



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIAS E BIOCÊNCIAS

DAIANE PEREIRA INÁCIO

**ESTUDO EXPLORATÓRIO DE EXTRATOS AQUOSOS DE SEMENTE DE
UVA E DE CHÁ VERDE PARA POSSÍVEL USO EM DESINFECÇÃO DE
ÁGUAS RESIDUÁRIAS**

FLORIANÓPOLIS
2019

Daiane Pereira Inácio

**ESTUDO EXPLORATÓRIO DE EXTRATOS AQUOSOS DE SEMENTE DE
UVA E DE CHÁ VERDE PARA POSSÍVEL USO EM DESINFECÇÃO DE
ÁGUAS RESIDUÁRIAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologias e Biociências da Universidade
Federal de Santa Catarina para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Elisa Magri.

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Gislaine Fongaro.

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Inácio, Daiane Pereira

Estudo exploratório de extratos aquosos de semente de uva e de chá verde para possível uso em desinfecção de águas residuárias/Daiane Pereira Inácio; orientadora, Maria Elisa Magri, coorientadora, Gislaine Fongaro, 2019.

84 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Patógenos entéricos. 3. Extrato de semente de uva. 4. Extrato de chá verde. 5. Desinfecção de águas. I. Magri, Maria Elisa. II. Fongaro, Gislaine. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Daiane Pereira Inácio

**ESTUDO EXPLORATÓRIO DE EXTRATOS AQUOSOS DE SEMENTE DE
UVA E DE CHÁ VERDE PARA POSSÍVEL USO EM DESINFECÇÃO DE
ÁGUAS RESIDUÁRIAS**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Patricia Hermes Stoco, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa Doris Sobral Marques Souza, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biotecnologias e Ciências.

Prof. Dr. Glauber Wagner
Coordenador do Programa

Profa. Dra. Maria Elisa Magri
Orientadora

Florianópolis, 17 de setembro de 2019

Este trabalho é dedicado à minha família, ao meu esposo e aos meus amigos e amigas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pela saúde e pela força que me concedeu para não me deixar abater diante das dificuldades.

Aos meus pais, Dorotea e Ivon, que sempre me incentivam nos meus estudos, apoiando-me com o seu amor incondicional.

Ao meu esposo/parceiro, Gabriel, pela paciência, amor e compreensão, por se fazer sempre presente e abdicar de momentos de lazer para que eu pudesse me dedicar a minha formação. Essa história e conquista são nossas.

À professora Dra. Maria Elisa Magri que aceitou prontamente o convite para ser minha orientadora neste trabalho. Pela dedicação que dispensou durante todas as suas fases, fazendo-se presente e acessível. Buscou me acompanhar e orientar desde os procedimentos em laboratório até a produção textual, procurando o desenvolvimento e aprimoramento do trabalho. À professora Dra. Gislaine Fongaro, como coorientadora, oportunizando o seu conhecimento e experiência em prol do desenvolvimento desta pesquisa.

À Priscila, pelas longas horas compartilhadas em laboratório, trabalhando em equipe no desenvolvimento de todos os experimentos, em prol da conclusão dos objetivos traçados.

Aos membros do Laboratório Integrado de Meio Ambiente (LIMA) por auxiliarem na minha pesquisa. Aos membros da banca de defesa, agradeço por aceitarem o convite. Às agências financiadoras do projeto e da bolsa CNPq e FAPESC.

A toda minha família e todos os meus amigos que, estando perto ou distante, são muito importantes na minha vida.

A todos o meu muito obrigada.

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fieis a nós mesmos” (Friedrich Nietzsche).

RESUMO

O controle das doenças de veiculação hídrica pode se dar por meio da implantação de um tratamento eficiente de água e esgoto. A cloração das águas é um procedimento de rotina nas Estações de Tratamento (ETA/ETE), apresentando um papel importante na redução dos problemas de saúde associados ao consumo de água contaminada com patógenos entéricos. Contudo, o uso de cloro nos seus processos de desinfecção é contestado devido à formação de subprodutos carcinogênicos. Extratos derivados de plantas, dentre eles, o Extrato de Sementes de Uva (ESU) e o Extrato de Chá Verde (ECV), têm sido pesquisados pela comunidade científica por suas propriedades antimicrobianas para aplicações em alimentos. Nesse contexto, hipotetiza-se no presente estudo que esses extratos tenham potencial de desinfecção de patógenos entéricos causadores de doenças de veiculação hídrica, sobretudo devido às suas ações antimicrobiana e antiviral, podendo ser aplicados futuramente no tratamento de água e efluentes para fins de reuso. Assim, os objetivos desse estudo foram: I. Avaliar o potencial biocida dos compostos naturais ECV e ESU frente aos patógenos/indicadores *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* PhiX-174 e MS2; II. Modelar a cinética de inativação desses microrganismos avaliados; III. Estabelecer recomendações para possíveis usos de ECV e ESU em tratamentos de água. Os testes foram realizados usando água destilada no agitador *Jar Test*, o qual contém 6 jarros de capacidade de 2 litros. Os parâmetros físico-químicos avaliados em cada um dos seis jarros foram: temperatura, turbidez, pH, cor aparente e cor verdadeira. As bacterianas *E. coli* e *S. enterica* foram avaliadas nos seguintes tempos de contato: 0, 10, 20, 40, 60 e 120 minutos enquanto os bacteriófagos PhiX-174 e MS2 foram avaliados nos tempos: 0, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos. Na concentração 5 mg/mL com o ECV foi observado decaimento significativo ($1,21 \log_{10}$; $p < 0,05$) de *E. coli* e *S. enterica* ($1,25 \log_{10}$; $p < 0,05$). Em concentrações menores (2 mg/mL; ECV), as remoções médias foram determinadas para *E. coli* ($0,76 \log_{10}$; $p \geq 0,05$) e *S. enterica* ($0,93 \log_{10}$; $p \geq 0,05$). Para os bacteriófagos PhiX-174 e MS2 não foi observada redução significativa ($p \geq 0,05$) nas duas concentrações empregadas (2 e 5 mg/mL; ECV) ao longo do experimento. No tratamento proposto com o ESU, não foi observada ação biocida ($p \geq 0,05$) contra os microrganismos bacterianos e virais por todo o período de exposição ao ESU nas concentrações 3 e 5 mg/mL. O pH inicial e final para ambos os extratos apresentaram caráter ácido. Quanto à turbidez, bem como cores aparente e verdadeira, houve aumento para os dois extratos ($p < 0,05$) quando comparados ao controle. O tratamento com o ECV testado durante este trabalho apresentou capacidade de inativação promissora e boa solubilidade em água destilada, quando comparado com os resultados obtidos com ESU. Considerando que poucos estudos reportam o uso desses compostos naturais na desinfecção da água através da remoção de vírus e bactérias entéricas, espera-se que os resultados obtidos neste trabalho contribuam com o conhecimento acerca do uso do ECV e ESU nesse contexto. Porém, é necessário que futuros estudos sejam conduzidos para melhor avaliar o comportamento destes patógenos na presença de ESU e ECV, assim como a segurança na sua aplicação.

Palavras-chave: Patógenos entéricos. Extrato de semente de uva. Extrato de chá verde. Desinfecção de águas.

ABSTRACT

Waterborne diseases can be controlled by implementing efficient water and sewage treatment. Water chlorination is a routine procedure at Treatment Stations (ETA / ETE), playing an important role in reducing health problems associated with the consumption of water contaminated with enteric pathogens. However, the use of chlorine in its disinfection processes is contested due to the formation of carcinogenic byproducts. Plant-derived extracts, including Grape Seed Extract (ESU) and Green Tea Extract (ECV), have been researched by the scientific community for their antimicrobial properties for food applications. In this context, it is hypothesized in the present study that these extracts have the potential for disinfection of enteric pathogens that cause waterborne diseases, mainly due to their antimicrobial and antiviral actions, and may be applied in the future for water and wastewater treatment for reuse purposes. Thus, the objectives of this study were: I. To evaluate the biocidal potential of the natural compounds ECV and ESU against the pathogens *E. coli*, *S. enterica*, PhiX-174 and MS2; II. Model the inactivation kinetics of these evaluated microorganisms; III. Establish recommendations for possible uses of ECV and ESU in water treatments. The tests were performed using distilled water on the Jar Test shaker, which contains 6 2 liter capacity jars. The physicochemical parameters evaluated in each of the six jars were: temperature, turbidity, pH, apparent color and true color. The bacteria *E. coli* and *S. enterica* were evaluated at the following contact times: 0, 10, 20, 40, 60 and 120 minutes and the bacteriophages PhiX-174 and MS2 at the times: 0, 15, 30, 60, 120 and 180 minutes. At 5 mg / mL concentration with ECV a significant decay ($1.21 \log_{10}$; $p < 0.05$) of *E. coli* and *S. enterica* ($1.25 \log_{10}$; $p < 0.05$) was observed. At lower concentrations (2 mg / mL; ECV) the mean removals were: *E. coli* ($0.76 \log_{10}$; $p \geq 0.05$) and *S. enterica* ($0.93 \log_{10}$; $p \geq 0.05$). The bacteriophages PhiX-174 and MS2 did not show significant reduction ($p \geq 0.05$) in the two concentrations employed (2 and 5 mg / mL; ECV) throughout the experiment. In the proposed treatment with ESU, no biocidal action ($p \geq 0.05$) was observed against bacterial and viral microorganisms throughout the ESU exposure period at concentrations 3 and 5 mg / mL. The initial and final pH for both extracts were acidic. As for turbidity, apparent and true color there was an increase for both extracts when compared to their control. In conclusion, considering that few studies report the use of these natural compounds in water disinfection of viruses and enteric bacteria, it is expected that the results obtained in this work contributed to increase the scientific knowledge about the use of ECV and ESU. The ECV treatment tested during this work showed promising inactivation capacity and high solubility in distilled water when compared to the results obtained with ESU. However, further studies should be conducted to better evaluate the behavior of these pathogens in the presence of ESU and ECV and the safety of their application, testing higher extract concentrations and longer exposure times,

Keywords: Enteric pathogens. Grape Seed Extract. Green tea extract. Water disinfection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rota fecal-oral	31
Figura 2: Estrutura química da classe de polifenóis <i>Flavon-3-ol</i> e os correspondentes microrganismos sensíveis	41
Figura 3: Representação esquemática dos ensaios <i>Jar test</i> utilizados na execução deste trabalho	47
Figura 4: Jar-test após a adição do ECV e ESU diluídos em 1L de água destilada	49
Figura 5: Cinética de remoções médias de <i>E. coli</i> e <i>S. enterica</i> no experimento com ECV após 120 minutos	55
Figura 6: Cinética de remoções médias de MS2 e PhiX-174 no experimento com ECV após 180 minutos.	59
Figura 7: Cinética de remoções médias de <i>E. coli</i> e <i>S. enterica</i> no experimento com ESU após 120 minutos	64
Figura 8: Cinética de remoções médias de MS2 e PhiX-174 no experimento com ESU após 180 minutos.	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Parâmetros físico-químicos do ECV e do ESU no experimento	52
Quadro 2: Resultados de “-k”, “T ₉₀ ” e “r ² ” das bactérias <i>E. coli</i> e <i>S. eneérica</i> ao longo do experimento com ECV.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - População brasileira, porcentagem de domicílios atendidos por rede geral de água tratada, Taxa de Mortalidade Infantil e Proporção de óbitos por doença diarreica aguda em menores de cinco anos de idade por regiões, nos anos de 1991, 2000 e 2010.....	23
Tabela 2 - Porcentagem de cada tipo SPD em relação ao total de um processo de cloração de água potável.....	28
Tabela 3 - Principais doenças de veiculação hídrica e os respectivos microrganismos causadores	30
Tabela 4 - Tratamentos de inativação viral com soluções de ESU	43
Tabela 5 - Concentrações médias de <i>E. coli</i> (em log ₁₀) para cada jarro com o tratamento proposto com o ECV ao longo do experimento	53
Tabela 6 - Concentrações médias de <i>S. enterica</i> (em log ₁₀) para cada jarro com tratamento proposto com o ECV ao longo do experimento	53
Tabela 7 – Concentrações médias a partir das duplicas (em log ₁₀) de <i>E. coli</i> no tratamento proposto com o ECV e as remoções em log ₁₀ ao final do experimento.....	54
Tabela 8 – Concentrações médias a partir das duplicas (em log ₁₀) de <i>S. enterica</i> no tratamento proposto com o ECV e as remoções em log ₁₀ ao final do experimento	54
Tabela 9 - Concentrações médias de MS2 (em log ₁₀) para cada jarro com o tratamento proposto com o ECV ao longo do experimento	57
Tabela 10 - Concentrações médias de PhiX-174 (em log ₁₀) para cada jarro com o tratamento proposto com o ECV ao longo do experimento	58
Tabela 11 - Concentrações médias a partir das duplicas (em log ₁₀) de MS2 no tratamento proposto com o ECV e as remoções em log ₁₀ ao final do experimento.....	58
Tabela 12 - Concentrações médias a partir das duplicas (em log ₁₀) de PhiX -174 no tratamento proposto com o ECV e as remoções em log ₁₀ ao final do experimento.....	58
Tabela 13 - Concentrações médias de <i>E. coli</i> (em log ₁₀) para cada jarro com o tratamento proposto com o ESU ao longo do experimento.....	62
Tabela 14 - Concentrações médias de <i>S. enterica</i> (em log ₁₀) para cada jarro com o tratamento proposto com o ESU ao longo do experimento.....	62
Tabela 15 - Concentrações médias a partir das duplicas (em log ₁₀) de <i>E. coli</i> no tratamento proposto com o ESU e as remoções em log ₁₀ ao final do experimento	63
Tabela 16 - Concentrações médias a partir das duplicas (em log ₁₀) de <i>S. enterica</i> no tratamento proposto com o ESU e as remoções log ₁₀ ao ao final do experimento.....	63

