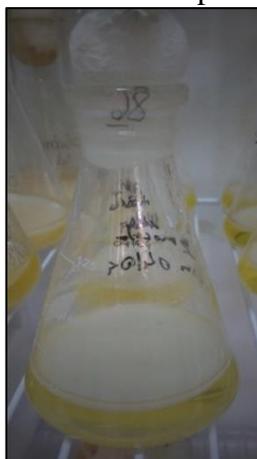
A produção do nanocopósito CB/TiO₂ foi realizada em duas etapas: iniciando com a produção biotecnológica de CB e seguindo pela imobilização do TiO₂ na rede polimérica de CB.

4.1.1 Produção Biotecnológica de Nanocelulose

- Preparação do Inóculo

A Figura 11 mostra um inóculo produzido para o estudo, onde se pode observar a formação de uma membrana na superfície do meio de cultivo, após o período de sete dias, em condições estáticas. Este cultivo foi utilizado para o preparo de uma solução contendo o meio de cultivo e o microrganismo, sendo então depositados 100 µl em cada poço da placa de cultura de 96 poços, para a produção dos discos de nanofibras de CB.

Figura 11 - Inóculo produzido



Fonte: A autora (2017).

- Produção dos discos de nanocelulose bacteriana

Após o período de fermentação, os discos de CB formados nas placas foram recolhidos com uma espátula e água destilada conforme apresentado na Figura 12.

Figura 12- Produção Biotecnológica de Nanocelulose



Fonte: A autora (2017).

- Purificação dos discos de celulose bacteriana

Então, os discos de CB foram purificados por um tratamento alcalino, representado pela Figura 13, os discos na forma hidrogel de nanofibras de CB após o tratamento de purificação, para eliminar as bactérias produtoras de celulose, bem como os resíduos do meio de cultivo.

Figura 13 - Correção do pH das NB após o tratamento alcalino



Fonte: A autora (2017).

Após a purificação os discos foram lavados até o pH neutro e na sequência foram utilizados para a produção do nanocompósito.

4.1.2 Incorporação de Dióxido de Titânio em nanocelulose

Os nanocompósitos foram preparados por imersão de hidrogéis de CB em uma dispersão sol de nanopartículas de TiO_2 em água deionizada e mantidos sob agitação, para permitir que as nanopartículas fossem imobilizadas na rede de nanofibras do hidrogel de CB Figura 14 (a) e (b).

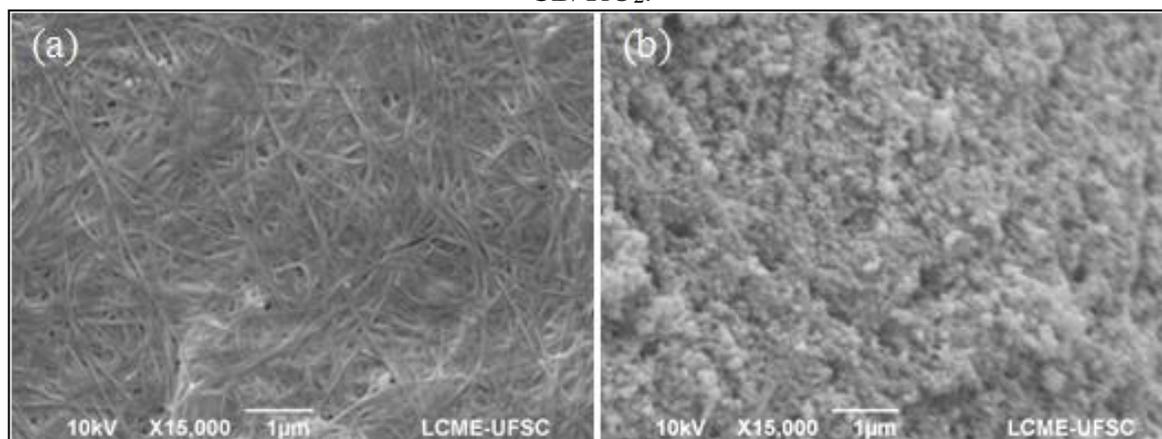
Figura 14 – (a) Dispersão aquosa de hidrogel de CB + nanopartículas de TiO_2 . (b) Nanocompósito de CB/ TiO_2 na forma de hidrogel



Fonte: A autora (2017).

A Figura 15 apresenta micrografias do MEV de amostras de CB e do nanocompósito CB/ TiO_2 . Como pode ser observado, as nanopartículas de TiO_2 estão imobilizadas na rede de nanofibras de CB de forma homogênea e bem distribuídas.

Figura 15- Micrografias obtidas por MEV com ampliação 15.000 \times . Em (a) nanofibras de uma amostra de CB. Em (b) nanofibras de uma amostra do nanocompósito CB/ TiO_2 .



Fonte: A autora (2017).

Como pode ser visto na Figura 15, os hidrogéis de CB sofreram alterações físicas, como a coloração. Isto ocorre devido à adição das nanopartículas de TiO_2 , as quais possuem características de um pó esbranquiçado tornando os hidrogéis opacos. Além disso, o processo de lavagem garantiu que as partículas de TiO_2 que não foram imobilizadas fossem removidas.

4.2 TRATAMENTO DA ÁGUA DE LASTRO POR MEIO DA APLICAÇÃO DE FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA EM ESCALA DE BANCADA

O arranjo construído para o processo de Fotocatálise Heterogênea, exposto na Figura 16, objetiva assemelhar-se a tecnologia inserida em âmbito dos tratamentos de efluentes navais, uma vez que o tratamento via Fotólise já está bem consolidado. Em termos de equipamentos a bordo.

Figura 16- Reator Fotocatalítico de bancada em operação



Fonte: A autora (2017).

O bulbo de vidro durante o processo mantém-se posicionado imerso no reator. Ou seja, há um melhor aproveitamento da intensidade de irradiação da fonte luminosa em virtude da água de lastro realizar movimentos em forma de vórtex ao redor do bulbo de vidro em toda sua extensão.

4.2.1 Tratamento fotocatalítico Preliminar

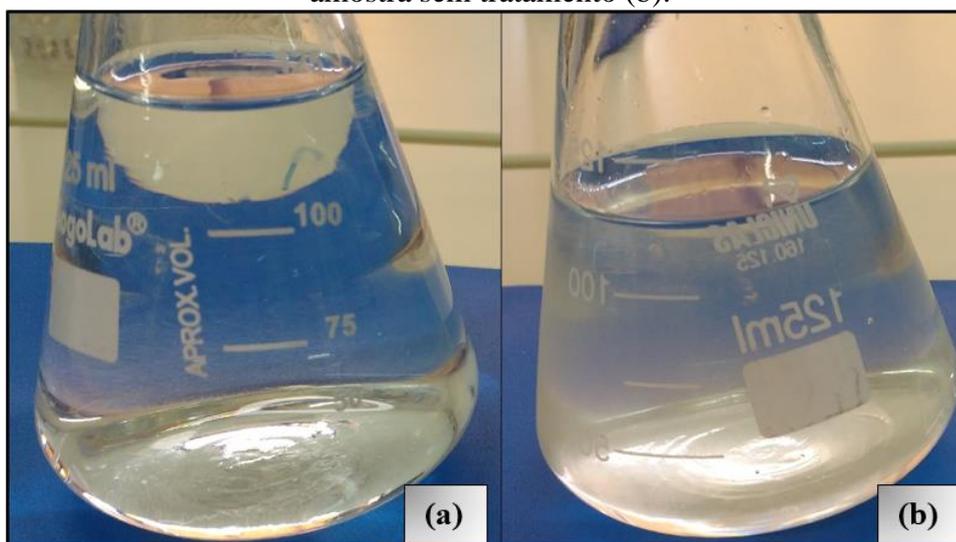
Devido o tratamento proposto à água de lastro apresentar cunho inovador, os parâmetros oriundos da Fotocatálise Heterogênea demandaram um estudo preliminar, afim de avaliar as melhores condições em função do tempo de tratamento fotocatalítico.

Após a realização da Fotocatálise e da Fotólise em amostras de água coletadas na Baía da Babitonga, variando o tempo de reação entre 20,40 e 60 minutos, foi empregada a análise microbiológica para que houvesse a escolha do melhor desempenho na desinfecção da amostra. Assim, foi possível determinar o tempo de reação de 40 minutos como a melhor condição para ser aplicado ao tratamento com a água de lastro. Neste estudo não foi possível variar a massa do nanocompósito para verificar a influência da massa do catalisador no tratamento fotocatalítico. Estudos futuros serão realizados para este fim.

4.2.2 Análise Qualitativa da amostra

A Figura 17 expressa a análise qualitativa de uma amostra da água de lastro coletada sem a filtragem prévia e ao ser submetida ao tratamento por fotocatalise heterogênea durante o período de 40 minutos, previamente estabelecido. Como pode ser observado na figura a água sem o tratamento fotocatalítico apresentava-se turva e após o tratamento foi nítida a redução da turbidez. Pode-se inferir que o nanocompósito CB/TiO₂ possa ter apresentado bons índices expressos pela combinação entre a sinergia fotocatalítica e adsorção, tendo em vista o caráter qualitativo como embasamento.

Figura 17- Análise qualitativa entre amostra tratada por Fotocatálise Heterogênea (FC) (a) e amostra sem tratamento (b).



Fonte: A autora (2017).

Para que haja parâmetros mais corretos, a análise microbiológica faz-se necessária, uma vez que há enfoque para a presença ou não do grupo coliforme, a fim de caracterizar os efeitos do tratamento em questão.

4.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

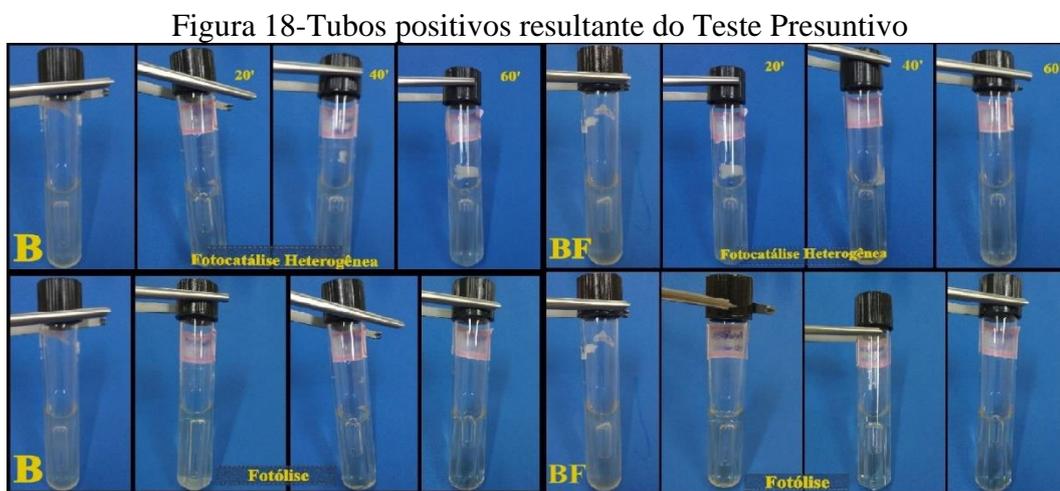
Os resultados e discussões da análise microbiológica serão divididos em dois métodos, sendo eles a Técnica de Fermentação por Tubos Múltiplos e a Técnica de Cultivo em Profundidade para Contagem de Bactérias Heterotróficas.