Tabela 17 - Concentrações médias de MS2 (em \log_{10}) para cada jarro com o tratamento proposto com o ESU ao longo do experimento.....	65
Tabela 18 - Concentrações médias de PhiX-174 (em \log_{10}) para cada jarro com o tratamento proposto com o ESU ao longo do experimento.....	65
Tabela 19 - Concentrações médias a partir das duplicas (em \log_{10}) de MS2 no tratamento proposto com o ESU e as remoções ao final do experimento.	65
Tabela 20 - Concentrações médias a partir das duplicas (em \log_{10}) de PhiX-174 no tratamento proposto com o ESU e as remoções ao final do experimento.	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABQ	-	Academia Brasileira da Qualidade
ABNT	-	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AWWA	-	<i>American Water Works Association</i>
BHA	-	Hidroxianisol butilado
BHT	-	Hidroxitolona butilada
ECV	-	Extrato de Chá Verde
EC	-	Epicatequina
ECG	-	Epigallocatequina
EGCG	-	Epigallocatequina-3-galato
ESU	-	Extrato de Semente de Uva
ETA	-	Estação de Tratamento de Água
ETE	-	Estação de Tratamento de Esgoto
FDA	-	<i>Food and Drug Administration</i>
FUNASA	-	Fundação Nacional de Saúde
GSE	-	<i>Grape Seed Extract</i>
GTE	-	<i>Green Tea Extract</i>
IBGE	-	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LIMA	-	Laboratório Integrado de Meio Ambiente
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
ONU	-	Organização das Nações Unidas
PNAD	-	Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios
RRESSA	-	Grupo de Pesquisa Recuperação de Recursos em Sistemas de Saneamento
SABESP	-	Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo
WHO	-	<i>World Health Organization</i>
UFSC	-	Universidade Federal de Santa Catarina
UNICEF	-	United Nations International Children's Emergency Fund
THM	-	Trihalometanos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1	FORNECIMENTO E CONSUMO DA ÁGUA	21
3.2	SANEAMENTO BÁSICO	23
3.3	FORMAÇÃO DE SUBPRODUTOS DERIVADOS DA CLORAÇÃO	26
3.4	DOENÇAS DE VEICULAÇÃO HÍDRICA	29
3.5	INDICADORES DE POLUIÇÃO FECAL EM AMBIENTES AQUÁTICOS	33
3.5.1	<i>Bactérias entéricas: E.coli e S. enterica</i>	33
3.5.2	<i>Bacteriófagos como representantes dos vírus entéricos</i>	34
3.6	POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS COMPOSTOS NATURAIS	36
3.6.1	<i>Extrato de chá verde</i>	39
3.6.2	<i>Extrato de semente de uva</i>	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	CARACTERÍSTICAS E SOLUBILIZAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DE SEMENTE DE UVA E CHÁ VERDE	45
4.2	PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	45
4.3	BIOINDICADORES MICROBIOLÓGICOS ENTÉRICOS	46
4.4	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DESINFECÇÃO	46
4.5	QUANTIFICAÇÃO DE E. coli e S. enterica	48
4.6	QUANTIFICAÇÃO PHIX-174 E MS2	48
4.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO EXTRATO DE CHÁ VERDE E EXTRATO DE SEMENTE DE UVA	49
5.2	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO EXTRATO DE CHÁ	

VERDE.....	53
<i>5.2.1 Concentrações médias de E. coli e S. enterica por todo o período avaliado com ECV</i>	<i>53</i>
<i>5.2.2 Cinética de inativação de E. coli e S. enterica com ECV.....</i>	<i>54</i>
<i>5.2.3 Concentrações médias de MS2 e Phix-174 por todo o período avaliado com ECV.....</i>	<i>57</i>
<i>5.2.4 Cinética de inativação de MS2 e Phix-174 com ECV.....</i>	<i>59</i>
5.3 DISCUSSÃO DO EXTRATO DE CHÁ VERDE	59
5.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO EXTRATO DE SEMENTE DE UVA.....	62
<i>5.4.1 Concentrações médias de E. coli e S. enterica por todo o período avaliado com ESU</i>	<i>62</i>
<i>5.4.2 Cinética de inativação de E. coli e S. enterica com ESU.....</i>	<i>63</i>
<i>5.4.3 Concentrações médias de MS2 e PhiX-174 por todo o período avaliado com ESU</i>	<i>64</i>
<i>5.4.4 Cinética de inativação de MS2 e PhiX-174 com ESU.....</i>	<i>66</i>
5.5 DISCUSSÃO DO EXTRATO DE SEMENTE DE UVA.....	67
6 SUMÁRIO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS	70
7 CONCLUSÃO GERAL	71
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES	71
REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

A água é o principal recurso para a vida na Terra. Porém, o acesso regular à água potável não tem sido estendido a toda a população, principalmente em países em desenvolvimento, proporcionando impactos devastadores na saúde pública e no meio ambiente (WHO; UNICEF, 2014).

Além disso, a poluição dos recursos hídricos pelo lançamento de esgoto doméstico e efluentes industriais ajuda a acentuar a escassez de água mundial. A ONU prevê que, entre 2025 e 2050, o número de países com escassez de água aumentará para aproximadamente cinquenta (ABQ, 2015).

Uma das alternativas para a racionalização e enfrentamento desse problema é o reuso de águas residuais como, por exemplo, água cinza (proveniente de lavatórios, máquina de lavar roupas e chuveiros) e água pluvial. Já os efluentes residenciais são classificados em água marrom (somente fezes), água amarela (urina) e água negra (fezes, urina e papel higiênico) (PASIN, 2013). Sistemas locais que separam a água cinza e lodos fecais/água de banheiro são um dos conceitos mais promissores para a reciclagem de água. Contudo, há grande cautela no uso de produtos derivados de águas residuárias, principalmente na agricultura. Neste caso, o potencial de contaminação por patógenos é alto, devido ao fato das fezes serem o mais abundante componente das águas residuais convencionais (MAGRI *et al.*, 2015).

Nesse contexto, em pesquisas na cidade de Viçosa, em Minas Gerais, comparou-se o manejo do solo com água residuária filtrada de origem doméstica e o manejo convencional e foi percebido que o manejo com água residuária é mais efetivo na melhoria das características do solo (MEDEIROS *at al.*, 2005). Entretanto, é reconhecido que existem impedimentos culturais e sanitários, além de conhecimento limitado acerca da utilização de água de reuso na agricultura em larga escala (BIZARI; CARDOSO, 2016). Por este motivo, Bizari e Cardoso (2016) discutem que uma alternativa segura para integrar a água de reuso ao processo produtivo é sua utilização em projetos de irrigação que considerem espécies não comestíveis e defendem a utilização de águas residuárias na horticultura como uma estratégia de promover o desenvolvimento da horticultura urbana e periurbana ao mesmo tempo que se preserva o meio ambiente e se promove o saneamento no ciclo fechado.

A ausência ou precariedade de saneamento básico é uma necessidade emergencial em escala mundial. Áreas urbanas e peri-urbanas em países em desenvolvimento apresentam as condições mais extremas de poluição e exposição a doenças no mundo, sendo que grande parte dessa poluição é causada por ausência de banheiro e saneamento básico adequado (WINBLAD;

SIMPSON-HEBERT, 2004).

No Brasil, o saneamento básico ainda é uma questão preocupante. Apenas 48,6% da população, aproximadamente, possui esgoto tratado, ou seja, 100 milhões de brasileiros não tem acesso a esse serviço e mais de 18% não possui rede de abastecimento de água tratada, o que corresponde a cerca de 35 milhões de habitantes. Quando se avalia o número de pessoas sem acesso a banheiro, o número chega a 4 milhões (INSTITUTO TRATA BRASIL, 2015).

Diversos problemas ambientais estão associados à falta ou precariedade de saneamento básico. Dentre estes, a poluição de rios, lagoas e aquíferos, erosão acelerada, inundações frequentes, danos que direta ou indiretamente implicam em perdas humanas e materiais (KRONEMBERGER *et al.*, 2011). Os riscos à saúde relacionados à contaminação da água por agentes patogênicos entéricos são causados pela rota fecal-oral, ou seja, patógenos transmitidos pelo consumo de água ou alimentos contaminados por fezes de indivíduos ou animais infectados (Hunter *et al.*, 2002).

Doenças entéricas bacterianas, virais e agentes parasitários de gastroenterite são os grupos mais importantes de infecções relacionadas à água e a causa predominante de morbidade e mortalidade infantil. Provocam sintomas como diarreia, vômito e quadros semelhantes aos gripais. Outras doenças secundárias e mais graves já estão sendo associadas aos patógenos de veiculação hídrica, tais como meningite, miocardite e doenças respiratórias (BRICK *et al.*, 2004; REYNOLDS, 2004).

A principal estratégia de controle da propagação desses agentes etiológicos responsáveis pela transmissão de doenças de veiculação hídrica pode se dar por meio da implantação de um tratamento eficiente de água e esgoto. Nas Estações de Tratamento de Água (ETA), a cloração é um procedimento de rotina na etapa da desinfecção, cuja principal função é a redução dos problemas de saúde associados ao consumo de água contaminada por microrganismos patogênicos. De acordo com o Ministério da Saúde, é recomendada a concentração mínima de cloro residual livre de 0,2 mg/L e máxima de 5,0 mg/L em todo o sistema de abastecimento (BRASIL, 2006).

Apesar da importância dessa estratégia, diversas pesquisas relatam que a combinação do cloro livre com o conteúdo orgânico presente em águas naturais destinadas ao abastecimento, produz uma classe de compostos chamados de Trihalometanos (THM). Dentre eles, o mais seguidamente identificado e que merece maior atenção são os clorofórmios, apontados como substâncias potencialmente mutagênicas e cancerígenas. Tem sido associada ao aumento do risco de câncer de bexiga e cólon, bem como da ocorrência de parto prematuro (MEYER, 1994; ZAINUDIN *et al.*, 2017). A presença dos THM na água tratada por cloração não é o único risco

existente relacionado ao seu consumo. Na água podem estar presentes, também, patógenos como os vírus entéricos, ovos de helmintos e os cistos de protozoários que estão envolvidos nos principais episódios de gastroenterites. A eficácia, portanto, do cloro na inativação destes patógenos é menor quando comparada aos tradicionais indicadores bacterianos, como os coliformes termotolerantes (REYNOLDS, 2004).

Alternativamente, outras possibilidades para desinfecção de água têm sido testadas. Nas últimas décadas, alguns estudos têm avaliado a capacidade de desinfecção com extratos naturais e seus derivados. Extratos derivados de plantas contêm abundantes metabólitos diversos que têm sido pesquisados pela comunidade científica por suas propriedades antimicrobianas variadas (D'SOUZA, 2014; JAYAPRAKASHA; SELVI; SAKARIAH, 2003; PERUMALLA; HETTIARACHCHY, 2011).

Dentre eles, o extrato de sementes de uva (ESU) e o extrato de chá verde (ECV) se mostraram promissores, tendo diversas aplicações em alimentos e bebidas. Seus potenciais antimicrobianos e antioxidantes trazem a possibilidade de substituição de antioxidantes sintéticos, como hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolona butilada (BHT), suspeitos de apresentarem potencial carcinogênico. Ademais, o chá verde e as uvas e seus derivados são bebidas tradicionais e populares em todo o mundo e a eles são atribuídos diversos outros benefícios à saúde, além dos já citados, incluindo propriedades anti-inflamatórias e anticarcinogênicas (JAYAPRAKASHA; SELVI; SAKARIAH, 2003; PERUMALLA; HETTIARACHCHY, 2011; SU; D'SOUZA, 2011; ADÁMEZ *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2015).

Estudos utilizando compostos naturais tendem a ser explorados principalmente nas áreas médicas e farmacológicas, bem como para fins industriais. Todavia, as propriedades desses compostos, sobretudo as antibacterianas e virais, despertam também interesse na investigação da desinfecção de patógenos causadores de doenças de veiculação hídrica, até mesmo pelo fato de os métodos atuais de desinfecção com cloro terem sido contestados (SAKARIAH, 2003; AL-HABIB *et al.*, 2010; KAO *et al.*, 2010; ADÁMEZ *et al.*, 2012). Contudo, além de a utilização de extratos vegetais na desinfecção da água contaminada por patógenos ser pouco investigada, a avaliação da atividade antiparasitária também é escassa.

Nesse contexto, as atividades antimicrobiana, antiviral e antioxidante, seja do extrato de semente de uva ou do extrato de chá verde, são propriedades que justificam a avaliação de sua capacidade de remoção de patógenos entéricos de veiculação hídrica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Conduzir estudos exploratórios do potencial desinfetante de extratos aquosos de chá verde (ECV) e de semente de uva (ESU) prospectando a aplicação em processos de tratamento de águas residuais visando o reuso.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o potencial biocida dos compostos vegetais na forma de extratos aquosos ESU e ECV, frente aos patógenos *E. coli*, *S. enterica*; colífagos somáticos PhiX-174 e fagos RNA macho-específicos MS2;
2. Modelar a cinética de inativação dos microrganismos avaliados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FORNECIMENTO E CONSUMO DA ÁGUA

A crise de água doce no mundo está pautada nas vertentes de quantidade e qualidade. A quantidade suficiente de água doce nas bacias hidrográficas, nos aquíferos ou precipitadas na forma de chuva, precisa estar em sintonia com a qualidade. Esta exige parâmetros físicos, químicos e bacteriológicos desejáveis que permitam a oferta hídrica para atender as demandas atuais e futuras em relação ao uso rural, doméstico e industrial (BORDALO, 2012).

Ainda segundo Bordalo (2012), o “risco” de escassez hídrica para o próximo milênio obrigatoriamente passa por uma mudança mais rápida em busca de novos modelos que adotem o manejo da água. Voltado ao aumento da eficiência dos sistemas de abastecimento, o tratamento e a reutilização dos efluentes residenciais e industriais devem ser repensados.

O aumento da população vem acompanhado do aumento da demanda hídrica, seja para consumo residencial, industrial e, principalmente, pela agricultura. Com a população mundial ultrapassando os oito bilhões de pessoas, até o ano de 2030, o incremento na produção de alimentos deve crescer cerca de 50%. Conseqüentemente, nos próximos dez anos, mais da metade de população mundial, em torno de dois terços, deve passar por problemas de abastecimento. A Organização das Nações Unidas (ONU) prevê que entre 2025 e 2050, o número de países com escassez de água aumentará para aproximadamente cinquenta. Regiões densamente povoadas do mundo, como o Mediterrâneo, Oriente Médio, Índia, China e Paquistão, deverão ser os primeiros a enfrentar uma grave escassez de água (HANJRA; QURESHI, 2010; ABQ, 2015; GARCIA, 2018).

O perigo do desabastecimento de água tem reflexos perversos em outro problema mundial: a crise de alimentos. A agricultura irrigada é o maior usuário da água, respondendo por cerca de 80% do uso global. Assim, a escassez hídrica é projetada para se tornar o principal determinante da escassez de alimentos, superando a possibilidade de escassez de terras para plantio. A Austrália já sofre esses impactos. Embora tenha abundância de terras, o país é um dos principais produtores de alimentos, recentemente, a seca reduziu substancialmente sua produção agrícola (HANJRA; QURESHI, 2010).

A poluição dos recursos hídricos pelo lançamento do esgoto doméstico e efluentes industriais também ajuda a acentuar a escassez de água mundial. Uma das alternativas para a racionalização e enfrentamento desse problema é o reuso de águas residuais, como, por exemplo, água cinza, pluviais e efluentes residenciais que são classificadas em água marrom (somente fezes), água amarela (urina) e água negra (fezes, urina e papel higiênico) (PASIN,

2013).

Depois de submetidos a um tratamento adequado, os efluentes podem ser reaproveitados para fins não potáveis, tais como lavagem de calçadas e automóveis, descargas sanitárias, limpeza de áreas públicas, na indústria e na produção agrícola. Desta forma, minimiza-se o risco de crise no abastecimento hídrico devido a substituição de água potável por uma água de qualidade inferior, nas situações que podem prescindir dos padrões de potabilidade (OTTERPOHL, 2001; PASIN, 2013). Contudo, o reuso de afluentes sanitários é ainda visto com cautela, principalmente na produção agrícola, em virtude da quantidade de patógenos intestinais (ovos de helmintos, cistos de protozoários, vírus e bactérias) presentes no esgoto doméstico. Estes, por sua vez, podem contaminar as culturas vegetais, os trabalhadores rurais e o lençol freático. O efluente doméstico bruto contém mais de 3,0 milhões de coliformes termotolerantes em 100 mililitros (REYNOLDS, 2004).

Para a água residuária obedecer aos níveis de segurança exigidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), é necessário submetê-la a um processo de tratamento para reduzir o potencial poluidor. O esgoto é submetido a tratamentos físicos, químicos e biológicos, capazes de evitar agravos nos problemas ambientais e de saúde pública (WHO, 2006). De acordo com o documento *Guidelines for drinking-water quality*, a OMS estabelece que o esgoto tratado para reuso não potável, com um risco aceitável ou Valores Máximos Permitidos (VMP) para ovos de helmintos, deve conter menos de 1 ovo viável/litro em todas as aplicações. Em se tratar da *E. coli*, bactéria entérica frequentemente utilizada como bioindicador de contaminação fecal, o índice corresponde a uma pessoa infectada a cada um ano. Já para fins potáveis, um indivíduo contaminado a cada 1 milhão de pessoas por ano. Desta forma, são garantidas concentrações seguras de patógenos para os usuários deste sistema (WHO, 2006; PASIN, 2013).

Tão importante quanto o tratamento de esgoto para o enfrentamento da crise de água doce, está o tratamento da água bruta. Essa assertiva se revela ainda mais aplicável para o Brasil, pois é o país com maior reserva de água doce renovável do mundo, com aproximadamente 13% do total global. Dados do Banco Mundial denotam que em 2014 foram consumidos 74,8 bilhões de metros cúbicos de água no Brasil. Destes, estão distribuídos 60% na agricultura, 17% na indústria e 23% para fins domésticos. O Brasil ainda se revelou como um dos países com maior consumo de água em domicílio, proporcionalmente, com cerca de 17 bilhões de metros cúbicos (THE WORLD BANK, 2017).

O acesso de domicílios ligados a redes de abastecimento de água potável, tem elevada correlação com a incidência de doenças de transmissão hídrica, parasitoses intestinais e diarreicas, principalmente em menores de 5 anos de idade (FUNASA, 2017; FLORENÇANO;

DE ASSIS 2014). Verifica-se na Tabela 1, o acompanhamento da redução das taxas de mortalidade infantil e a proporção de óbitos por doenças diarreicas em menores de 5 anos, em face à elevação do percentual de domicílios atendidos com água tratada no Brasil nas últimas três décadas.

Tabela 1 - População brasileira, porcentagem de domicílios atendidos por rede geral de água tratada, Taxa de Mortalidade Infantil e Proporção de óbitos por doença diarreica aguda em menores de cinco anos de idade por regiões, nos anos de 1991, 2000 e 2010.

Ano ¹	População Total ¹	Porcentagem de domicílios atendidos com rede geral de água tratada ¹	Taxa de Mortalidade Infantil, por mil nascidos vivos (TMI) ¹	Proporção de óbitos por doença diarreica aguda em menores de cinco anos de idade ²
1991	46.825.47	70,7	47	9472
2000	69.872.85	77,8	29,7	3597
2010	90.755.79	92,1	15,6	1005

Fonte: ¹Dados do Censo Demográfico (IBGE 1991, 2000 e 2010; FLORENÇANO; DE ASSIS, 2014).
²Indicadores de mortalidade infantil por doença diarreica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A implementação de processos de tratamento de água, com etapas de filtração e cloração, durante o século XX, praticamente erradicou doenças icônicas como a febre tifoide e a cólera, na América do Norte e na Europa. No entanto, os patógenos microbianos continuam a ser uma das principais causas de surtos de doenças relacionadas à água em todo o mundo e continuam sendo um importante desafio de saúde pública no fornecimento de água potável para consumo no século XXI (AW; ROSE, 2012). O tratamento da água para o consumo doméstico deve ainda atuar na obtenção de parâmetros aceitáveis quanto ao sabor, odor e cor. Embora estes fatores possam não ter efeitos diretos na saúde, mudanças na aparência normal, gosto ou odor de uma fonte de água potável pode sinalizar mudanças na qualidade da fonte de água bruta ou deficiências no processo de tratamento e deve ser investigada (WHO, 2017).

3.2 SANEAMENTO BÁSICO

A população global continua crescendo e, conseqüentemente, a demanda por água potável. Em 2020, a população humana deve alcançar a marca de aproximadamente 7,9 bilhões de habitantes. O problema de abastecimento aparece à medida que a contaminação de águas superficiais e subterrâneas também segue essa tendência, sendo que em muitos lugares do mundo as fontes estão impróprias para o consumo, devido à poluição da água proveniente de

atividades industriais, domésticas e agrícolas e outras mudanças ambientais. Por este motivo, o mundo pode vivenciar uma grande escassez de água doce nos próximos anos (GUPTA *et al.*, 2012).

Os poluentes presentes nas águas residuais dependem da natureza dos efluentes liberados. Podem ser categorizados como inorgânicos orgânicos e biológicos. Os poluentes inorgânicos mais comuns são os metais pesados, altamente tóxicos e carcinogênicos na natureza. Além disso, os nitratos, sulfatos, fosfatos, fluoretos, cloretos e oxalatos também têm alguns efeitos danosos graves (HOPPEN *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 2012). Dos poluentes orgânicos tóxicos geralmente encontrados em águas residuais, pode-se destacar os pesticidas, que incluem inseticidas, herbicidas, fungicidas. Ademais, nesse grupo se encontram ainda os hidrocarbonetos polinucleares, fenóis, bifenilos, formaldeídos, detergentes, óleos, graxas, álcoois, aldeídos, cetonas, lignina e produtos farmacêuticos e de higiene (GUPTA *et al.*, 2012).

Os fenóis, por exemplo, tratam-se de uma classe de poluentes orgânicos considerados prioritários e perigosos, porque são prejudiciais para organismo mesmo em baixas concentrações. Em uma concentração de 0,005 mg/L, por exemplo, pode causar alterações significativas de sabor e odor, tornando a água imprópria para o uso. O consumo de água contaminada com fenol pode levar a dor severa, danos aos capilares sanguíneos e resultar em morte. As fontes de poluição mais importantes de fenóis são as águas residuais dos setores de ferro, aço, petróleo, pesticidas, tintas, solventes, produtos farmacêuticos, produtos químicos de preservação de madeira, de papel e celulose (AKSU, 2005).

Na classe dos contaminantes biológicos, enquadram-se os microrganismos patogênicos que prosperam em águas residuais e podem ser responsáveis por diferentes tipos de doenças. Os microrganismos nocivos incluem bactérias, fungos, algas, plâncton, protozoários, vírus e outros parasitas intestinais. Estes permanecem na água na forma coloidal ou em suspensão (GUPTA *et al.*, 2012).