4.3.1 Técnica de Fermentação por Tubos Múltiplos

Os resultados e discussões desta Técnica serão divididos em dois testes sucessivos, um Presuntivo e outro Confirmativo.

4.3.1.1 Teste Presuntivo para o tratamento fotocatalítico preliminar

Foi empregado o Teste Presuntivo, como mostra a Figura 18, afim de avaliar qual tempo de reação apresentaria melhoria nas condições para o tratamento fotocatalítico.



Fonte: A autora (2017).

Conforme mostra a Figura 21, entre 40 e 60 minutos, a quantidade de gás retido nos tubos de Durhan, não expressou variação significativa. Portanto, em virtude do gasto energético da fonte luminosa, o tempo de reação para os estudos posteriores foi estabelecido em 40 minutos.

Sendo assim, o tratamento de fotocatalise heterogênea foi executado utilizando 10 gramas de nanocompósito de CB/TiO₂ liofilizado, como o descrito anteriormente, imersos em 150 ml da amostra a ser tratada e sob 40 minutos de irradiação por uma lâmpada de vapor de

mercúrio, conforme o arranjo descrito anteriormente. O sistema sob um fluxo de água para manter a refrigeração, sendo o arranjo do sistema mantido a temperatura ambiente.

4.3.1.2 *Teste Presuntivo para a amostra coletada do Tanque de Lastro*

De acordo com os procedimentos recomendados por Funasa (2013), as amostras (B), (B) (F), (FC), (FC) (F), (FT) e (FT) (F) foram cultivadas em meio C.L. A Figura 19 expressa amostras inoculadas em meio C.L. ao fim do teste presuntivo.

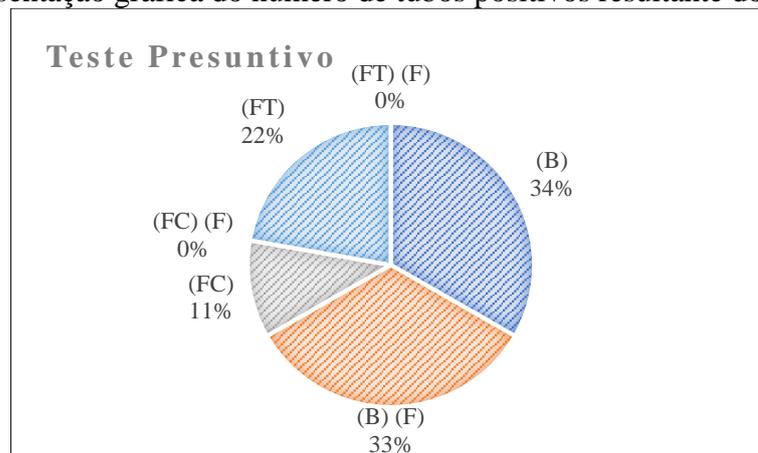
Figura 19- Amostras inoculadas em meio C.L resultantes do Teste Presuntivo



Fonte: A autora (2017).

Em adição ao mencionado anteriormente, dos 90 tubos inoculados ao final do Teste Presuntivo, 45 tubos apresentaram condições que os caracterizam como positivos, a Figura 20 representa graficamente os tubos positivos recorrente ao teste presuntivo após 48 horas da incubação a $35 \pm 0,5^\circ \text{C}$.

Figura 20 - Representação gráfica do número de tubos positivos resultante do Teste Presuntivo.



Fonte: A autora (2017).

De acordo com a Figura 20, dos 45 tubos positivos ao final do Teste Presuntivo as amostras sem tratamento indicam 67%, o processo de Fotólise resultou 22% de tubos positivos nas amostras sem filtração preliminar, assim como 11% no processo Fotocatalítico. O Teste

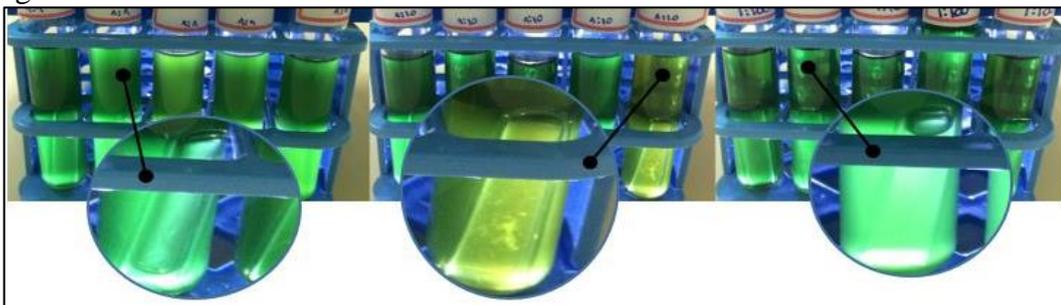
Presuntivo demonstrou que as amostras sem filtração prévia sujeitas a Fotocatálise Heterogênea apresentaram resultados proeminentes à Fotólise, atingindo eficiência de 50 % acima.

Já as amostras previamente filtradas sujeitas aos Processos de Oxidação Avançada discutidos no trabalho, não apresentaram presença de bactérias fermentadoras de lactose. Portanto o processo de filtração potencializou o processo de tratamento da água de lastro, seja via Fotocatálise ou Fotólise. Esses resultados mostram o potencial da integração dessas tecnologias para tratamento da água de lastro.

4.3.1.3 Teste Confirmativo para a amostra coletada do Tanque de Lastro

Em virtude dos resultados do Teste presuntivo, foram repicadas as amostras (B), (B) (F), (FC) e (FT) em meio C.L.V.B. De modo, a seguir os procedimentos recomendados por Funasa (2013). A Figura 21 expressa amostras inoculadas em meio C.L.V.B ao fim do Teste Confirmativo.

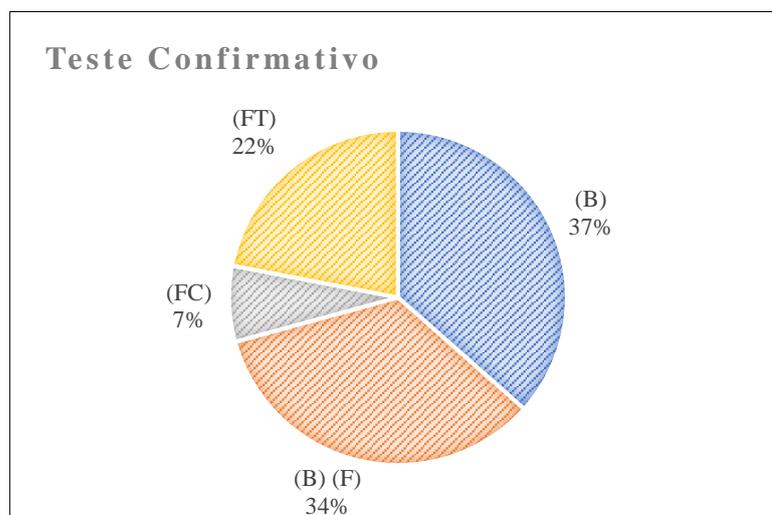
Figura 21- Amostras inoculadas em meio C.L.V.B resultantes do Teste Confirmativo



Fonte: A autora (2017).

Uma vez que não houve tubos positivos nas inoculações das amostras sujeitas a filtração prévia e tratamento, o teste confirmativo foi realizado desconsiderando esses dois cenários. A Figura 22 representa graficamente a porcentagem dos 41 tubos positivos recorrentes ao Teste Confirmativo após 24 horas da incubação a $35 \pm 0,5^\circ \text{C}$.

Figura 22- Representação gráfica do número de tubos positivos resultante do Teste Confirmativo



Fonte: A autora (2017).

De acordo com a Figura 22, ao final do Teste Confirmativo as amostras sem tratamento indicam 71% dos tubos positivos resultantes. O processo de Fotólise resultou 22% de tubos positivos nas amostras sem filtração preliminar, assim como 7% no processo Fotocatalítico. Em virtude dos efeitos do Teste Confirmativo, as amostras sujeitas a Fotocatálise Heterogênea apresentaram resultados proeminentes a Fotólise, portanto 68,1% melhor.

Na sequência, as amostras de água foram submetidas à investigação de Coliformes Totais por meio da Técnica do NMP. Neste sentido, esta técnica utiliza como valores de referência, os dados estatísticos apresentados na Tabela 16, os quais representam a quantificação do número mais provável de coliformes presentes em 100 ml.

Tabela 16- NMP para presença de Coliformes Totais com limite de confiança de 95% para as combinações de resultados positivos quando cinco tubos são usados para cada diluição (10 ml, 1,0 ml e 0,1 ml).

Amostra	Combinação de Positivos	NMP/100 ml	Limites	
			Inferior	Superior
(FC)	2-1-0	7.0	2.0	21
(FT)	5-4-0	130	50	390
(B) (F)	5-5-4	1600	600	5300
(B)	5-5-5	>1600		

Fonte: FUNASA, 2013.

Sendo assim, a Técnica de NMP para a densidade de Coliformes Totais, como mostra os valores da Tabela 16, indicam que a amostra sem tratamento e sem condições prévias apresentou NMP/100 ml da amostra maior do que 1600. Visto que este valor representa a

condição de maior quantidade de bactérias do grupo de Coliformes Totais, ou seja, bactérias do gênero: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*.

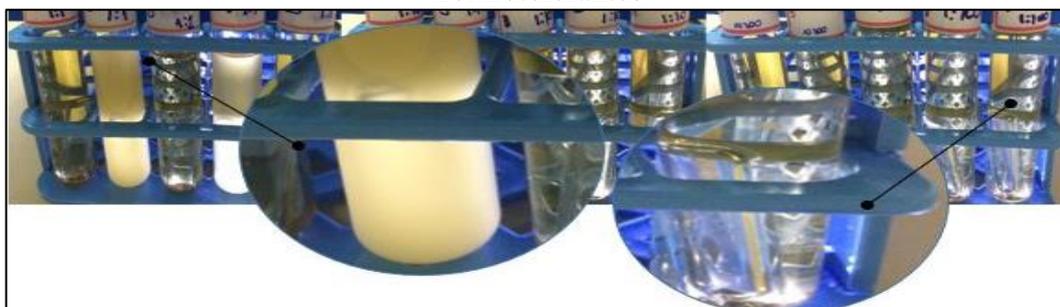
Portanto a condição de filtragem colaborou para a remoção do Grupo Coliforme para a amostra sem tratamento (Branco). O método de tratamento por Fotólise não apresentou resultados superiores ao processo Fotocatalítico.