A principal forma de controle da propagação desses agentes etiológicos responsáveis pela transmissão de doenças de veiculação hídrica pode se dar por meio da implementação de um tratamento eficiente de água e esgoto. No entanto, a OMS estima que nos países em desenvolvimento, cerca de dois milhões de crianças morrem anualmente de doenças infecciosas associadas à água contaminada. Portanto, o controle de microrganismos patogênicos deve ser realizado pelo uso de uma abordagem multibarreira, incluindo proteção de fonte, tratamento e desinfecção adequados e manutenção das redes de distribuição (FIGUERAS, BORREGO, 2010). Para transformar a água bruta em água potável para consumo humano, geralmente os sistemas de abastecimento contam com Estações de Tratamento de Águas (ETA).

O tratamento de água tem por finalidade atingir os padrões de potabilidade no que tange (PEREIRA, 2011):

- À higiene, ou seja, inativação de microrganismos patogênicos, elementos perigosos (minerais e compostos orgânicos tóxicos em excesso);
- À estética, em termos de cor, turbidez, odor e sabor; e
- À economia, com a redução da corrosividade, dureza, cor, turbidez.

A água deve estar livre de cores, sabores e odores que seriam questionáveis para a maioria dos consumidores uma vez que, ao avaliar a qualidade da água potável, eles confiam principalmente nos seus sentidos. Em casos extremos, evita-se o consumo quando as fontes são esteticamente inaceitáveis, em detrimento de fontes mais agradáveis, mas potencialmente inseguras. Gosto e odor podem se originar de contaminantes químicos inorgânicos e orgânicos naturais, processos biológicos, produtos químicos sintéticos, da corrosão ou como resultado de problemas no tratamento de água, armazenamento e distribuição (WHO, 2017; GARCIA, 2018).

No Brasil, o tratamento de água convencional ou ciclo completo é o mais utilizado, correspondendo a cerca de 70% do volume distribuído. É constituído pelas etapas de aeração, eliminação de impurezas grosseiras, controle de vazão, coagulação, floculação, decantação, filtração, desinfecção, correção de pH e fluoretação. (TEIXEIRA *et al.*, 2002; PORTELLA *et al.*, 2003; CARVALHO, 2012).

Esses processos visam à remoção de cor, turbidez e patógenos de veiculação hídrica e empregam normalmente para coagulação primária o sulfato de alumínio e o cloreto férrico (KATAYAMA *et al.*, 2015). Pormenorizando, o ciclo completo de tratamento envolve a captação e adução onde ocorre o bombeamento e transporte da água dos leitos d'água, sejam rios, represas ou poços, por meio de tubulações (adutoras), até as estações de tratamento. Em seguida, na etapa de peneiramento realizada por meio de grades, peneiras ou cestos, é evitada a entrada de galhos, folhas e outros materiais grandes na ETA. Posteriormente, na pré-cloração, há uma aplicação prévia de cloro na água para a oxidação, no caso de haver a presença de grande quantidade de material orgânico e biológico na água bruta (SABESP, 2008).

A coagulação e floculação promovem a desestabilização de coloides (ou partículas coloidais) com diâmetro entre 0,1 e 0,001 μm , neutralizando as forças que as mantêm separadas, utilizando-se de coagulantes químicos e aplicação de energia de mistura. Os principais coagulantes usados são os sulfatos a base de alumínio e ferro, como o sulfato de alumínio, policloreto de alumínio, sulfato férrico, sulfato ferroso clorado e cloreto férrico. Para melhorar

as condições de coagulação pode-se aplicar ainda sílica ativada, bentonita, flóculos previamente formados ou polieletrólitos (Polímeros Naturais e Sintéticos) (ANDÍA CÁRDENAS; DE VARGAS; BARRENECHEA MARTEL, 2000; TEIXEIRA *et al.*, 2002).

Na decantação, os flocos ficam com densidade superior a água e se deslocam por gravidade para o fundo de grandes tanques e então a água limpa escoar pela superfície. O tratamento segue para uma etapa de filtração, onde ocorre a passagem da água por filtros de areia e carvão para retirar as partículas menores. Posteriormente, desinfecção com cloro. Já na fluoretação, aplica-se flúor na água para prevenção de cáries dentárias. Por fim, é promovida a reservação e distribuição (SABESP, 2008). Se aceita que o pH varie entre 5 a 9. A realização dos testes de pH no tratamento da água é muito importante para a avaliação da sua qualidade físico-química, pois, se ácida, a água é corrosiva e neutraliza detergentes alcalinos, dificultando o estabelecimento do pH ideal para a remoção dos sólidos. Por outro lado, se alcalina, aumenta-se a formação de precipitados que são capazes de neutralizar detergentes ácidos (CERQUEIRA, 2006).

A presença de coliformes totais na água e alimentos não tem relação direta com a presença de microrganismos patogênicos, bem como a ocorrência de contaminação fecal, uma vez que vivem em ambientes não entéricos, como superfícies expostas ao contato direto com a água e biofilmes. O mesmo não se pode falar a respeito dos coliformes fecais, pois, embora nem todos sejam patogênicos, a presença de coliformes fecais é um indicador de contaminação e pode indicar a existência de microrganismos patogênicos de origem entérica, como as bactérias *Salmonella*, *E. coli*, *Shigella* e consequente risco à saúde humana (CERQUEIRA, 2006).

3.3 FORMAÇÃO DE SUBPRODUTOS DERIVADOS DA CLORAÇÃO

Nas ETA, a cloração é um procedimento de rotina na etapa da desinfecção de água, cuja principal função é a redução dos problemas de saúde associados ao consumo de água contaminada por microrganismos patogênicos. De acordo com o Ministério da Saúde, é recomendada a concentração mínima de cloro residual livre de 0,2 mg/L e máxima de 5 mg/L em todo o sistema de abastecimento (BRASIL, 2006).

Geralmente, nas nascentes dos rios a água é segura, mas à medida que percorre o leito encontra a chamada Matéria Orgânica Natural (MON) originária de vestígios de biomassa terrestre e aquática, lixiviação de material orgânico do solo, e matéria fecal de animais que podem estar doentes ou ser portadores de doenças graves. Além disso, possíveis descargas podem conter substâncias orgânicas resultantes de processos químicos e biológicos. A

concentração de MON pode ser mensurada pelo nível de carbono orgânico total e carbono dissolvido, absorvância, potencial de formação de UV e trihalometano (THM) (ZAFRA, 2008; ARJONA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012).

As águas que chegam a uma estação de tratamento de água contêm agentes redutores (compostos orgânicos e inorgânicos, como nitritos, íons, ferro, chumbo e sulfetos), além de microrganismos e bactérias (ZAFRA, 2008). Contudo, a desinfecção da água ocorre tanto para os sistemas de abastecimento quanto para os sistemas de esgotos sanitários, compartilhando, também, o mesmo objetivo de eliminação ou inativação dos microrganismos patogênicos (ZAFRA, 2008).

A diferença reside no resultado final esperado. No tratamento da água, os esforços são dirigidos para a destruição total de todos os patógenos presentes e o risco de não cumprimento deve ser mínimo. Já em relação ao esgoto sanitário, o resultado esperado na desinfecção depende da destinação final do efluente e, nesse caso, a presença de certa quantidade de patógenos é admissível (PIANOWSKI; JANISSEK, 2003).

O uso de cloro para desinfecção de água para consumo humano é uma prática aceita em todo o mundo e amplamente utilizada para o controle de doenças diarreicas, como a cólera. O cloro e os compostos contendo cloro são oxidantes muito poderosos e podem reagir com uma variedade de materiais orgânicos e inorgânicos na água, antes que seja obtida a desinfecção desejada. Os desinfetantes mais usados são o cloro gasoso (Cl_2), hipoclorito de sódio (NaOCl , 12,5% de cloro disponível), hipoclorito de cálcio [$\text{Ca}(\text{OCl})_2$, 70% de cloro disponível], cloramínia, dióxido de cloro (ClO_2) e ozônio (O_3) (ZAFRA, 2008).

A desinfecção com cloro da água potável tem limitações contra certos patógenos, como os protozoários, em particular o *Cryptosporidium*. Mesmo na tentativa de inativação de oocistos jovens (menos que um mês de idade), Shields *et al.* (2008) também perceberam resistência do *Cryptosporidium* à inativação por cloro. Além disso, a tolerância e inativação de *E.coli* também foi avaliada em águas residuais na África do Sul e percebeu-se pobre remoção desta bactéria por cloro na concentração de 0,5mg/L, sendo necessária a concentração de 1,5mg/L para maior eficácia (Owoseni *et al.*, 2017). Uma vez que *Giardia* também tem demonstrado resistência à desinfecção por cloro, Ran e Li (2010) avaliaram os efeitos do cloro na inativação de *Giardia* presente na água e perceberam que a taxa de inativação aumenta com o aumento da temperatura de 5 a 25°C, mas diminui acima disso e, quando a concentração de matéria orgânica no sistema de reação é aumentada, a competição entre *Giardia* e os componentes orgânicos com cloro provavelmente ocorre e reduz a taxa de inativação. A eficácia da cloração também pode ser insatisfatória contra patógenos dentro de flocos ou partículas que os protegem da ação desse

desinfetante. Altos níveis e turbidez podem proteger os microrganismos dos efeitos da desinfecção e ainda estimular o crescimento de bactérias (WHO, 2017).

O problema do uso do cloro na oxidação e desinfecção da água surge quando há a reação com a MON, formando os chamados Subprodutos Desinfecção (SPD), entre os quais estão incluídos trihalometanos (THM), ácidos haloacéticos (HAA), haloacetoneitrilos e halocetonas, haloaldeídos e fenóis clorados (SANCHES *et al.*, 2008). A proporção de cada tipo de SPD em relação ao total de SPD formado após o tratamento da água é descrita na Tabela 2.

Tabela 2 - Porcentagem de cada tipo SPD em relação ao total de um processo de cloração de água potável

Tipo de SPD	% em relação ao total de SPD
Trihalometanos	40-50%
Haloacéticos	28-35%
Haloacetoneitrilos	9-15%
Demais SPD juntos	>23%

Fonte: adaptado de SANCHES *et al.* (2008).

Segundo Pianowski e Janissek (2003), a matéria orgânica de origem vegetal, formada basicamente por ácidos húmicos e fúlvicos tem maior potencial total na formação de THMs se comparado aos demais precursores. Os precursores são compostos ativos que podem reagir com o cloro, tais quais o tempo de contato, temperatura da água, pH e a própria dose de cloro (SANCHES *et al.*, 2008).

Trihalometanos (THMs) são compostos derivados do metano. O processo de formação ocorre através da substituição de três dos quatro átomos de hidrogênio do metano por átomos de halogênio (CH_3X), geralmente oriundos do cloro ou bromo ou pela combinação dos dois. Os THMs podem ser triclorometano (clorofórmio, CHCl_3), bromodiclorometano (CHBrCl_2), clorodibromometano (CHBr_2Cl) e tribromometano (CHBr_3). Os THMs produzidos involuntariamente durante a cloração da água são voláteis e tóxicos e foram descobertos em águas potáveis somente a partir de 1974 (SANCHES *et al.*, 2008). Quanto à toxicidade dos THMs, em mamíferos, a exposição a esses compostos é ligada a efeitos tóxicos no fígado, rins e nos sistemas nervoso e reprodutivo. O clorofórmio em altas doses é carcinogênico e outros THMs são mutagênicos. Os THMs são associados ao risco de câncer na bexiga, câncer colorretal e em defeitos em neonatos de mães expostas, bem como aumento de casos de abortos (SANCHES *et al.*, 2008).

A pesquisa de Wang, Deng e Lin (2007) estimou quais as vias de exposição (inalação, absorção dérmica e ingestão oral) a THM apresenta maiores riscos específicos de câncer (exposição a $1 \mu\text{g} / \text{L}$ de cada espécie de THM), dentre as quatro espécies de THM. Os

resultados revelaram que o maior risco vem da exposição por inalação ao clorofórmio, que ocorre principalmente durante o banho. Esses dados contrariam os estudos de Lee *et al.* (2004) e Tokmak *et al.* (2004) que identificaram que a exposição por ingestão oral apresentava maior risco de câncer.

Dado o indiscutível potencial de agravo à saúde, tem se proposto a redução do uso do cloro para a desinfecção, mas a preocupação com as doenças hídricas resultantes de microrganismos patogênicos resistentes impede esta determinação (ARJONA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012). Pelas razões expostas, métodos de desinfecção alternativos ao cloro têm sido avaliados, inclusive pela indústria de produtos frescos. Neste caso, em recente levantamento feito por Meireles *et al.* (2016), tem sido classificados os métodos biológicos (bacteriocinas, bacteriófagos, enzimas e fitoquímicos), químicos (dióxido de cloro, água oxidante eletrolisada, peróxido de hidrogênio, ozônio, ácidos orgânicos etc.) e físicos (irradiação, filtração, ultrassom, luz ultravioleta etc.) para desinfecção, contudo, os autores ressaltam que o desenvolvimento de novas estratégias e avaliação de sua efetividade em escala industrial são necessários.

3.4 DOENÇAS DE VEICULAÇÃO HÍDRICA

A água é uma fonte importante de patógenos microbianos em regiões em desenvolvimento. A mortalidade por doenças associadas à água ultrapassa a marca de 5 milhões de pessoas por ano, com cerca de 2,5 milhões de mortes causadas por doenças diarreicas em menores de 5 anos. Destas, mais de 50% são decorrentes de infecções intestinais microbianas, tendo a cólera em primeiro lugar (ASHBOLT, 2005; OSWALD *et al.*, 2007; CABRAL, 2010).

Os organismos causadores de doenças de veiculação hídrica são predominantemente de origem fecal e, por essa razão, são denominados de patógenos entéricos, cuja forma de transmissão principal ocorre pela via fecal-oral. O médico inglês John Snow foi um dos pioneiros na epidemiologia da década de 1850 a estabelecer que a cólera era transmitida pela água e a partir daí uma extensa literatura correlacionou a transmissão hídrica de vários patógenos causadores de diarreias e outras doenças (ASHBOLT, 2005).

Descargas de águas residuais em águas doces e marinhas costeiras contendo excretas humanas são a principal fonte de contaminação hídrica (Tabela 3) e, conseqüentemente, o ponto de partida da rota fecal-oral (Figura 1). Com os ambientes aquáticos superficiais e subterrâneos contaminados, a humanidade fica exposta aos patógenos entéricos através de diferentes vias, como o consumo de água potável infectada, de mariscos e outros animais aquáticos sem cozimento, cultivados em águas poluídas e culturas alimentares cultivadas em terra irrigada

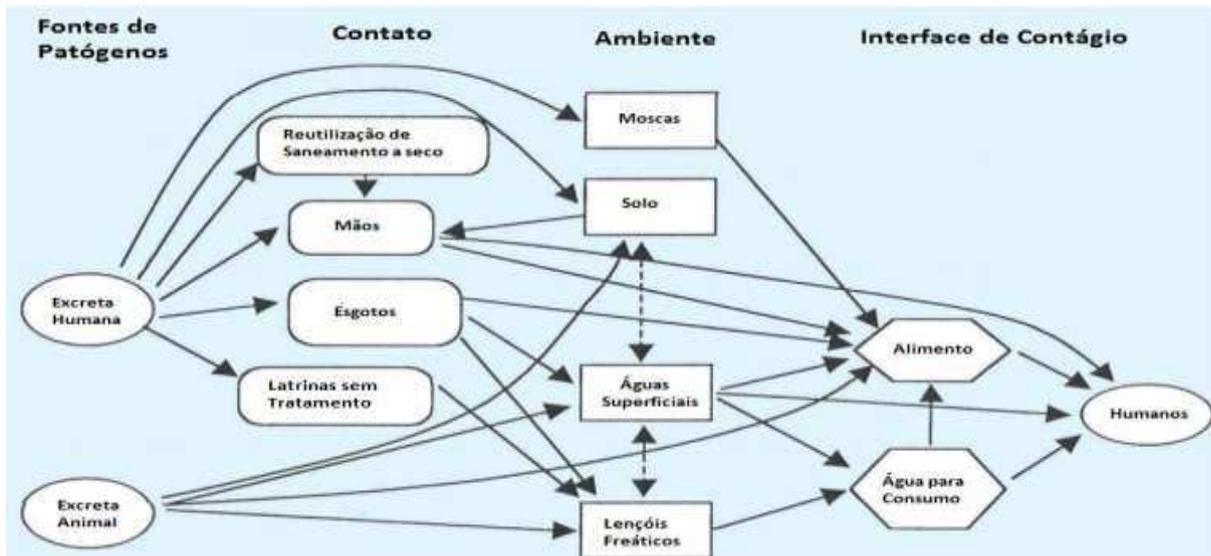
com água contaminada e/ou adubada com esgoto (PRUSS *et al.*, 2002; BOSCH *et al.*, 2008).

Tabela 1 - Principais doenças de veiculação hídrica e os respectivos microrganismos causadores

	Microrganismos causadores	Doenças principais
Bactérias	<i>Salmonella typhi</i>	Febre tifoide
	<i>Salmonella paratyphi</i>	Febre paratifoide
	Outras salmonelas	Salmonelose
	<i>Shigella spp.</i>	Disenteria Bacilar
	<i>Vibrio cholera</i>	Cólera
	<i>E. coli</i> enteropatogênica	Gastroenterites
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gastroenterite
	<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenterite
	<i>Legionella pneumophila</i> e bactérias relacionadas	Doença respiratória aguda (legionelose)
	<i>Leptospira spp.</i>	Leptospirose
Vírus entéricos	Vírus da poliomielite	Poliomielites
	Vírus Coxsackie A	Meningite asséptica
	Vírus Coxsackie B	Meningite asséptica
	Vírus de eco	Meningite asséptica
	Outros enterovírus	Encefalidades
	Rotavírus	Gastroenterite
	Adenovírus	Doença respiratória e gastrointestinal superior
	Vírus da hepatite A	Hepatite infecciosa
	Vírus da hepatite E	Hepatite infecciosa; aborto e morte
	Norovírus	Gastroenterite
Protozoários	<i>Acanthamoeba castellani</i>	Meningoencefalite amebiana
	<i>Balantidium coli</i>	Balantidose (disenteria)
	<i>Cryptosporidium hominis</i> , <i>C. parvum</i>	Criptosporidiose (gastroenterite)
	<i>Entamoeba histolytica</i>	Disenteria amebiana
	<i>Giardia lamblia</i>	Giardíase (gastroenterite)
	<i>Naegleria fowleri</i>	Meningoencefalite amebiana primária
Helmintos	<i>Ascaris lumbricoides</i>	<i>Ascariíase</i>

Fonte: Adaptado de ASHBOLT (2005, p. 232).

Figura 1: Rota fecal-oral.



Fonte: adaptado de PRUSS *et al.* (2002, p. 538).

Nove em cada dez mortes relacionadas às doenças entéricas acometem crianças, majoritariamente de países em desenvolvimento. Os principais patógenos entéricos diagnosticados nessas crianças incluem: rotavírus, *Campylobacter jejuni*,

E. coli enterotoxigênica, *Shigella spp.* e *Vibrio cholerae* O1 e, possivelmente, *E. coli* enteropatogênica, *Aeromonas spp.* *V. cholerae* O139, *Bacteroides fragilis* enterotoxigênicos, *Clostridium difficile* e *Cryptosporidium parvum*. Em adultos, embora haja menos relatos de complicações, já foram reportadas várias sequelas, tais como miocardite, diabetes, artrite reativa e câncer, em alguns meses ou anos após as infecções iniciais. Assim, além dos patógenos tradicionais (helmintos, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, hepatite A e E), vários enterovírus, *C. jejuni* e *H. pylori* são problemas emergentes em adultos (ASHBOLT, 2005).

Vírus entéricos são eliminados em números extremamente altos nas fezes e vômitos de indivíduos infectados. São rotineiramente introduzidos no meio ambiente através da descarga de resíduos não tratados e até mesmo tratados, uma vez que as práticas atuais de purificação são incapazes de fornecer efluentes livres de vírus. O consumo humano de animais e vegetais também contribui para a infecção de vírus entéricos: moluscos bivalves, em especial ostras e mexilhões; plantações de salada, como alface, cebolinha e outras verduras; frutos moles, como framboesas e morangos. Estes alimentos foram associados a surtos de doenças virais entéricas (FONG; LIPP, 2005; BOSCH *et al.* 2008).

Um exemplo de vírus entéricos é o adenovírus. O gênero *Mastadenovirus*, encontrado em 57 sorotipos virais diferentes e divididos em seis espécies, é o responsável pela infecção em humanos (HAdV). São causadores de inúmeras doenças, tais quais as gastroenterites, faringites,

uretrites, cervicites, doenças respiratórias agudas, conjuntivites e meningoencefalites (FONG & LIPP, 2005; FONGARO, 2012).

A cólera (ocasionada pela bactéria patogênica *Vibrio cholerae*) é uma das principais causadoras de morte por doenças entéricas. É caracterizada por um período de incubação que dura cerca de 1 a 3 dias. A doença apresenta um quadro com diarreia aguda e intensa que pode exceder um litro por hora. Outros sintomas são: sede, dores musculares, fraqueza geral, passando a sinais de oligúria (baixa produção urinária), hipovolemia (baixa produção sanguínea) e hemoconcentração. O potássio no sangue cai para níveis muito baixos. Os pacientes sentem-se letárgicos. Finalmente, há um colapso circulatório e desidratação com cianose (OSWALD *et al.*, 2007).

Gastroenterites transmitidas por salmonelas são frequentemente causadas por salmonelas como *Typhimurium*. Cerca de 12 horas após a ingestão de alimentos contaminados, os quadros de diarreia, vômitos e febre aparecem e costumam durar entre de 2 a 5 dias. A cura espontânea geralmente ocorre após esse período (OSWALD *et al.*, 2007).

Outras variações da *salmonella* podem ser mais perigosas à saúde humana, como é o caso da *Salmonella thipy*, responsável pela febre tifoide. Menos grave, porém semelhante, a febre paratifoide é causada pela *S. paratyphi A* e, menos comumente, por *S. paratyphi B* (Schotermis) e *S. paratyphi C* (Hirschfeldii) (OSWALD *et al.*, 2007). Segundo um relatório da OMS em 2006, identificou-se a incidência mundial de 16 a 33 milhões de casos de febre tifoide por ano, com aproximadamente 600.000 mortes e taxa de letalidade entre 1,5 e 3,8% (BHUTTA, 2006; FAROOQUI; KHAN; KAZMI, 2009). Dentre os principais sintomas e complicações da febre tifoide, é possível citar: febre alta, vômito, diarreia, anorexia, perfuração intestinal, dor de cabeça, hepatomegalia e mialgia (BHUTTA, 2006; BEACH *et al.*, 2016).

A eficácia do tratamento de água potável para remover os agentes patogênicos bacterianos responsáveis pela cólera e febre tifoide, tradicionalmente por meio de filtração e cloração, é bem indexada pelo indicador fecal comum, a *E. coli* (ASHBOLT, 2004).

Cepas enterotoxigênicas de *E. coli* podem causar gastroenterite infantil. A doença é caracterizada por diarreia aquosa profusa com duração de vários dias que muitas vezes leva a desidratação e desnutrição em crianças jovens. A *E. coli* enterotoxigênica também é a causa mais comum da chamada “diarreia de viajantes” que afeta indivíduos de países desenvolvidos viajando para regiões mais pobres do mundo (OSWALD *et al.*, 2007).

A *E. coli* enteroinvasora é capaz de invadir e se multiplicar nas células epiteliais do intestino grosso de humanos. A doença é caracterizada por cólicas abdominais, diarreia,

vômitos, febre, calafrios, mal-estar generalizado e aparecimento de sangue e muco nas fezes de indivíduos infectados. Qualquer alimento contaminado com fezes humanas de um indivíduo doente ou através da água, pode transmitir a doença (OSWALD *et al.*, 2007).

3.5 INDICADORES DE POLUIÇÃO FECAL EM AMBIENTES AQUÁTICOS

Indicadores microbianos podem ser classificados em três grupos: os indicadores microbianos de processo, indicadores fecais e organismos modelos. Os indicadores de processo compreendem os organismos que demonstram a eficácia de um processo; indicadores fecais são aqueles organismos que indicam a presença de contaminação fecal e, por este motivo, eles apenas inferem que patógenos podem estar presentes no corpo d'água; e, por fim, os organismos modelos incluem um grupo ou espécie indicativa da presença patogênica e o seu comportamento (FIGUERAS, BORREGO, 2010).

O uso de organismos indicadores para avaliar a qualidade microbiológica e sanitária das águas está bem estabelecido e tem sido praticado há mais de um século. Os indicadores mais utilizados são os coliformes (coliformes totais), fecais ou coliformes termotolerantes, *E. coli*, enterococos (estreptococos fecais ou enterococos intestinais) e bacteriófagos (FIGUERAS, BORREGO, 2010).