Embora a Fotocatálise Heterogênea não tenha inativado completamente as bactérias, o resultado apresentado caracteriza-se como satisfatório, pelo efeito marcante na redução de coliformes quando comparado à Fotólise e ao Branco.

4.3.1.4 *Teste para Coliformes Termotolerantes para a amostra coletada do Tanque de Lastro*

Neste sentido, o teste complementar serviu para identificação dos Coliformes Termotolerantes, na qual fez-se o repique dos tubos positivos, resultantes do Teste Presuntivo para outros tubos, desta vez contendo meio E.C. Este procedimento foi realizado simultaneamente ao teste confirmativo. A Figura 23 aborda as amostras inoculadas em meio E.C ao fim do Teste para Coliformes Termotolerantes.

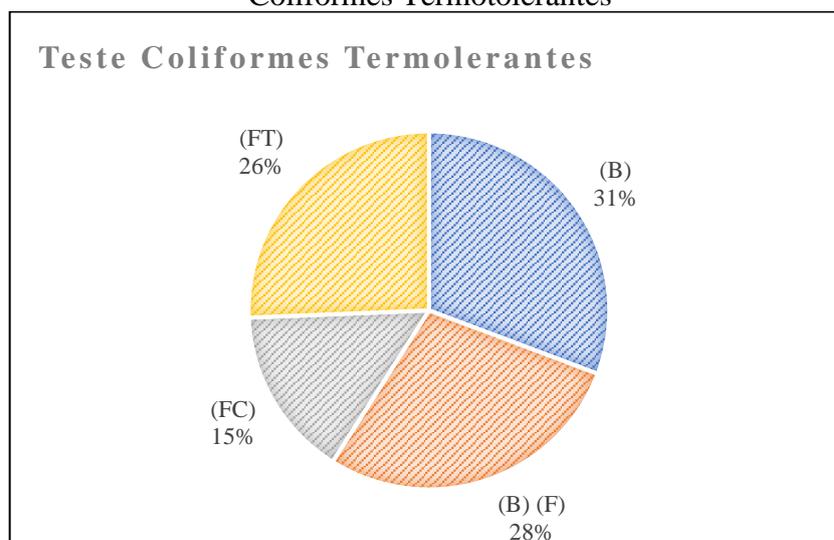
Figura 23- Amostras inoculadas em meio E.C resultantes do Teste para Coliformes Termotolerantes



Fonte: A autora (2017).

Em adição ao mencionado anteriormente, a Figura 24 representa graficamente a porcentagem dos 39 tubos positivos resultantes do Teste para Coliformes Termotolerantes após 24 horas da incubação a $44,2 \pm 0,5^\circ \text{C}$.

Figura 24- Representação gráfica do número de tubos positivos resultante do Teste para Coliformes Termotolerantes



Fonte: A autora (2017).

De acordo com a Figura 24, ao final do Teste para Coliformes Termotolerantes as amostras sem tratamento indicam 59% dos tubos positivos resultantes. O processo de Fotólise resultou 26% de tubos positivos nas amostras sem filtração preliminar, assim como 15% no processo Fotocatalítico. Em virtude dos efeitos do Teste para Coliformes Termotolerantes, as amostras sujeitas a Fotocatálise Heterogênea apresentaram resultados proeminentes a Fotólise, portanto 42,3% melhor.

Tabela 17- NMP para presença de Coliformes Termotolerantes com limite de confiança de 95% para as combinações de resultados positivos quando 5 tubos são usados para cada diluição (10 ml, 1,0 ml e 0,1 ml).

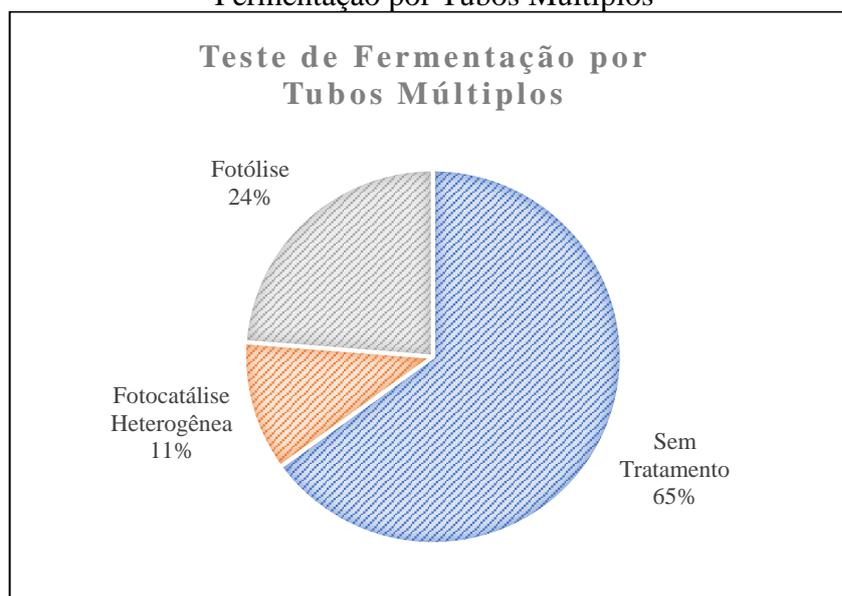
Amostra	Combinação de		Limites	
	Positivos	NMP/100 ml	Inferior	Superior
(FC)	3-2-1	17	7.0	40
(FT)	4-3-3	33	15	77
(B) (F)	5-3-3	170	80	410
(B)	5-4-3	280	120	690

Fonte: FUNASA, 2013.

Dessa forma, a técnica de NMP para a densidade de Coliformes Termotolerantes, como mostra os valores da Tabela 17, indicam que a amostra sem tratamento e condições prévias, apresentou NMP/100 ml da amostra equivalente a 280. Visto que este valor representa a condição de maior quantidade de bactérias do grupo de Coliformes Termotolerantes, ou seja, a principal bactéria do gênero é a *E.coli*.

Portanto, em virtude dos resultados mencionados, a Figura 25 representa graficamente as porcentagens de tubos positivos resultantes da Técnica de Fermentação por Tubos Múltiplos, em função das amostras sem tratamento e amostras sujeitas a desinfecção.

Figura 25- Representação gráfica do número de tubos positivos resultante do Teste de Fermentação por Tubos Múltiplos



Fonte: A autora (2017).

Portanto, vemos que o processo por Fotólise se apresentou menos eficiente do que o processo Fotocatalítico, em relação à inativação do Grupo Coliforme. Ainda assim, o processo de fotólise dos 15 tubos inoculados para cada condição inativou 33,3% das amostras sem filtração e 100% das amostras previamente filtradas. Já o processo de Fotocatálise inativou 66,6% das amostras sem filtração e 100% das amostras previamente filtradas.

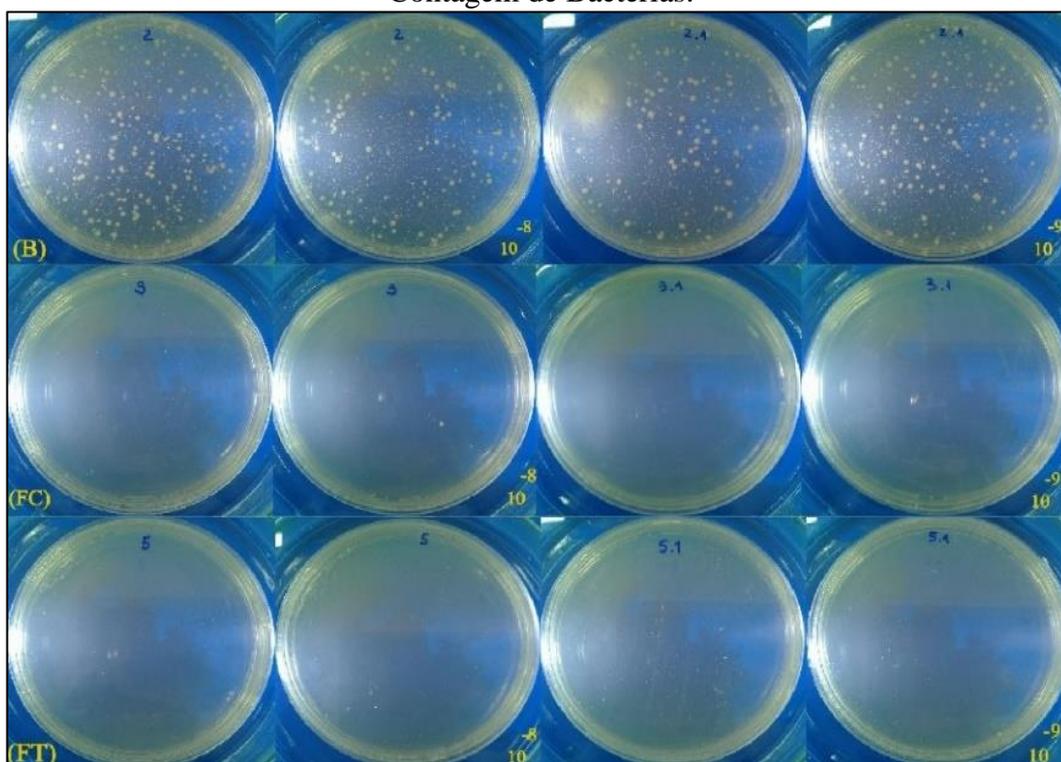
Em alusão a isto, o resultado obtido pela Técnica de Fermentação por Tubos Múltiplos indica que a amostra, ao passar pelo tratamento de Fotólise, ou seja, exposição à fonte luminosa durante 40 minutos, não foi suficiente para que houvesse a inativação total do grupo coliforme. Entretanto, o tratamento fotocatalítico se mostrou mais eficiente do que o tratamento por fotólise, eliminando uma porcentagem satisfatória de bactérias do grupo coliforme.

Por fim, a quantificação estatística, através de um resultado que fornece uma quantidade de microrganismos provavelmente presente na amostra, não é tão adequada quanto uma contagem direta de colônias, dadas em unidades formadoras de colônias. Portanto, para que houvesse maior precisão dos resultados, optou-se pelo emprego da Técnica de Cultivo em Profundidade.

4.3.2 Técnica de Cultivo em Profundidade para Contagem de Bactérias

A contagem de placas quantifica a análise, assim verificando-a com maior precisão. A Figura 26 apresenta as amostras sem condição prévia de filtração, na diluição 1:100 resultantes do Teste de Coliformes Termotolerantes. Entretanto as amostras foram diluídas com água de diluição estéril nas proporções 10^{-8} e 10^{-9} para o efeito da contagem de bactérias.

Figura 26-Amostras não filtradas sujeitas a Técnica de Cultivo em Profundidade para Contagem de Bactérias.



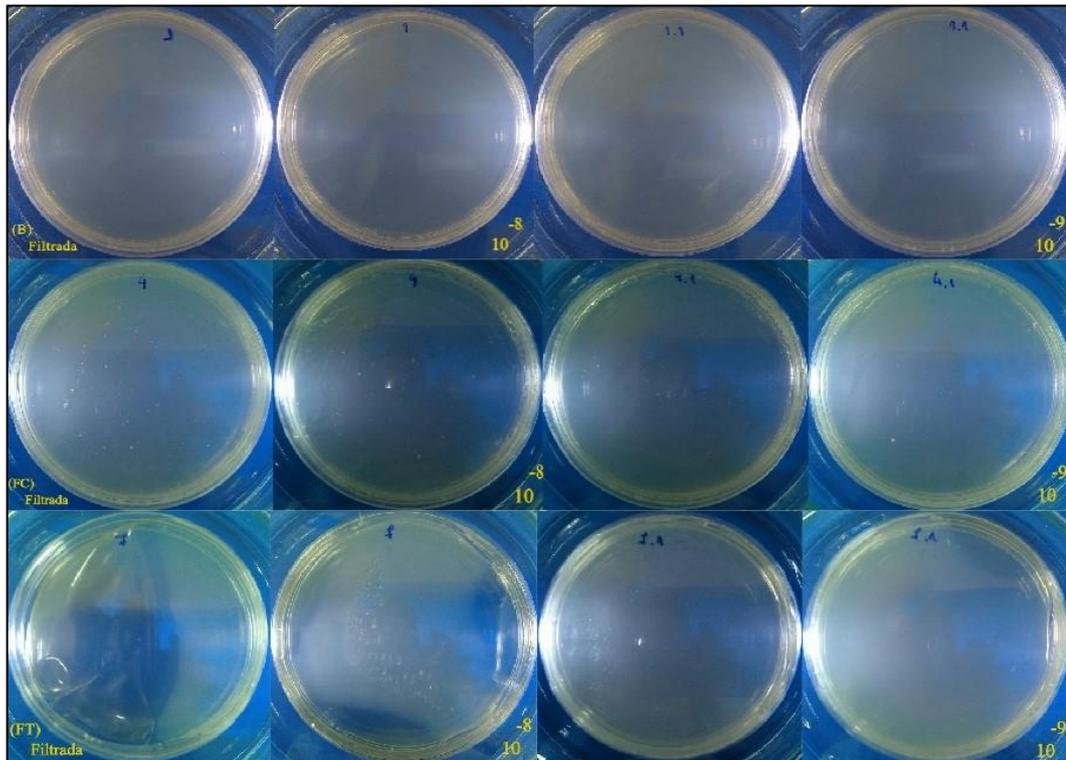
Fonte: A autora (2017).

A Figura 26 expressa que a amostra sem tratamento (B) apresentou quantidades de unidades formadoras de colônia bastante significativas, logo, este resultado exhibe coerência, uma vez que acorda com o efeito da Técnica de Fermentação por Tubos Múltiplos.

Todavia, não apresentou unidades formadoras de colônia no plaqueamento das amostras submetidas ao tratamento de desinfecção. Essa questão pode ser justificada devido à diluição inserida na técnica, já que foi possível contar as UFC em detrimento à amostra sem tratamento. Caso as amostras fossem submetidas a diluições de 10^{-4} , 10^{-5} possivelmente haveriam unidades formadoras de colônias para a contagem. Assim poderia se perceber diferenças entre as amostras sujeitas a FC e FT e explorar melhor os efeitos do catalisador.

Analogamente, a Figura 27 apresenta as amostras previamente filtradas, na diluição 1:100 resultantes do Teste de Coliformes Termotolerantes.

Figura 27 - Amostras filtradas sujeitas a Técnica de Cultivo em Profundidade para Contagem de Bactérias.

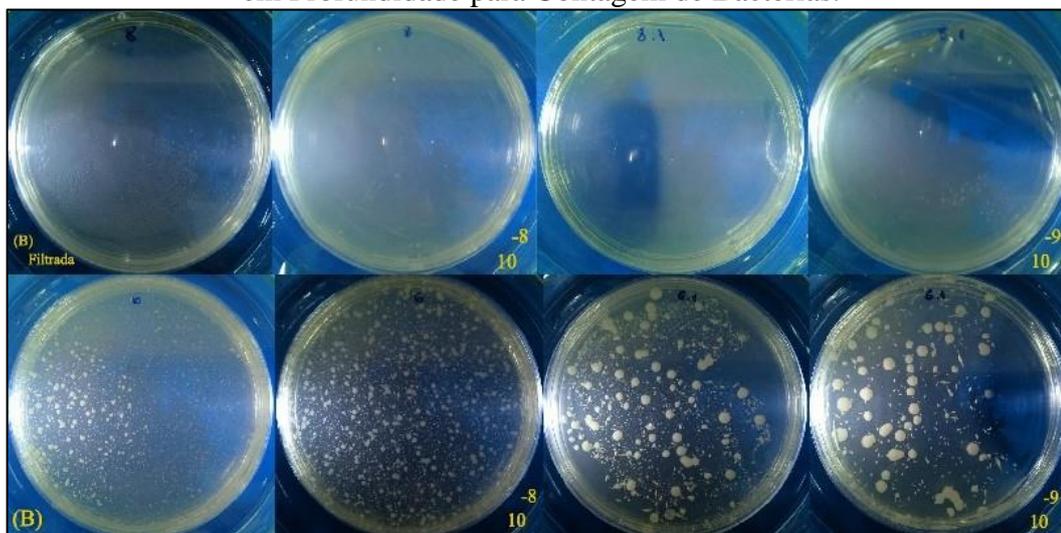


Fonte: A autora (2017).

A Figura 27 expressa que a condição de filtração contribuiu para redução de bactérias, sobretudo o Grupo Coliforme. Portanto, este cenário justifica-se analogamente a condição anterior, visto que se as amostras fossem submetidas a diluições de 10^{-4} , 10^{-5} haveria unidades formadoras de colônias para efetuar a contagem.

Outra hipótese para este ponto seria em relação ao meio E.C, específico para Coliformes Termotolerantes, os quais demandam uma temperatura mais elevada para o cultivo, $44,2^{\circ}\text{C}$. Então foi realizado o plaqueamento das amostras sem tratamento inoculadas em meio C.L.V.B, uma vez que realiza-se os testes simultaneamente, para que houvesse comparação. A Figura 28 exprime os resultados do plaqueamento de amostras inoculadas em meio C.L.V.B.

Figura 28- Amostra (B) e (B) (F) inoculadas em meio C.L.V.B sujeitas a Técnica de Cultivo em Profundidade para Contagem de Bactérias.



Fonte: A autora (2017).

A hipótese levantada em virtude da Figura 28 não pode ser validada, visto que a temperatura de cultivo foi reduzida e o resultado mostrou-se equivalente. Entretanto, contribui para a confirmação da justificativa em relação às diluições empregadas na técnica. Para que haja uma melhor compressão quantitativa, a Tabela 18 expressa a síntese de resultados da Técnica de Cultivo em Profundidade empregada para Contagem de Bactérias.

Tabela 18- Síntese dos resultados obtidos pelo emprego da Técnica de Cultivo em Profundidade para Contagem de Bactérias.

Amostra	Meio de Cultivo do Inóculo	Diluição				UFC/ml	
		10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹		
(B)	E.C	194	162	132	114	1,78x10 ¹⁰	1,23x10 ¹⁰
(B) (F)	E.C	0	0	0	0	0	0
(FC)	E.C	0	0	0	0	0	0
(FC) (F)	E.C	0	0	0	0	0	0
(FT)	E.C	0	0	0	0	0	0
(FT) (F)	E.C	0	0	0	0	0	0
(B)	C.L.V.B	>300	192	252	108	2,46x10 ¹⁰	1,8x10 ¹¹
(B) (F)	C.L.V.B	0	0	0	0	0	0

Fonte: A autora (2017).

Esta análise confirma a motivação para a execução deste trabalho, uma vez que as unidades formadoras de colônias por mililitros indicam de modo quantitativo a presença do grupo coliforme em quantidades alarmantes na amostra de água de lastro In-natura (sem tratamento). Assim, há necessidade de tratamento para a água de lastro e a fotocatalise heterogênea via CB/TiO₂ mostrou alto potencial.

5 CONCLUSÃO

Conforme o decorrer do trabalho até então, foi percebido que o viés negativo quanto aos bioinvasores sobre a água de lastro encarrega ao cenário naval atual a função de minimizar esse impacto, restando apenas a função primária exercida pela água de lastro, ou seja, garantir a estabilidade da embarcação quando descarregada.

A produção e caracterização de discos de CB e a incorporação de nanopartículas de dióxido de titânio resultou nos nanocompósitos CB/TiO₂.

Foi desenvolvida a configuração do bulbo de vidro para completa imersão da lâmpada de mercúrio em toda a extensão da amostra a ser tratada, uma vez que o procedimento se assemelha ainda mais com os equipamentos UVA para tratamento de água de lastro a bordo. Logo houve um melhor aproveitamento da fonte luminosa como um todo.

Os resultados do processo de fotocatalise, de forma qualitativa, se mostraram satisfatórios, uma vez que reduziram turbidez. Além disso, a análise microbiológica expressou bons resultados para o processo de fotocatalise heterogênea, de modo a exprimir resultados relevantes em comparação ao processo de fotólise, tendo em vista o tempo de reação como fator determinante para o efeito comparativo.

Sendo assim, o processo de fotocatalise heterogênea se insere como uma tecnologia aos métodos de tratamento de efluentes navais, de modo que o gasto energético se apresentou menor, bem como sua eficiência na inativação ou desinfecção foi superior àquela atingida apenas por Fotólise.

Portanto, a amostra da água de lastro analisada apresentava contaminação de modo que o nanocompósito produzido como catalisador para o tratamento fotocatalítico efetuou a desinfecção de forma satisfatória, visto que os resultados obtidos se mostraram superiores ao tratamento convencional (fotólise).

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir do estudo desenvolvido foi possível destacar algumas questões para trabalhos futuros, que se encontram listadas a seguir:

- Efetuar testes com quantidades maiores de material nanocompósito inserido no reator, afim de que haja redução no tempo de reação;
- Avaliar demais parâmetros oriundos da fotocatalise afim de exponenciar a eficiência do método;
- Realizar análises microbiológicas para outras bactérias patogênicas;
- Estudar a implementação desta tecnologia para um equipamento piloto de tratamento da água de lastro a bordo.
- Reduzir a diluição inserida na técnica de contagem de bactérias para que haja melhor avaliação dos resultados.