Algumas características devem ser levadas em conta para a determinação de um microrganismo como indicador ideal. Pode-se elencar sua aplicabilidade a todos os tipos de água, possuir população mais numerosa no ambiente que outros patógenos, apresentar melhores taxas de sobrevivência no meio, resistência dos possíveis microrganismos patogênicos aos processos de desinfecção e, além disso, ser detectado por meio de metodologias simples e baratas (BETTEGA *et al.*, 2006).

3.5.1 Bactérias entéricas: *E.coli* e *S. enterica*

Coliformes totais pertencem à família Enterobacteriaceae e são bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos, não esporulados, fermentadores de lactose a 35°C, com a produção de gás e de ácido láctico durante 24 a 48 h de incubação e podem ter atividade enzima β -galactosidase. Constituem cerca de 10% dos microrganismos intestinais humanos e outros animais. São encontrados em grandes quantidades no ambiente (fontes de água, da vegetação e solos), não necessariamente associados com a contaminação fecal e não representam necessariamente um risco óbvio para a saúde. São considerados indicadores de degradação de corpos de água. Em águas tratadas estas bactérias servem como um alerta de que ocorreu a poluição, sem identificar a fonte, indicando que houve falhas no tratamento e distribuição de

efluentes (ROBERT PULLÉS, 2014).

Coliformes fecais próprios ou termotolerantes são um subgrupo das bactérias coliformes, grupo presente no intestino de animais de sangue quente e humanos. Sua origem é essencialmente fecal, têm a capacidade de fermentar a lactose, com produção de ácido e gás a 44° C em 24 h de incubação. Inclui a *E. coli* e, em menor medida, as espécies do gênero *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*. Indicam a qualidade da água tratada e a possível presença de contaminação fecal (ROBERT PULLÉS, 2014).

Em se tratar da *E. coli* pertence aos coliformes mais discutidos e está entre os agentes patogênicos associados à disseminação de diversas enfermidades mediante a ingestão de água ou alimentos crus contaminados por dejetos humanos (PUENTES *et al.*, 2017). Está presente no trato gastrointestinal de animais de sangue quente, compondo a microbiota intestinal normal. Contudo, em outras partes do corpo, pode causar doenças graves, tais como infecções do trato urinário, bacteremia e meningite. Algumas cepas podem ser enteropatogênicas, causar diarreia aguda e hemorragia (WHO, 2014).

A *S. enterica* pode estar presente tanto nas fezes humanas, como em fezes de animais, sendo responsáveis por uma gama de doenças. As febres tifoide e paratifoide são causadas pela *S. typhi* e *S. paratyphi* e, eventualmente, por outros sorotipos. Infecções humanas originárias dessa bactéria são uma das mais relatadas mundialmente no que se refere a origens alimentares (FORSYTHE, 2013; LONGO; FAUCI, 2014).

3.5.2 Bacteriófagos como representantes dos vírus entéricos

Os vírus entéricos podem estar presentes naturalmente em ambientes aquáticos ou introduzidos pelo vazamento de esgoto e sistemas sépticos, escoamento agrícola e, no caso de águas estuarinas marinhas, através de emissários de esgoto e descarga de águas residuais de embarcações. São excretados por humanos e resíduos animais mais de 100 tipos de vírus patogênicos (FONG; LIPP, 2005). Um dos agravantes em relação aos vírus entéricos são os números extremamente altos de vírus eliminados nas fezes de indivíduos infectados, mais comumente entre 10⁵ e 10¹¹ partículas virais por grama de fezes. Sendo que destes, os grupos mais estudados pertencem às famílias *Picornaviridae* (poliovírus, enterovírus, coxsakievírus, vírus da hepatite A e ecovírus), *Adenoviridae* (adenovírus), *Caliciviridae* (norovírus, calicivírus, astrovírus) e *Reoviridae* (reovírus e rotavírus). (FONG; LIPP, 2005).

Os bacteriófagos ou fagos, os vírus que infectam células bacterianas para se replicar, são inofensivos aos seres humanos e animais. São amplamente estudados como ferramenta de biocontrole de contaminação fecal, estimando a sobrevivência de agentes patogênicos após

serem expostos a tratamentos químicos, físicos e biológicos. (CARLANDER *et al.*, 2000; SAHLSTRÖM *et al.*, 2008).

Em geral, as pesquisas têm identificado os bacteriófagos como mais resistentes à inativação e eficazes para prever a sobrevivência de vírus entéricos humanos (FONGARO, 2012; MAGRI *et al.*, 2015; MATTLE *et al.*, 2015).

Adicionalmente tem sido demonstrado que as amostras podem ser mantidas a 4° C por pelo menos 48 horas sem alteração significativa no número de bacteriófagos infecciosos, apresentam facilidade de cultivo com técnicas rápidas e econômicas de produção, facilidade de contagem, além de apresentar taxas de inativação similares àquelas reportadas para muitos outros patógenos (JOFRE *et al.*, 2016; SOUZA; DANIEL, 2008).

As moléculas receptoras na superfície das bactérias determinam principalmente a especificidade do hospedeiro. Os fagos ligados aos receptores localizados na parede celular são os mais comuns, normalmente conhecidos como fagos somáticos (SAHLSTRÖM *et al.*, 2008; JOFRE *et al.*, 2016). O PhiX-174, representante do grupo dos Colífagos somáticos, e o MS2, pertencente ao grupo RNA F-específicos, são frequentemente estudados como modelos para avaliar a eficiência de tratamentos de esgoto, água e efluentes (SAHLSTRÖM *et al.*, 2008). Esses dois representantes dos bacteriófagos têm sido reportados na literatura como promissores substitutos para os vírus entéricos humanos devido às suas semelhanças na estrutura, composição e morfologia (FENG *et al.*, 2003).

Os RNA F-específico, tendo como representante o MS2, é sugerido como um bioindicador por ser mais estável e resistente à desinfecção em amostras ambientais. Os fagos PhiX-174 do grupo dos Colífagos somáticos, parasitas intracelulares das *E. coli*, também são potenciais microrganismos modelo para controle da qualidade da água por apresentarem longos períodos de sobrevivência frente a diferentes condições ambientais (FENG *et al.*, 2003; HUERTAS, 2003; YAVARMANESH *et al.*, 2010; MAGRI *et al.*, 2015; MATTLE *et al.*, 2015; FONGARO, 2016).

O MS2 possui um único capsídeo contendo RNA de fita simples como genoma. Este grupo infecta bactérias que possuem o *F-pili* ou *sex-pili* produzidos por células bacterianas masculinas que possuem o plasmídeo F. Este plasmídeo é transferível para uma ampla gama de bactérias gram-negativas, como a *E. coli* e a *Salmonella typhimurium* (SILVA, 2017).

O PhiX-174 pertence à família dos bacteriófagos *Microviridae*, é um vírus pequeno, icosaédrico, sem cauda, com um DNA circular de fita simples. Desde o seu isolamento em 1935, tem sido usado como referência em muitos experimentos devido ao pequeno tamanho de seu genoma e o seu status não patogênico (MICHEL *et al.*, 2010).

3.6 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS COMPOSTOS NATURAIS

A busca pelos poderes de cura das plantas e seus compostos naturais é uma ideia antiga. Povos e tribos indígenas em todos os continentes desde a pré-história têm utilizado emplastos e infusões naturais nas suas práticas medicinais. Há evidências de que os Neandertais vivendo há 60.000 anos no território atual do Iraque já usavam plantas como malva-rosa para essas finalidades. Historicamente, os relatos terapêuticos dos compostos naturais foram misturados entre seus potenciais de cura ou alívio dos sintomas que resultaram (COWAN, 1999).

Plantas medicinais oferecem uma nova fonte de compostos químicos biologicamente ativos como agentes antimicrobianos. São os mais ricos biorrecursos de medicamentos de sistemas tradicionais, medicamentos modernos, nutracêuticos, suplementos alimentares, produtos farmacêuticos, populares e químicos para drogas sintéticas. A aceitação da medicina tradicional como uma forma alternativa de cuidados de saúde e o desenvolvimento de resistência microbiana aos antibióticos disponíveis levou aos pesquisadores a investigar a atividade antimicrobiana de plantas medicinais. Dados denotam que 2 milhões de pessoas adquirem infecções bacterianas nos hospitais dos EUA a cada ano e, destes casos, 70% envolvem cepas resistentes a pelo menos uma droga (HAMMER; CARSON; RILEY, 1999; CUSHNIE, LAMB, 2005; DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010).

A utilização de antimicrobianos naturais transcende à medicina e aplicação em fármacos. A indústria alimentícia também é uma das partes interessadas nas descobertas de antimicrobianos naturais que possam inibir o crescimento bacteriano e fúngico em alimentos, a fim de melhorar a qualidade e o prazo de validade. Da mesma forma, os consumidores ficaram preocupados com a segurança dos conservantes sintéticos usados nos alimentos. Como resultado, há uma crescente demanda por produtos naturais que podem servir como conservantes alimentares alternativos (DORMAN; DEAN, 2000; RAUHA *et al.*, 2000; GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008; GYAWALI; IBRAHIM, 2014).

O estudo de Hammer, Carson e Riley (1999) já confirmava que muitos óleos essenciais e extratos vegetais possuem atividade antibacteriana e antifúngica *in vitro*. No entanto, os autores alertaram que o uso para fins de conservação de alimentos ou para fins medicinais exigiriam maiores investigações quanto às questões de segurança e toxicidade. Como geralmente são necessárias concentrações mais elevadas de compostos vegetais quando adicionadas aos alimentos, sua aplicação pode ser limitada devido a mudanças na qualidade organoléptica e de textura dos alimentos ou interações com outros componentes alimentares (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008).

As plantas têm uma capacidade quase ilimitada de sintetizar substâncias aromáticas, a maioria das quais são fenóis ou seus derivados substituídos por oxigênio. Em muitos casos, estas substâncias servem como mecanismos de defesa da planta contra a predação por microrganismos, insetos e herbívoros. Alguns, como terpenóides, dão às plantas seus odores e outros como quinonas e taninos são responsáveis pelo pigmento da planta, pelo sabor (ex.: capsaicina terpenóide de pimentas). Alguma das mesmas erva e especiarias usadas por humanos para temperar alimentos produzem compostos medicinais úteis. Estes compostos são solúveis em água, álcool e acetona e formam precipitados com proteínas (COWAN, 1999; DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010).

Das substâncias fenólicas hidroxiladas têm-se os flavonóides, que ocorrem como uma unidade C6-C3 para um anel aromático. Os flavonóides são onipresentes nas células fotossintetizantes e comumente encontrados em frutas, legumes, nozes, sementes, caules, flores, chá, vinho, própolis e mel. São conhecidos por serem sintetizados por plantas em resposta a infecções microbianas e a patógenos fúngicos nas folhas. Por isso foi surpreendente quando identificada *in vitro* sua eficácia a uma ampla gama de microrganismos. Esse potencial está ligado à sua capacidade de complexar com proteínas extracelulares e solúveis e por complexar com as paredes celulares bacterianas, sendo que os flavonóides lipofílicos podem também romper membranas microbianas. Todavia, propriedades úteis atribuídas aos flavonoides não se limitam a ação antimicrobiana, pois são relatados, ainda, efeitos anti-inflamatórios, atividade estrogênica, antialérgica, antioxidante, antitumoral citotóxica, atividade vascular e de inibição enzimática (COWAN, 1999; CUSHNIE, LAMB, 2005).

No entanto, quando se fala em flavonoides, as catequinas merecem atenção especial. Constituem-se da forma mais reduzida da unidade C3 em flavonoides compostos. A contribuição das catequinas na função antimicrobiana foi extensivamente evidenciada devido à sua ocorrência em chás verdes, que há muito já se atribuía esse potencial. Estes compostos inibiram *in vitro* bactérias como *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Shigella* e outros microrganismos (COWAN, 1999).

Nas pesquisas com compostos vegetais a metodologia empregada influencia os resultados obtidos (RIOS; RECIO, 2005). O solvente e o sistema de extração podem modificar os resultados finais. Em se tratar de solventes, Rockenbach et al. (2008) analisaram a influência de diferentes solventes (soluções aquosas de etanol e acetona acidificados com HCl) na determinação da eficiência de extração de compostos com capacidade antioxidante em bagaço de uva (*Vitis vinifera*), cujas variedades foram *Tannat* e *Ancelota*. Percebeu-se que os conteúdos de compostos fenólicos totais em acetona foram maiores nas duas variedades, enquanto que os

conteúdos de antocianinas totais foram maiores no solvente etanol; já a atividade antioxidante foi maior utilizando acetona para a variedade Tannat e utilizando acetona e etanol para a variedade Ancelota; o poder redutor foi maior em solvente acetona para ambas as variedades (ROCKENBACH *et al.*, 2008).