REFERÊNCIAS

- _____. ANVISA. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/paf/agua_laastro3.pdf>. Acesso em: 02 set. 2016.
- _____. Decreto nº 6514, de 22 de julho de 2008. **Dispõe sobre as infrações e sanções administrativas ao meio ambiente, estabelece o processo administrativo federal para apuração destas infrações, e dá outras providências.** Brasília, Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/decreto/d6514.htm>. Acesso em: 21 dez. 2016
- _____. Ministério Do Meio Ambiente. **Convenção internacional sobre controle e gestão da água de lastro e sedimentos de navios.** Disponível em:< <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/agua-de-lastro/contexto>>. Acesso em: 16 jun. 2017.
- _____. Ministério Do Meio Ambiente. **Contexto.** 2004. Disponível em:<http://www.mma.gov.br/estruturas/lastro/_arquivos/lastro36.pdf>. Acesso em: 2 set. 2016.
- _____. PORTAL DE PERIÓDICOS DA CAPES/MEC. **Acervo.** Disponível em: <http://www.periodicos.capes.gov.br/index.php?option=com_pcollection&Itemid=104>. Acesso em: 23 jan. 2017.
- _____.Marinha do Brasil. Diretoria de Portos e Costas – DPC. **Norma da Autoridade Marítima para o gerenciamento da água de lastro de navios:** Normam-08/DPC. Brasília, DF: DPC, 2000. Disponível em: < <https://www.dpc.mar.mil.br/sites/default/files/normam08.pdf>>. Acesso em: 04 set. 2016.
- _____.Marinha do Brasil. Diretoria de Portos e Costas – DPC. **Norma da Autoridade Marítima para o gerenciamento da água de lastro de navios:** Normam-20/DPC. Brasília, DF: DPC, 2014. Disponível em: < <https://www.dpc.mar.mil.br/sites/default/files/normam20.pdf>>. Acesso em: 04 set. 2016
- ALBERTINI, L. S. **Ecologia, Fatores associados à virulência e diversidade de Escherichia Coli Isolados de amostras de água de lastro, água de regiões portuárias e moluscos bivalves no Brasil.** 2009. 215 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- ANDREOZZI, R. et al. **Advanced Oxidation Processes (AOP) for water purification and recovery.** Catalysis Today 53 (1999) 51-59.
- ANTAQ. Agência Nacional de Transportes Aquaviários. **Água de Lastro.** Disponível em: <http://www.antaq.gov.br/porta/MeioAmbiente_AguaDeLastro.asp>. Acesso em: 19 set. 2016.

ARAÚJO, T. C. **Estudo do sistema de tratamento de água de lastro: viabilidade técnica do sistema portuário**. 2012. 74 p. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Naval e Oceânica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

BARUD, H. da S. **Preparo e caracterização de novos compósitos de celulose bacteriana**. 2006. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006. Disponível em: <http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/97942/barud_hs_me_araiq.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 07 mar. 2017.

BRANDES, R. (a) **Nanocompósito Esférico de Celulose Bacteriana/ Dióxido de Titânio para aplicações em Fotocatálise**. 2017. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciências Mecânicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Joinville, 2017.

BRANDES, R. et al. (b) Preparation and Characterization of Bacterial Cellulose/TiO₂ Hydrogel Nanocomposite. **Journal Of Nano Research**. Joinville, p. 73-80. set. 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n.º 217 de 21.nov.2001**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/paf/legislacao/resol.htm>>. Acesso em: 12 ago. 2016.

BRITO, N. N. de; SILVA, V. B. M. Processo Oxidativo Avançado e sua Aplicação Ambiental. **REEC – Revista Eletrônica de Engenharia Civil**, [s.i], v. 1, n. 3, p.36-47, 20 abr. 2012. Disponível em: <<file:///C:/Users/Cliente/Downloads/17000-74760-1-PB.pdf>>. Acesso em: 03 fev. 2017.

CARLTON J.T., et al. 1995. “Transoceanic and inter-oceanic dispersal of coastal marine organisms: The biology of ballast water. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review*“, v.23.

CARMO, M. C. do. **Plano de gestão de água de lastro de embarcações**. 2008. 126 p. Dissertação (Mestrado) – Engenharia de Transportes, Ciência e Tecnologia, Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2008.

CARTILHA DE CONHECIMENTOS BÁSICOS, São Paulo: **Água de Lastro Brasil**, 83 p. 2009. Disponível em: <<http://download.docslide.com.br/getdownload/document/?id=hs4WQANcZc5VbnHgaur8dhrcgdJGVBwhna9Db32F662X3XNb6jzg5%2FRAWOL4jTGgIRkxFg%2BUGI1gCDnl44%2FWLg%3D%3D>>. Acesso em: 11 ago. 2016.

CASTRO, H. M. P. de. **Efeito da radiação solar e da salinidade sobre o crescimento de Escherichia coli**. 2003. 51 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/1228/1/2003_dis_hmpdcastro.pdf>. Acesso em: 11 abr. 2017.

CASTRO, M. C. T. de. **O porto do Rio de Janeiro sob o enfoque da água de lastro**. 2006. 160p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Centro de Tecnologia e Ciências, Rio de Janeiro, 2008.

COLLYER, W. **Água de lastro, bioinvasão e resposta internacional**. Revista Jurídica. 2007. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/revista/Rev_84/Artigos/PDF/> Disponível em: <<http://diariodonordeste.globo.com/materia.asp?codigo=507856>>. Acesso em: 24 set. 2016.

CRUZ, L. H. da. et al. Degradação fotocatalítica de sulfametoxazol, trimetoprima e diclofenaco em solução aquosa. **Química Nova**, São Carlos, v. 33, n. 6, p.1270-1274, 23 jun. 2010.

RECOUVREUX, D. O. S. et al. Novel three-dimensional cocoon-like hydrogels for soft tissue regeneration. **Materials Science And Engineering C**. Florianópolis, p. 151-157. ago. 2011.

EICHHORN, S. J. et al. Current international research into cellulosic fibers and composites. **Journal of Materials Science**, v. 36, p. 2107-2131, 2001.

ESPÉCIES invasoras causam prejuízo de US\$ 1,4 trilhão. **Jornal da Ciência**. Rio de Janeiro, 29 abril. 2010. Disponível em: <<http://www.jornaldaciencia.org.br/edicoes/?url=http://jnoticias.jornaldaciencia.org.br/11-especies-invasoras-causam-prejuizo-de-us-14-trilhao/>>. Acesso em: 08 jan. 2017.

FENG, D.; XU, S.; LIU, G. *Application of immobilized TiO₂ photocatalysis to improve the inactivation of *Heterosigma akashiwo* in ballast water by intense pulsed light*. **Chemosphere**. p. 102-107. abr. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org.ez46.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.chemosphere.2014.11.060>>. Acesso em: 23 jan. 2017.

FERREIRA, I. V. L. **Fotocatálise Heterogênea com TiO₂ Aplicada ao Tratamento de Esgoto Sanitário Secundário**. São Carlos. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, SP, 2005.

FILHO, A. F. & DIAS, M. F. F. **Qualidade microbiológica de águas minerais em galões de 20 litros**. Alim. Nutr., Araraquara. 19(3): 243-248, 2008.

FIGUEIREDO, M.; SANTOS, E. P. dos; SCHMACHTENBERG, N. Processos Oxidativos Avançados: Fundamentos e aplicação ambiental. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria, v. 18, n. 1, p.1-12, 7 abr. 2014. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/reget/article/viewFile/10662/pdf>>. Acesso em: 02 fev. 2017.

FRANCO, B. D. G. de M. **Frequência de isolamento e propriedades de *Escherichia coli* enteropatogênica em alimentos**. 1983. 89 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1983. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-19032008-140858/pt-br.php>>. Acesso em: 30 jan. 2017.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **ISBN: Manual Prático de Análise de Água**. 4 ed. Brasília: Coordenação de Comunicação Social, 2013. Disponível em: <<http://www.funasa.gov>>

.br/site/wpcontent/files_mf/manual_pratico_de_analise_de_agua_2.pdf>. Acesso em: 25 abr. 2017.

GLOBALLAST. Global Ballast Water Management Programme. **Ballast Water Risk**. Disponível em <<http://globallast.imo.org/problem.htm>>. Acesso em: 11 jan. 2017.

GOLLASCH, S. **Removal of Barriers to the Effective Implementation of Ballast Water Control and Management Measures in Developing Countries**. IMO, 1997. 195 p. Disponível em: <http://www.gollaschconsulting.de/download/IMO_report.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2017.

IBRAHIN, F. J. **Gerenciamento e controle da água de lastro e a responsabilidade civil dos operadores do sistema**. 2012. 180 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Direito Ambiental e Políticas Públicas, Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2012.

IMO. **Internacional Maritime Organization**. Disponível em: <<http://www.imo.org>> Acesso em 20 dez. 2016.

KEMELL, M. et al. Atomic Layer Deposition in Nanometer-Level Replication of Cellulosic Substances and Preparation of Photocatalytic TiO₂/Cellulose Composites. **American Chemical Society**. Turku, Finland, p. 14178-14179. Mai. 2005.

KLEMM, D. et al. Nanocelluloses as Innovative Polymers in Research and Application. **Adv Polym Sci**, Heidelberg, n. 255, p.49-96, ago. 2006.

KRAMER, F. et al. Nanocellulose Polymer Composites as Innovative Pool for (Bio)Material Development. **Macromol. Symp**, Weinheim, n. 244, p.136-148, 2006.

KOO, Joseph H. **Polymer Nanocomposites – Processing, Characterization, and Applications**. Mcgraw-hill Companies, Inc., New York. Mcgraw-hill Nanoscience and Technology Series, 2006. 272 p.

LACEY, M. E. Q.; SCHIRME, W. N. O uso da fotocatalise para a desinfecção e desodorização do ar interno. **Ambiência: Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, Guarapuava, v. 4, n. 2, p.309-325, ago. 2008.

MARTÍNEZ, R.L. et al. *Improvement of ballast water disinfection using a photocatalytic (UV-C + TiO₂) flow-through reactor for saltwater treatment*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. p. 1203-1210. 22 abr. 2014. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.4385/abstractt>>. Acesso em: 23 jan. 2017.

MESBAHI, E. **Latest results from testing seven different Technologies under the EU MARTOB project- Where do we stand now?** In: Matheickal JT, Raaymakers S (ends), Second International Symposium on Ballast Water Treatment. International Marine Organization, London, UK, 2004.210-130p.

MIRANDA, L.O. **Poluição Marinha Através da Água de Lastro – Transferência de Espécies Exóticas Invasoras Marinhas**. 69 f. Monografia (Especialização) - Curso de Bacharel em Direito, Instituto Superior do Litoral do Paraná – Isulpar, Paranaguá, 2009.

MOURÃO, H. A. J. L.; MENDONÇA, V. R. de. Nanoestruturas em fotocatalise: uma revisão sobre estratégias de síntese de fotocatalisadores em escala nanométrica. **Química Nova**, São Carlos, v. 32, n. 8, p.2181-2190, 06 out. 2009.

NOGUEIRA, R. F. P.; JARDIM, W. F. **A Fotocatálise Heterogênea e sua aplicação Ambiental**. Química Nova, Campinas, v. 21, n. 1, p.69-71, 4 jul. 1997.

PASCHOALINO, M. P. **Utilização da fotocatalise heterogênea na desinfecção de atmosferas confinadas**. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, IQ - Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 2006.

PEREIRA, N. N., BOTTER, R. C., BRINATI, H. L. Uma abordagem sobre água de lastro. In: XXI CONGRESSO PANAMERICANO DE ENGENHARIA NAVAL, **Anais...** v. 1. Montevideo. Uruguai: Instituto Pan-americano de Engenharia Naval, 2009. Disponível em: <<http://www.professores.uff.br/newtonpereira/images/Eventos%20completos/2009%20copinaval%204.pdf>>. Acesso em: 17 set. 2016.

PEREIRA, N.N.; BRINATI, H.L., **Um estudo sobre água de lastro**. Congresso Nacional de Transporte Aquaviário, Construção Naval e Offshore, 2008.

PEREIRA, N.N. **Alternativas de tratamento de água de lastro em portos exportadores de minério de ferro**. 353 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Naval e Oceânica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

PRADELLA, J. G. C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos**. São Paulo: Centro de Tecnologia de Processos e Produtos, 2006. 119 p. Disponível em: <http://www.redetec.org.br/wp-content/uploads/2015/02/tr06_biopolimeros.pdf>. Acesso em: 11 mar. 2017.

PROCOPIAK, L. K. **O conhecimento dos comandantes de navios sobre bioinvasão por água de lastro nos portos do Estado do Paraná e a importância da educação ambiental**. Curitiba, 2009. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/23060/tese%20Leticia%20Procopiak%202009.pdf;jsessionid=50C1786550E92C705250B799A9DE3A17?sequence=1>> Acesso em: 07 jan. 2017.

RODRIGUES, C., et al. **Descontaminação bacteriológica de água de abastecimento por meio de fotocatalise heterogênea utilizando luz solar**. *XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental*, p.1-8, dezembro de 2000. Disponível em: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/tratagua/ii-006.pdf>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

ROSA, S. M. C. **Preparo, caracterização e uso de nanocompósitos contendo TiO₂ e Carvão ativado, visando a degradação de estrogênios por fotocatalise heterogênea**. 126 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Química-PPGQ, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

RIGBY, G. **Possible solutions to the ballast water problem**. Australian Quarantine. 1994.

SILVA, J. S. V. da; FERNANDES, F. C. **Avaliação de sobrevivência de organismos em água de lastro tratada com cloro**. In: SILVA, J. S. V. da; SOUZA, R. C. de. (Orgs.). *Água de Lastro e Bioinvasão*. Rio de Janeiro: Interciência, 2004, p. 21–30.

SILVA, J. S. V., et al. **Água de lastro e bioinvasão**. Rio de Janeiro: Interciência, 2004.

SIRTORI, C. **Estudo da potencialidade do processo fotoeletroquímico para remediação de águas contaminadas por cianobactérias.** 109 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SOUZA, H. K. S. de, et al. **Uso da Fotólise e da Fotocatálise Heterogênea na Desinfecção de Águas Residuais do Processamento do Soro de Leite.** In: III Encontro Paranaense De Engenharia E Ciência, 2013, Toledo. **Anais....** Toledo: UNIOESTE, 2013. p. 1 - 6.

TEIXEIRA, C. P. A. B.; JARDIM, W. F. **Caderno Temático: Processos Oxidativos Avançados.** Campinas: UNICAMP, 2004. v. 3. Disponível em: <<http://lqa.iqm.unicamp.br/cadernos/caderno3.pdf>> Acesso em: 23 dez. 2016.

TERAN, F. **Aplicação de fotocatalise heterogênea e homogênea para a remoção de cor em efluentes provenientes de indústria de processamento de couro.** Revista Monografias Ambientais - Remoa, Santa Maria, v. 3, n. 14, p.3316-3325, ago. Universidade Politécnica de São Paulo, São Paulo, 2014.

VARGAS, V. M. M. **Desenvolvimento de nanocompósitos formados por polianilina, nanotubos de carbono e dióxido de titânio visando a fotodegradação de fármaco.** 104 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

WU, D. et al (a). *Inactivation of Amphidinium sp. in ballast waters using UV/Ag-TiO₂ + O₃ advanced oxidation treatment.* **Journal of Chemical Technology and Biotechnology.** p. 1521-1526. 14 jun. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.043>>. Acesso em: 23 jan. 2017.

WU, D. et al (b). *Inactivation of Escherichia coli using UV/Ag-TiO₂/O₃-mediated advanced oxidation: application to ballast water disinfection.* **Journal of Chemical Technology and Biotechnology.** p. 1521-1526. 14 jun. 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.2667/abstract>>. Acesso em: 23 jan. 2017.

ZANELLA, T. V. **Água de lastro: um problema ambiental global.** Curitiba: Juruá, 2010.

ZHANG, D.; QI, L. Synthesis of mesoporous Titania networks consisting of anatase nanowires by templating of bacterial cellulose membranes. **Chemical Communications.** Cambridge, UK, p. 2735-2737. 15 abr. 2005.

ZHANG, N.; HU, K.; SHAN, B. *Ballast water treatment using UV/TiO₂ advanced oxidation processes: An approach to invasive species prevention.* **Chemical Engineering.** p. 7-13. mai. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2013.12.082>>. Acesso em: 23 jan. 2017.

APÊNDICE A: Sequência empregada para a execução da Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos para determinação do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais e Coliformes Termotolerantes.

PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA					
<p>1 COLETA DA AMOSTRA</p> <ul style="list-style-type: none"> ♣ Colocar duas gotas (0,1 ml) de Tiosulfato de Sódio a 10% dentro do frasco; ♣ Colocar uma tira de papel-alumínio entre a boca e a tampa do frasco; ♣ Envolver a boca e tampa do frasco em papel-alumínio. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Preparação da Solução de Tiosulfato de Sódio a 10% <ul style="list-style-type: none"> ○ Pesar 2,5 gramas de Tiosulfato de Sódio e dissolver em 100 ml de água destilada; ○ Esterilizar a 121° C (1 Kg/cm² de pressão) em autoclave durante 15 minutos; ○ Deixar esfriar; ➤ Preparação dos Meios de Cultura <ul style="list-style-type: none"> ♣ Meio Caldo Lactosado [] Dupla <ul style="list-style-type: none"> ○ Pesar 1,3 gramas de Caldo Lactosado e dissolver em 50 ml de água destilada; ○ Distribuir em tubos de ensaio (5 ml em cada tubo), tampar os tubos; ○ Esterilizar a 121° C (1 Kg/cm² de pressão) em autoclave durante 15 minutos; ○ Deixar esfriar; ○ Guardar no refrigerador (válido por uma semana). ♣ Meio Caldo Lactosado [] Simples <ul style="list-style-type: none"> ○ Pesar 1,3 gramas de Caldo Lactosado e dissolver em 100 ml de água destilada; ○ Distribuir em tubos de ensaio (5 ml em cada tubo), tampar os tubos; ○ Esterilizar a 121° C (1 Kg/cm² de pressão) em autoclave durante 15 minutos; ○ Deixar esfriar; ○ Guardar no refrigerador (válido por uma semana). ♣ Meio Caldo Lactosado Verde Brillante Bile a 2% <ul style="list-style-type: none"> ○ Pesar 4 gramas de Caldo Lactosado Verde Brillante Bile a 2% e dissolver em 100 ml de água destilada; ○ Distribuir em tubos de ensaio (5 ml em cada tubo), tampar os tubos; ○ Esterilizar a 121° C (1 Kg/cm² de pressão) em autoclave durante 15 minutos; ○ Deixar esfriar; ○ Guardar no refrigerador (válido por uma semana). 				
<p>2 MÉTODO DOS TUBOS MÚLTIPLOS</p> <ul style="list-style-type: none"> ♣ Meio Caldo Lactosado [] Dupla ♣ Meio Caldo Lactosado [] Simples ♣ Meio Caldo Lactosado Verde Brillante Bile a 2% ♣ Meio EC ♣ Água de Diluição <table border="1" style="width: 100%;"> <tbody> <tr> <td>Diluição (1:10)</td> <td>1 ml da amostra coletada + 9 ml da Água de Diluição</td> </tr> <tr> <td>Diluição (1:100)</td> <td>1 ml da Diluição (1:10) + 9 ml da Água de Diluição</td> </tr> </tbody> </table>	Diluição (1:10)	1 ml da amostra coletada + 9 ml da Água de Diluição	Diluição (1:100)	1 ml da Diluição (1:10) + 9 ml da Água de Diluição	
Diluição (1:10)	1 ml da amostra coletada + 9 ml da Água de Diluição				
Diluição (1:100)	1 ml da Diluição (1:10) + 9 ml da Água de Diluição				
<p>2.1 TESTE PRESUNTIVO</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 15 Tubos de Ensaio; ▪ 15 Tubos de Durham. <p> 5 Tubos de ensaio com:</p> <ul style="list-style-type: none"> > 5 ml de Caldo Lactosado [] Dupla; > 5 ml de amostra coletada diluição (1:1). <p> 5 Tubos de ensaio com:</p> <ul style="list-style-type: none"> > 5 ml de Caldo Lactosado [] Simples; > 5 ml de amostra coletada diluição (1:10). <p> 5 Tubos de ensaio com:</p> <ul style="list-style-type: none"> > 5 ml de Caldo Lactosado [] Simples; > 5 ml de amostra coletada diluição (1:100). <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incubar a 35 ± 0,5° C durante 24/48 horas; ▪ Se no final de 24/48 horas, houver a formação de gás dentro do tubo de Durham, significa que o teste Presuntivo foi Positivo. Neste caso, fazer o teste confirmativo. Se não houver a formação de gás durante o período de incubação, o exame termina nesta fase e o resultado do teste é considerado negativo. 					

Continua (...)

2.2 TESTE CONFIRMATIVO

- Tubos de Ensaio - Quantidade de tubos Positivos (Formação de gás) do Teste Presuntivo;
- Tubos de Durhan - Quantidade de tubos Positivos (Formação de gás) do Teste Presuntivo;

A quantidade de Tubos de ensaio com:

- > 5 ml de Caldo Lactosado Verde Brilhante Bile a 2%
- > Inocular uma porção correspondente a 1 alça de platina (flambada e fria) do tubo Positivo (Formação de gás) do Teste Presuntivo no Tubo de ensaio com Caldo Lactosado Verde Brilhante Bile a 2%

- Incubar durante 24/48 horas a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$.
- Se no final do período de 24/48 horas houver a formação de gás dentro do tubo de Durhan o teste é considerado Positivo. Caso não haja formação de gás, o teste é considerado negativo.

2.2.1 Expressão dos resultados

- ♣ Os resultados são expressos em N.M.P (Número Mais Provável) /100 ml de amostra.
- ♣ Para se determinar o N.M.P, verifica-se a combinação formada pelo número de tubos positivos que apresentaram as diluições 1:1; 1:10 e 1:100 no Teste Confirmativo.