Já em relação ao emprego de solventes na remoção de polifenóis da farinha de folha de mandioca, Corrêa *et al.* (2004) avaliaram seu índice de remoção comparando hidróxido de amônio, etanol e água e obtiveram os índices de 94, 83 e 65% de eficiência de remoção, respectivamente. Contudo, é salientado que, devido aos cuidados que deve-se tomar ao manusear o hidróxido de amônio e também devido a uma possível toxidez residual, a utilização de etanol pode ser recomendada (CORRÊA *et al.*, 2004). Em se tratar da utilização de água destilada para extração e produção do extrato de sementes de uva, Ignat *et al.* (2011) a utilizaram na temperatura de 70°C, durante 45 minutos por três repetições e, em estudo de Chedea *et al.* (2010), foi percebido que o extrato aquoso de sementes de uva (variedade romena “Merlot Recas”), é rico em catequinas, epicatequinas e procianidinas, mas estes componentes são instáveis quando estocados à temperatura de 4°C.

No teste com alho *in vitro* de Ross *et al.* (2001), a atividade do alho em pó contra a maioria das bactérias foi maior do que para a planta ou droga bruta. O pH dos compostos em diluições é outro exemplo. Como às vezes pode ser observado quando compostos fenólicos ou carboxílicos estão presentes no extrato. No estudo de Janssen, Scheffer e Svendsen (1987), o óleo de anis apresentou maior atividade antifúngica em pH 4,8 do que em pH 6,8, enquanto o óleo de *Cedrus deudora* foi mais ativo em pH 9,0. A composição do meio de cultura também pode influenciar a atividade dos extratos ou compostos testados. Os achados de Ross *et al.* (2001) sobre os efeitos do alho em pó e óleo de alho evidenciaram que a atividade antimicrobiana do óleo de alho foi maior em meios sem triptona ou cisteína. A seleção dos extratos naturais e sua aplicação dependem de suas propriedades funcionais, disponibilidade, custo-benefício, efeitos sensoriais do produto final e a conscientização do consumidor quanto ao desuso de produtos sintéticos e possivelmente tóxicos.

O chá verde e bebidas à base de uva são tradicionais e populares que têm diversos benefícios à saúde, incluindo propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias e anticarcinogênicas. Nesse sentido, o ECV e ESU são dois extratos de plantas populares que têm sido amplamente utilizados em várias aplicações, principalmente na indústria alimentícia (PERUMALLA; HETTIARACHCHY, 2011).

3.6.1 Extrato de chá verde

O chá verde é preparado de forma a impedir a oxidação de polifenóis de folhas verdes, diferente do chá preto onde a oxidação é promovida e a maioria dessas substâncias é oxidada. Já o chá Oolong é um produto parcialmente oxidado. Dos cerca de 2,5 milhões de toneladas de chá seco fabricados anualmente, apenas 20% corresponde ao chá verde. Os principais consumidores do chá verde são a China, o Japão e alguns países do norte da África e do Oriente Médio. A folha de chá fresco é rica em catequinas, que podem constituir até 30% do peso da folha seca. Outros polifenóis incluem flavonóides e seus glicosídeos e depsídeos como o ácido clorogênico e theogallin (ácido 3-galloiliquino), exclusivo para o chá. Em um nível médio de 3% se encontra a cafeína, acompanhada de quantidades muito pequenas das outras metilxantinas comuns, teobromina e teofilina. O aminoácido teanina (5-Nietilglutamina) também é exclusivo do chá. Além disso, o chá acumula alumínio e manganês (GRAHAM, 1992).

Devido à popularidade mundial e à ausência de toxicidade como agente dietético natural, o chá verde tem se postulado como um excelente candidato na dieta para a prevenção do câncer, para a inibição do crescimento e angiogênese tumoral e também apresenta atividade antimicrobiana (AMAROWICZ; PEGG; BAUTISTA, 2000; HENNING *et al.* 2004; GRADIŠAR, 2007).

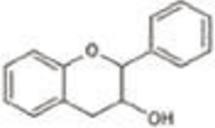
É produzido a partir das folhas de *Camellia sinensis*, que são consumidas em todo mundo como bebida e conhecidas por diversas propriedades medicinais atribuídas, podendo citar os efeitos anti-inflamatórios, antitumoral, antioxidante, antienvhecimento e também o antimicrobiano. Essas atividades farmacológicas são atribuídas às catequinas. Elas são compostos polifenólicos presentes nas folhas seca não fermentada do chá, divididos em epigallocatequina-3-galato (EGCG) que é o mais abundante com cerca 40-60% da sua composição, seguido por epicatequina-3-galato (ECG) com 10-20%, epigallocatequina (EGC) com também 10-20% e epicatequina (EC) com teor menor de 4 a 6% (HENNING *et al.*, 2004; GRADIŠAR, 2007; SHARMA, 2012).

As folhas secas do chá contêm até 30% de polifenóis à base de catequina, como as EGCG e o ECG, que exibem várias atividades fisiológicas como a alta capacidade de eliminação de radicais livres e prevenção da aterosclerose. O consumo de antioxidantes como os flavonoides é relacionado a uma menor incidência de doenças causadas por estresse oxidativo, tais como complicações cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, obesidade e suas comorbidades (AMAROWICZ; PEGG; BAUTISTA, 2000; SAIGG; SILVA, 2009).

Em relação à capacidade antimicrobiana do extrato de chá verde, alguns autores relataram que os polifenóis, principalmente as catequinas e os flavonoides, atuaram eficientemente na inativação de várias estirpes de bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus*, e gram-negativas, como *E. coli* e *Salmonella* (PERUMALLA; HETTIARACHCHY, 2011; COPPO; MARCHESE, 2014). Estudos de Ikigai *et al.* (1999) com epigallocatequina-3-galato (EGCG), no tratamento de bactérias entéricas gram-positivas e gram-negativas, após 1 hora de contato, apresentaram maior eficiência na inativação das bactérias gram-positivas quando comparadas com as gram-negativas. Investigações acerca do mecanismo de ação biocida das epigallocatequina-3-galato (EGCG) são, ainda, incipientes. Neste mesmo trabalho de Ikigai *et al.* (1999), os autores observaram que a membrana celular bacteriana, quando em contato com as catequinas (EGCG), apresentaram danos e desnaturação proteica, levando o organismo-alvo à inativação (IKIGAI *et al.*, 1999).

Araghizadeh, Kohanteb e Fani (2013) também apontaram maior suscetibilidade de bactérias gram-positivas à ação do ECV, provavelmente um efeito atribuído às diferenças na estrutura da parede celular e cargas polissacarídicas das bactérias. Os autores reportaram que possivelmente a atividade inibitória do ECV foi proveniente dos polifenóis, principalmente a partir das epigallocatequina-3-galato (EGCG). Os autores também encontraram uma relação entre a presença das epigallocatequina-3-galato (EGCG) e o rompimento de membranas celulares em bactérias, sugerindo a possibilidade da inibição da enzima DNA girase frente ao tratamento com as EGCG. Desta forma, seria impedida a compactação do DNA bacteriano, ocasionando, conseqüentemente, a morte das bactérias. Configurando assim, as catequinas presentes no extrato de chá verde, principalmente as epigallocatequina-3-galato (EGCG), podem atuar como agente biocida, uma vez que demonstraram eficiência na inativação de bactérias entéricas (ARAGHIZADEH; KOHANTEB; FANI, 2013). Na Figura 2 é representada a estrutura química da classe de polifenóis *Flavon-3-ol* e os seus respectivos microrganismos sensíveis, como *E. coli*, *S. Mutantans* e *Candida spp.*

Figura 2: Estrutura química da classe de polifenóis *Flavon-3-ol* e os correspondentes microrganismos sensíveis

 <p style="text-align: center;">Fig D</p>	EGCG	<i>S. aureus</i> [65] <i>S. mutans</i> [65] <i>E. coli</i> [65] <i>P. aeruginosa</i> [65] <i>K. pneumoniae</i> [73] <i>Candida spp.</i> [54, 74, 75, 76] <i>Dermatophytes</i> [77]
	EGC	<i>E. coli</i> [60]

Fonte: Adaptado de Coppo e Marchese (2014)

Com o objetivo de potencializar ação biocida do ECV, Nakayama *et al.* (2012), testaram a inativação de *Staphylococcus aureus* NBRC 13276 e *E. coli* O157: H7 frente ao tratamento com ECV juntamente com o NaCl ambos na concentração de 4% em pH 6,5. Foi constatado um decaimento mais rápido nas concentrações das bactérias entéricas estudadas após 48 horas de tratamento, se comparado ao decaimento mais lento e gradual no tratamento baseado somente com o ECV também a 4%. Os autores sugeriram que a diferença na inativação entre os dois tratamentos pode estar intimamente relacionada a adição do NaCl.

Os autores reportaram que foi possível observar em microscópio eletrônico a capacidade das catequinas de se ligar e proporcionar danos às proteínas existentes nas membranas celulares das bactérias. Estas proteínas compõem principalmente enzimas e estruturas essenciais para sua sobrevivência (ARAGHIZADEH; KOHANTEB; FANI, 2013).

Considerando que o chá verde é uma bebida consumida em grande parte do mundo e, portanto, de fácil acesso e aceitação. Considerando os resultados obtidos em relação a sua ação microbiana (IKIGAI *et al.*, 1999; AMAROWICZ; PEGG; BAUTISTA, 2000; HENNING *et al.* 2004; GRADIŠAR, 2007; PERUMALLA; HETTIARACHCHY, 2011; NAKAYAMA *et al.*, 2012; ARAGHIZADEH; KOHANTEB; FANI, 2013; COPPO; MARCHESE, 2014), ação esta que pode, ainda, ser potencializada com a combinação com NaCl (NAKAYAMA *et al.*, 2012), leva-nos a sugerir a possibilidade do ECV como um composto vegetal capaz de auxiliar na remediação de águas.

3.6.2 Extrato de semente de uva

O ESU é produzido por meio de um processo de extração, secagem e purificação das sementes de *Vitis vinifera*. As uvas *Vitis vinifera* são consideradas uma das maiores culturas de fruta do mundo, com uma produção anual aproximada de 50 milhões de toneladas

(JAYAPRAKASHA; SELVI; SAKARIAH, 2003). O subproduto dessas sementes origina um extrato rico em compostos fenólicos monoméricos, tais como catequinas, ácido gálico, epicatequina, galocatequina e procianidinas diméricas, triméricas e tetraméricas. Os compostos fenólicos contribuem para o amargor e adstringência de frutas e sucos de frutas, devido à interação entre fenólicos, principalmente procianidinas e as glicoproteínas da saliva (JAYAPRAKASHA; SELVI; SAKARIAH, 2003; PERUMALLA; HETTIARACHCHY, 2011). Estes compostos atuam como antimutagênicos, agentes antivirais e inibem a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), exercendo um efeito antioxidante. Benefícios que credenciaram o ESU como suplemento dietético (PERUMALLA; HETTIARACHCHY, 2011).

Já foi identificado que a capacidade antimicrobiana das sementes de uva está relacionada aos polifenóis e que eles são fonte rica destes compostos. Os fenóis representam o terceiro constituinte mais abundante de uvas e vinhos após carboidratos e ácidos de frutas. Do conteúdo total de fenóis presentes nas uvas, 60 a 70% estão nas sementes e 5 a 8% do peso das sementes é constituído pelo conteúdo fenólico. Os fenólicos mais abundantes isolados das sementes de uva são os flavonoides, em especial as catequinas (catequina, epicatequina e procianidinas) e seus polímeros (SHI *et al.*, 2003).

Uma série de trabalhos já comprovaram efeitos antimicrobianos do ESU. Jayaprakasha, Selvi e Sakariah (2003) testaram o extrato quanto à atividade antibacteriana pelo método da placa fluida contra *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Verificou-se que as bactérias gram-negativas foram completamente inibidas a 850-1000 ppm, enquanto as bactérias gram-positivas foram inibidas na concentração de 1250-1500 ppm. Constataram que o ácido gálico foi o princípio ativo do ESU responsável pela inibição das bactérias entéricas *E. coli*. Em outro estudo foi avaliado o potencial bactericida do ESU em relação a *E. coli* O157:H7. Sobre esta bactéria, causadora da síndrome hemolítico-urêmica, uma doença grave associada à diarreia sanguinolenta e até a morte, constatou-se que o ESU foi eficaz na inibição de sua motilidade (ZHU *et al.*, 2015).