Combinação de positivos	NMP/100 ml	Limites	
		Inferior	Superior
5-4-4	350	160	820
5-5-0	240	100	940
5-5-1	300	100	1300
5-5-2	500	200	2000
5-5-3	900	300	2900
5-5-4	1600	600	5300
5-5-5	≥1600	-	-

Fonte: APHA, 1985

2.3 COLIFORMES TERMOTOLERANTES

- Tubos de Ensaio – Quantidade de tubos do Teste Presuntivo que deram Positivos (Formação de gás) e todos os tubos negativos em que houve crescimento após 48 horas, nas 3 diluições (1:1; 1:10 e 1:100);
- Tubos de Durhan - Quantidade de tubos do Teste Presuntivo que deram Positivos (Formação de gás) e todos os tubos negativos em que houve crescimento após 48 horas, nas 3 diluições (1:1; 1:10 e 1:100);

A quantidade de Tubos de ensaio com:

- > 5 ml de Meio EC;
- > Inocular uma porção correspondente a 1 alça de platina (flambada e fria) do tubo Positivo

♣ Meio EC

- Pesar 3,7 gramas de Meio EC e dissolver em 100 ml de água destilada;
- Distribuir em tubos de ensaio (5 ml em cada tubo), tampar os tubos;
- Esterilizar a 121°C (1 Kg/cm² de pressão) em autoclave durante 15 minutos;
- Deixar esfriar;
- Guardar no refrigerador (válido por 96 horas).

➤ Preparação da Água de Diluição

♣ Solução 1

- Pesar 1,7 gramas de Fosfato de Potássio Monobásico (KH₂PO₄) e dissolver em 25 ml de água destilada, ajustar o pH para 7,2 com Hidróxido de Sódio, solução normal (NaOH 1N) e diluir a 100 ml com água destilada.

- > Normalmente são necessários 7,55 ml de NaOH 1N para elevar o pH.

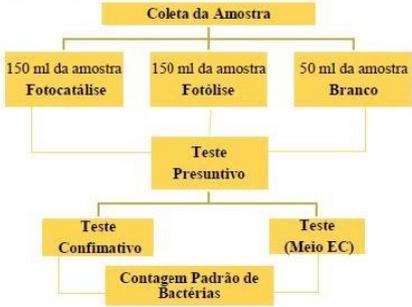
♣ Solução 2

- Pesar 8,11 gramas de Cloreto de Magnésio hexahidratado (MgCl₂.6H₂O) e dissolver em 100 mL de água destilada.

♣ Solução 3

- Adicionar 1,25 ml da solução 1 e 5 ml da solução 2 em 1 litro de água destilada.
- Esterilizar em autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Continua (...)

<p>(Formação de gás) do Teste Presuntivo no Tubo de ensaio com Meio EC</p> <ul style="list-style-type: none"> > Misturar e deixar todos os tubos em banho de água durante 30 minutos; ▪ Incubar em banho-maria a $44,5 \pm 0,2^\circ \text{C}$ durante 24 ± 2 horas; ▪ Se no final de 24 horas ou menos houver a formação de gás, está indicado a presença de coliformes de origem fecal; ▪ Calcular o N.M.P. <p>3 CONTAGEM PADRÃO DE BACTÉRIAS</p> <p>♣ Meio Plate Count Agar</p> <p>3.1 MÉTODO</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Transferir, com pipeta estéril, 0,5 ml da amostra para uma placa de Petri previamente esterilizada; ▪ Entreabrir a placa e adicionar 6 ml o meio de cultura, previamente fundido e estabilizado em banho-maria a $44-46^\circ\text{C}$, contido no tubo de ensaio; ▪ Homogeneizar o conteúdo da placa em movimentos circulares moderados em forma de (∞), em torno de 10 vezes consecutivas; ▪ Quando o meio de cultura se solidificar, incubar a placa em posição invertida a $35 \pm 0,5^\circ \text{C}$ durante 48 ± 3 horas; ▪ No final do período de incubação, fazer a contagem das colônias com o auxílio de um contador de colônias. <p>3.1.1 Expressão dos resultados</p> <ul style="list-style-type: none"> ♣ O Tiosulfato de Sódio a 10% colocado nos frascos de coleta é para neutralizar a ação do cloro; ♣ As placas de Petri devem ser colocadas na posição invertida para evitar a condensação de água na superfície do ágar; ♣ Fazer a Contagem Padrão de Bactérias, sempre em duplicata. 	<p>> Preparação do Meio de Cultura</p> <p>♣ Meio Plate Count Agar</p> <ul style="list-style-type: none"> o Pesas 2,5 gramas de Peptona ou Triptona; o Pesas 1,25 gramas de Extrato de levedura; o Pesas 0,5 gramas de Glicose; o Pesas 7,5 gramas de Agar; o Dissolver tudo em 500 ml de água destilada; o pH = 7,0 o Esterilizar a 121°C (1 Kg/cm² de pressão) em autoclave durante 15 minutos. <hr/> <p>♣ TESTE PRESUNTIVO</p> <ul style="list-style-type: none"> > 15 Tubos (Fotocatálise) > 15 Tubos (Fotólise) > 15 Tubos (Branco) <p>Total</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 45 Tubos de Ensaio ▪ 45 Tubos de Durhan ▪ 100 ml Caldo Lactosado [] Dupla ▪ 200 ml Caldo Lactosado [] Simples ▪ 300 ml água de diluição ▪ 30 ml de cada amostra de água <p>♣ TESTE CONFIRMATIVO</p> <ul style="list-style-type: none"> > Quantidade de tubos Positivos (Formação de gás) do Teste Presuntivo. <p>Total</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 45 Tubos de Ensaio ▪ 45 Tubos de Durhan ▪ 250 ml Caldo Lactosado Verde brilhante Bile 2% <p>♣ TESTE MEIO EC</p> <ul style="list-style-type: none"> > Quantidade de tubos do Teste Presuntivo que deram Positivos (Formação de gás) e todos os tubos negativos em que houve crescimento após 48 horas, nas 3 diluições (1:1; 1:10 e 1:100); <p>Total</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 45 Tubos de Ensaio ▪ 45 Tubos de Durhan ▪ 250 ml Meio EC
<p>4 ESQUEMA</p> 	<p>♣ CONTAGEM PADRÃO DE BACTÉRIAS</p> <p>Total</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 90 Placas de Petri ▪ 600 ml Meio Plate Count Agar
<p>4.1 TOTAL</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 135 Tubos de Ensaio ▪ 135 Tubos de Durhan ▪ 90 Placas de Petri ▪ 300 ml água de diluição ▪ 100 ml Caldo Lactosado [] Dupla ▪ 200 ml Caldo Lactosado [] Simples ▪ 250 ml Caldo Lactosado Verde brilhante Bile 2% ▪ 250 ml Meio EC ▪ 300 ml Meio Plate Count Agar 	<p>Quantidades em Paralelo</p> <p>Primeiras 24/48 horas:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 45 Tubos de Ensaio ▪ 45 Tubos de Durhan ▪ 300 ml água de diluição ▪ 100 ml Caldo Lactosado [] Dupla ▪ 200 ml Caldo Lactosado [] Simples <p>Depois de 24/48 horas:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 90 Tubos de Ensaio ▪ 90 Tubos de Durhan ▪ 250 ml Caldo Lactosado Verde brilhante Bile 2% ▪ 250 ml Meio EC <p>Depois de 48/96 horas:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 90 Placas de Petri ▪ 300 ml Meio Plate Count Agar

APÊNDICE B: Procedimento experimental empregado para a execução da Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos para determinação do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais e Coliformes Termotolerantes.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL			
OBSERVAÇÕES			
INÍCIO	AMOSTRA COLEIADA	QUANTIDADE DE AMOSTRA	
FILTRAÇÃO			
QUANTIDADE DA AMOSTRA	TIPO DE POA / TEMPO DO PROCESSO		
150 ml	FOTOCATÁLISE / FILTRAR ANTES		
150 ml	FOTOCATÁLISE		
150 ml	FOTÓLISE / FILTRAR ANTES		
150 ml	FOTÓLISE		
50 ml	BRANCO/ TEMPO ZERO// FILTRAR ANTES		
50 ml	BRANCO/ TEMPO ZERO		
TOTAL 700 ml DE AMOSTRA			
TESTE PRESUNTIVO: INCUBAR A $35 \pm 0,5^\circ \text{C}$ DURANTE 24/48 HORAS			
5 TUBOS DE ENSAIO PARA CADA DILUIÇÃO	QUANTIDADE DE CALDO LACTOSADO EM CADA TUBO DE ENSAIO		
	<input type="checkbox"/> DUPLA 1:1	<input type="checkbox"/> SIMPLES 1:10	<input type="checkbox"/> SIMPLES 1:100
FOTOCATÁLISE / FILTRADA	9 ml	9 ml	9 ml
FOTOCATÁLISE	9 ml	9 ml	9 ml
FOTÓLISE / FILTRADA	9 ml	9 ml	9 ml
FOTÓLISE	9 ml	9 ml	9 ml
BRANCO/ TEMPO ZERO/FILTRADA	9 ml	9 ml	9 ml
BRANCO/ TEMPO ZERO	9 ml	9 ml	9 ml
TOTAL	270 ml	270 ml	270 ml
QUANTIDADE DE MATERIAIS E REAGENTES NECESSÁRIOS			
	<input type="checkbox"/> DUPLA	<input type="checkbox"/> SIMPLES	TOTAL
MEIO CALDO LACTOSADO	7,8 g	7,8 g	15,6 g
TUBOS DE ENSAIO	30	60	90
TUBOS DE DURHAN	30	60	90
ÁGUA DE DILUIÇÃO	1:10	1:100	300 ml
	150 ml	150 ml	
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 25%;"> <p>DILUIÇÃO 1:10 - Pipetar 1 ml da amostra com <input type="checkbox"/> dupla 1:1 e adicionar em cada tubo de ensaio com 9 ml de água de diluição.</p> </div> <div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 60px; height: 40px; background-color: #e0f0ff; text-align: center;">9 ml de água de diluição</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 60px; height: 40px; background-color: #e0f0ff; text-align: center;">9 ml de água de diluição</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 60px; height: 40px; background-color: #e0f0ff; text-align: center;">9 ml de água de diluição</div> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 25%;"> <p>DILUIÇÃO 1:100 - Pipetar 1 ml da amostra com <input type="checkbox"/> simples 1:10 e adicionar em cada tubo de ensaio com 9 ml de água de diluição.</p> </div> <div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 60px; height: 40px; background-color: #e0f0ff; text-align: center;">9 ml de água de diluição</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 60px; height: 40px; background-color: #e0f0ff; text-align: center;">9 ml de água de diluição</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 60px; height: 40px; background-color: #e0f0ff; text-align: center;">9 ml de água de diluição</div> </div> </div>			

Continua (...)

TESTE CONFIRMATIVO: INCUBAR A $35 \pm 0,5^\circ$ C DURANTE 24/48 HORAS			
QUANTIDADE DE TUBOS POSITIVOS (FORMAÇÃO DE GÁS) DO TESTE PRESUNTIVO	QUANTIDADE DE CALDO LACTOSADO VERDE BRILHANTE BILE A 2% EM CADA TUBO DE ENSAIO		
	[] DUPLA 1:1	[] SIMPLES 1:10	[] SIMPLES 1:100
FOTOCATÁLISE / FILTRADA	10 ml	10 ml	10 ml
FOTOCATÁLISE	10 ml	10 ml	10 ml
FOTÓLISE / FILTRADA	10 ml	10 ml	10 ml
FOTÓLISE	10 ml	10 ml	10 ml
BRANCO/ TEMPO ZERO/FILTRADA	10 ml	10 ml	10 ml
BRANCO/ TEMPO ZERO	10 ml	10 ml	10 ml
TOTAL	300 ml	300 ml	300 ml
QUANTIDADE DE MATERIAIS E REAGENTES NECESSÁRIOS (Caso TODOS forem positivos)			
	TOTAL		
MEIO CALDO LACTOSADO VERDE BRILHANTE BILE A 2%	36 g		
TUBOS DE ENSAIO	90		
TUBOS DE DURHAN	90		
TESTE PARA COLIFORMES TERMOTOLERANTES: INCUBAR EM BANHO-MARIA A $44,5 \pm 0,2^\circ$ C DURANTE 24 ± 2 HORAS;			
QUANTIDADE DE TUBOS POSITIVOS (FORMAÇÃO DE GÁS) DO TESTE PRESUNTIVO	QUANTIDADE DE MEIO PARA COLIFORMES TERMOTOLERANTES EM CADA TUBO DE ENSAIO		
	[] DUPLA 1:1	[] SIMPLES 1:10	[] SIMPLES 1:100
FOTOCATÁLISE / FILTRADA	10 ml	10 ml	10 ml
FOTOCATÁLISE	10 ml	10 ml	10 ml
FOTÓLISE / FILTRADA	10 ml	10 ml	10 ml
FOTÓLISE	10 ml	10 ml	10 ml
BRANCO/ TEMPO ZERO/FILTRADA	10 ml	10 ml	10 ml
BRANCO/ TEMPO ZERO	10 ml	10 ml	10 ml
TOTAL	300 ml	300 ml	300 ml
QUANTIDADE DE MATERIAIS E REAGENTES NECESSÁRIOS (Caso TODOS forem positivos)			
	TOTAL		
MEIO PARA COLIFORMES TERMOTOLERANTES	33,3 g		
TUBOS DE ENSAIO	90		
TUBOS DE DURHAN	90		
CONTAGEM PADRÃO DE BACTÉRIAS: QUANDO O MEIO DE CULTURA SE SOLIDIFICAR, INCUBAR A PLACA EM POSIÇÃO INVERTIDA A $35 \pm 0,5^\circ$ C DURANTE 48 ± 3 HORAS;			
<p>QUANTIDADE DE TUBOS POSITIVOS (FORMAÇÃO DE GÁS) DO TESTE CONFIRMATIVO E DO TESTE PARA COLIFORMES TERMOTOLERANTES SERÃO USADOS PARA EFETUAR DILUIÇÕES (10^{-8}, 10^{-9}) E ASSIM INSERIR 1 ML EM CADA PLACA DE PETRI.</p>			
QUANTIDADE DE MEIO PARA CONTAGEM DE BACTÉRIAS NA PLACA DE PETRI			
120 placas de Petri para cada Diluição (TESTE CONFIRMATIVO E TESTE)	DILUIÇÕES		
		10^{-8}	10^{-9}
FOTOCATÁLISE / FILTRADA	12 ml	12 ml	
FOTOCATÁLISE	12 ml	12 ml	
FOTÓLISE / FILTRADA	12 ml	12 ml	
FOTÓLISE	12 ml	12 ml	
BRANCO/ TEMPO ZERO/FILTRADA	12 ml	12 ml	
BRANCO/ TEMPO ZERO	12 ml	12 ml	
TOTAL	4320 ml	4320 ml	

Continua (...)

QUANTIDADE DE MATERIAIS E REAGENTES NECESSÁRIOS (Caso TODOS forem positivos)					
		TOTAL			
MEIO PARA COLIFORMES TERMOTOLERA NTES	Peptona ou Triptona	45 g	9 L		
	Extrato de levedura	22,5 g			
	Glicose	9 g			
	Agar	135 g			
PLACAS DE PETRI		360			
Fazer este procedimento para os tubos contendo inoculados. [5amples 1:1]	DILUIÇÃO 10 ⁻² : 5µl da amostra [duplo 1:1 + 4,995 ml de água de diluição	Fazer este procedimento para os tubos contendo inoculados. [5amples 1:10]	DILUIÇÃO 10 ⁻² : 3µl da amostra [5amples 1:10 + 4,995 ml de água de diluição	Fazer este procedimento para os tubos contendo inoculados. [5amples 1:100]	DILUIÇÃO 10 ⁻² : 5µl da amostra [5amples 1:100 + 4,995 ml de água de diluição
	DILUIÇÃO 10 ⁻³ : 5µl da DILUIÇÃO 10 ⁻² + 4,995 ml de água de diluição		DILUIÇÃO 10 ⁻³ : 0,5 ml da DILUIÇÃO 10 ⁻² + 4,5 ml de água de diluição		DILUIÇÃO 10 ⁻³ : 0,5 ml da DILUIÇÃO 10 ⁻² + 4,5 ml de água de diluição
	DILUIÇÃO 10 ⁻⁴ : 0,5 ml da DILUIÇÃO 10 ⁻³ + 4,5 ml de água de diluição		DILUIÇÃO 10 ⁻⁴ : 0,5 ml da DILUIÇÃO 10 ⁻³ + 4,5 ml de água de diluição		DILUIÇÃO 10 ⁻⁴ : 0,5 ml da DILUIÇÃO 10 ⁻³ + 4,5 ml de água de diluição
	DILUIÇÃO 10 ⁻⁵ : 0,5 ml da DILUIÇÃO 10 ⁻⁴ + 4,5 ml de água de diluição		DILUIÇÃO 10 ⁻⁵ : 5µl da DILUIÇÃO 10 ⁻⁴ + 4,995 ml de água de diluição		DILUIÇÃO 10 ⁻⁵ : 5µl da DILUIÇÃO 10 ⁻⁴ + 4,995 ml de água de diluição
	DILUIÇÃO 10 ⁻⁶ : 0,5 ml da DILUIÇÃO 10 ⁻⁵ + 4,5 ml de água de diluição		DILUIÇÃO 10 ⁻⁶ : 0,5 ml da DILUIÇÃO 10 ⁻⁵ + 4,5 ml de água de diluição		DILUIÇÃO 10 ⁻⁶ : 0,5 ml da DILUIÇÃO 10 ⁻⁵ + 4,5 ml de água de diluição
	DILUIÇÃO 10 ⁻⁷ : 5µl da DILUIÇÃO 10 ⁻⁶ + 4,995 ml de água de diluição		DILUIÇÃO 10 ⁻⁷ : 0,5 ml da DILUIÇÃO 10 ⁻⁶ + 4,5 ml de água de diluição		DILUIÇÃO 10 ⁻⁷ : 0,5 ml da DILUIÇÃO 10 ⁻⁶ + 4,5 ml de água de diluição
	DILUIÇÃO 10 ⁻⁸ : 0,5 ml da DILUIÇÃO 10 ⁻⁷ + 4,5 ml de água de diluição		DILUIÇÃO 10 ⁻⁸ : 0,5 ml da DILUIÇÃO 10 ⁻⁷ + 4,5 ml de água de diluição		DILUIÇÃO 10 ⁻⁸ : 0,5 ml da DILUIÇÃO 10 ⁻⁷ + 4,5 ml de água de diluição
	DILUIÇÃO 10 ⁻⁹ : 0,5 ml da DILUIÇÃO 10 ⁻⁸ + 4,5 ml de água de diluição		DILUIÇÃO 10 ⁻⁹ : 0,5 ml da DILUIÇÃO 10 ⁻⁸ + 4,5 ml de água de diluição		DILUIÇÃO 10 ⁻⁹ : 0,5 ml da DILUIÇÃO 10 ⁻⁸ + 4,5 ml de água de diluição
	DILUIÇÃO 10 ⁻¹⁰ : 0,5 ml da DILUIÇÃO 10 ⁻⁹ + 4,5 ml de água de diluição		DILUIÇÃO 10 ⁻¹⁰ : 0,5 ml da DILUIÇÃO 10 ⁻⁹ + 4,5 ml de água de diluição		DILUIÇÃO 10 ⁻¹⁰ : 0,5 ml da DILUIÇÃO 10 ⁻⁹ + 4,5 ml de água de diluição

Fonte: A autora (2017).

ANEXO A: NMP com limite de confiança de 95% para várias combinações de resultados positivos quando 5 tubos são usados para cada diluição (10 ml, 1,0 ml e 0,1 ml).

Combinação de positivos	NMP/100 mL	Limites	
		Inferior	Superior
0-0-0	< 2	-	-
0-0-1	2	1.0	10
0-1-0	2	1.0	10
0-2-0	4	1.0	13
1-0-0	2	1.0	11
1-0-1	4	1.0	15
1-1-0	4	1.0	15
1-1-1	6	2.0	18
1 2 0	6	2.0	18
2-0-0	4	1.0	17
2-0-1	7	2.0	20
2-1-0	7	2.0	21
2-1-1	9	3.0	24
2-2-0	9	3.0	25
2-3-0	12	5.0	29
3-0-0	8	3.0	24
3-0-1	11	4.0	29
3-1-0	11	4.0	29
3-1-1	14	6.0	35
3-2-0	14	6.0	35
3-2-1	17	7.0	40
4-0-0	13	5.0	38
4-0-1	17	7.0	45
4-1-0	17	7.0	46
4-1-1	21	9.0	55
4-1-2	22	12	63
4-2-0	26	9.0	56
4-2-1	26	12	65
4-3-0	27	12	67
4-3-1	33	15	77
4-4-0	34	16	80
5-0-0	23	9	86
5-0-1	30	10	110
5-0-2	40	20	140
5-1-0	30	10	120
5-1-1	50	20	150
5-1-2	60	30	180
5-2-0	50	20	170
5-2-1	70	30	210
5-2-2	90	40	250
5-3-0	80	30	250
5-3-1	110	40	300
5-3-2	140	60	360
5-3-3	170	80	410
5-4-0	130	50	390
5-4-1	170	70	480
5-4-2	220	100	560
5 4 3	280	120	690
5-4-4	350	160	820
5-5-0	240	100	940
5-5-1	300	100	1300
5-5-2	500	200	2000
5-5-3	900	300	2900
5-5-4	1600	600	5300
5-5-5	1600	-	-

Fonte: FUNASA (2013).