Na pesquisa de XU *et al.* (2007), o poder desinfetante do ESU foi testado para reduzir as populações de três cepas de *Salmonella spp.* e três cepas de *Listeria monocytogenes* em vegetais verdes inteiros (alface e pepino). Foi demonstrada inibição significativa frente às bactérias ($p < 0,05$), além de prolongar o tempo de preservação do vegetal. A qualidade sensorial foi igualmente avaliada e não houve diferença significativa em relação às propriedades organolépticas e visuais (XU *et al.*, 2007).

Estudos de BISHA *et al.* (2010) também testaram o potencial do ESU quando dissolvidos em água e aplicados na desinfecção de alimentos. O extrato de semente de uva foi

utilizado na concentração de 1,25 mg/mL para tratar tomates. Os autores observaram que, após 2 min de contato com a superfície dos tomates, houve remoção de 2 logs de *L. monocytogenes*, quando comparados com seus respectivos controles (BISHA *et al.*, 2010). Enquanto SHAN *et al.* (2009) analisaram a inativação de *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *S. enterica* em fatias de carne de porco cruas e misturadas, submetidas ao ESU a 40 mg/mL, verificaram um decaimento de 1,36, 0,96 e 1,75 logs após 9 dias de tratamento (SHAN *et al.*, 2009).

O estudo de Su e D'Souza (2011) relatou que o ESU foi eficaz na inativação dos vírus calicivírus felino, MNV-1, MS2 e vírus da hepatite A. O ESU na concentração de 2 mg/mL após 2 horas de incubação a 37 ° C promoveu a remoção de calicivírus felino (4,61 logs), MNV-1 (1,73 logs), MS2 (1,60 logs) e hepatite A (3,20 logs).

Os mecanismos antivirais do ESU ainda não foram completamente elucidados. Palamara *et al.* (2005) sugerem que o resveratrol, um polifenol não flavonóide encontrado nas uvas, afeta várias vias de sinalização intracelular do vírus influenza envelopado. Joshi, Su e D'souza (2015) verificaram que o extrato de semente foi capaz de apresentar um decaimento de viabilidade significativo dos vírus da hepatite A, calicivírus felino e norovírus murino, após 24h de tratamento nas concentrações entre 2 e 4 mg/mL. Os pesquisadores concluíram que o ESU parece ser uma opção natural adequada para a redução dos vírus transmitidos por alimentos (JOSHI; SU; D'SOUZA, 2015).

Na Tabela 4 estão dispostos alguns resultados obtidos em trabalhos que se propuseram a analisar tratamentos de inativação viral com soluções de ESU.

Tabela 4 - Tratamentos de inativação viral com soluções de ESU.

Vírus	Concentração ESU (mg/mL)	Método	Remoção	Produto	Fonte
FCV-F9	0,25–1,0	1-5 min	2,20–3,05	Alface e pimenta	Su; D'Souza (2013)
MNV-1	0,25–1,0	1 min	0,2–0,8	Alface e pimenta	Su; D'Souza (2013)
HAV	0,25–1,0	1 min	0,7–1,3	Alface e pimenta	Su; D'Souza (2013)
MNV-1	2	2h/ 37 °C	1,41	–	Joshi; Su; D'Souza (2015)
FCV-F9	0,25	2h/37 °C	1,73	–	Joshi;Su;D'Souza (2015)
HAV	2	2h/37 °C	2,18	–	Joshi; Su; D'Souza (2015)
FCV-F9	0,25–1,0	2h/37 °C	3,64–4,61	–	Su; D'Souza (2011)
MNV-1	0,25–1,0	2h/37 °C	0,82–1,73	–	Su;D'Souza (2011)
MS2	0,25–1,0	2h/ 37 °C	1,13–1,60	–	Su; D'Souza (2011)

HAV	0,25–1,0	2 h/37 °C	1,81–3,20	–	Su; D’Souza (2011)
MNV-1	2		> 2	Água de lavagem	Li;Baert;Uyttendaele (2013)

Fonte: elaborado pela autora

Imagens de microscopia eletrônica de varredura demonstraram diferenças na estrutura das membranas celulares das bactérias expostas ao ESU. Quando comparadas com as bactérias controle não tratadas, células controles permaneciam com a sua membrana celular intacta e viável. Foi observado nas células bacterianas tratadas com ESU nas concentrações de 1,8% e 3,6%, danos na membrana bacteriana, que podem ser o possível alvo de atuação do ESU (MOLVA; BAYSAL,2015).

Conforme estudos relatados no presente trabalho, os principais mecanismos de ação envolvidos no processo de desinfecção dos microrganismos-alvo (vírus e bactérias) são: a interação com as proteínas da membrana por meio de ligações de hidrogênio, o que pode causar alterações na permeabilidade da membrana e resultar na morte das células. Os componentes fenólicos também podem penetrar nas células bacterianas e coagular o conteúdo celular; interferir na função da membrana, como o sistema de transporte de elétrons; absorção de nutrientes; síntese de proteínas e ácidos nucleicos; e atividade enzimática. Particularmente, alguns componentes individuais do ESU, como o ácido gálico, podem efetivamente permeabilizar a membrana externa de *Salmonella spp.* provocando sua desintegração (MOLVA; BAYSAL, 2015).

Diante desses resultados, o estudo supracitado concluiu que o ESU parece ter amplo espectro de atividade, sendo tanto efetivo contra os patógenos bacterianos, quanto para os vírus de origem alimentar (JAYAPRAKASHA, SELVI, SAKARIAH, 2003; XU *et al.*, 2007; ZHU *et al.*, 2015). Assim, foi demonstrado o seu potencial como uma promissora alternativa para aumentar a segurança, a vida útil, e a melhoria da qualidade dos alimentos. Corrobora, ainda, a seu favor o fato de a obtenção do ESU ser fácil e barata em todo o mundo devido ao grande cultivo mundial de uvas (SU; D’SOUZA, 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERÍSTICAS E SOLUBILIZAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DE SEMENTE DE UVA E CHÁ VERDE

Os ESU (Micro Ingredients™), denominados comercialmente como Gravinol-S, apresentam uma coloração marrom e, conforme as especificações do fabricante, são provenientes da semente da uva *Vitis vinifera*, trazendo em sua composição valores acima de 95% de proantocianidinas. Já os ECV utilizados (Bulk Supplements), segundo o fabricante, contêm mais de 50% de polifenóis, 35% de catequinas, sendo 15% de EGCG (Epigallocatequina-3-galato). Ambos ESU e ECV são registrados na FDA (*Food and Drug Administration*).

Os extratos foram solubilizados em 500 mL de água a 50° C e as concentrações de extrato adotadas foram delineadas com base em experimento piloto estabelecido previamente a este estudo. Para ECV as concentrações usadas neste estudo foram de 2 e 5 mg/mL e 3 e 5 mg/mL para o extrato de semente de uva (ESU). Após a solubilização total dos extratos, os frascos foram estocados durante 15 horas a 4° C.

Os ensaios e a preparação das amostras foram realizados no Laboratório de Microbiologia pertencente ao grupo de pesquisa em Recuperação de Recursos em Sistemas de Saneamento (RRESSA) do Departamento de Engenharia Sanitária Ambiental e no Laboratório de Virologia Aplicada do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, ambos localizados na Universidade Federal de Santa Catarina.

4.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Os parâmetros físico-químico avaliados em cada um dos seis jarros após adição dos extratos foram:

1. Temperatura amostral;
2. Variação de pH;
3. Turbidez;
4. Cores aparente e verdadeira.

Em relação ao pH, a mensuração ocorreu em duas etapas: ao início e fim do experimento, utilizando-se o aparelho Alfakit (modelo AT315). Já a mensuração da turbidez e cor ocorreu apenas ao final do experimento, no Laboratório Integrado de Meio Ambiente (LIMA). A temperatura foi obtida em graus Celsius (°C); já para a turbidez, a unidade de medida

foi a unidade de turbidez (uT), obtida em turbidímetro (Hach modelo 2100N); as cores aparente e verdadeira foram determinadas em análise por espectrofotômetro (Hach modelo DR 3900). As cores verdadeiras e aparentes foram aferidas segundo o método 2120 C, descrito por AWWA (AWWA, 2005), cuja faixa correspondente encontra-se entre 450 e 465 nm do espectro de luz visível, tendo como referências soluções de Pt/Co (platina- cobalto). O ajuste do pH foi estabelecido para 7,6, mediante adição de NaOH (hidróxido de sódio) a 0,1N (LUCIDO, 2010). As amostras para a análise de cor verdadeira foram filtradas com filtro para seringa a 0,22 μm .

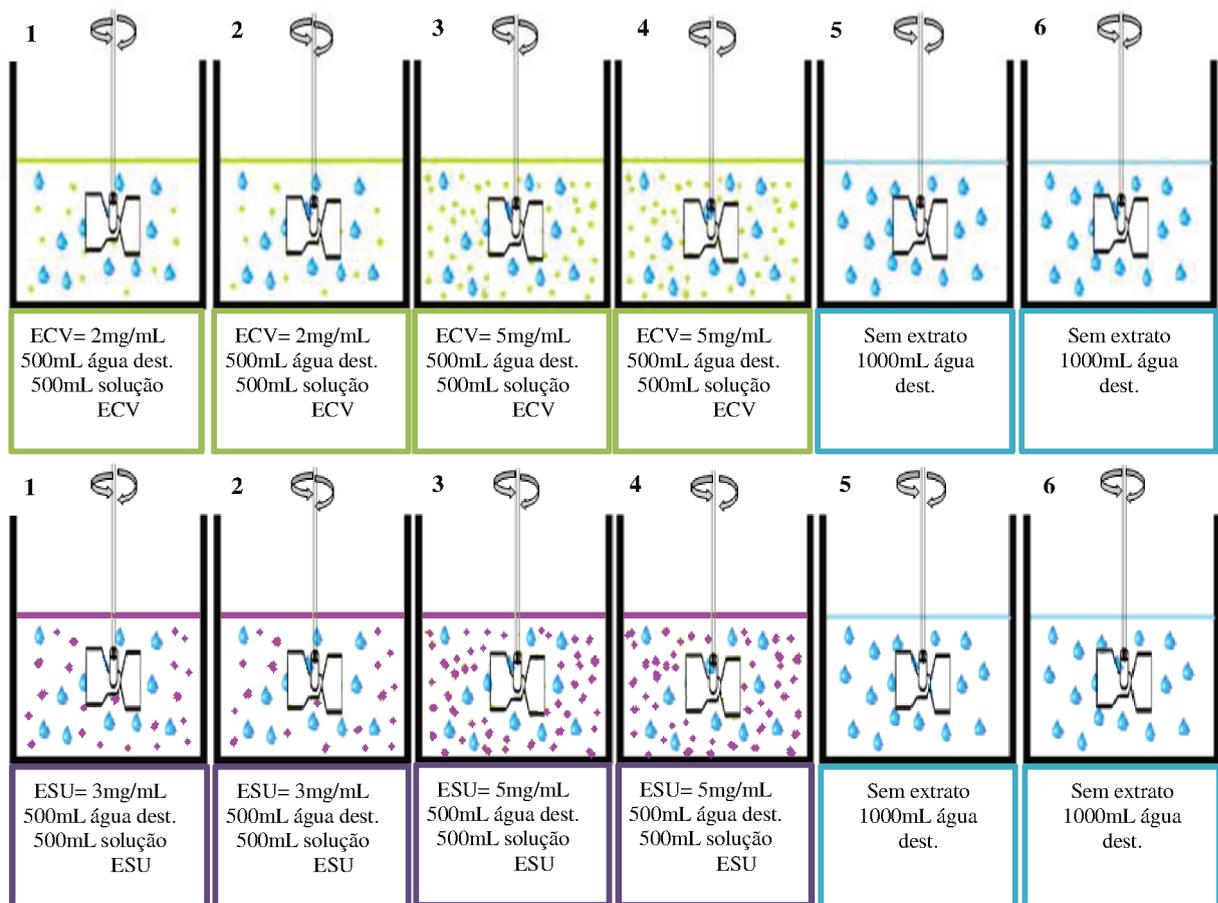
4.3 BIOINDICADORES MICROBIOLÓGICOS ENTÉRICOS

Os modelos microbiológicos entéricos *E. coli* ATCC13706, *S. enterica - Typhimurium* WG49 NCTC12484, bacteriófagos PhiX-174 e MS2 foram utilizados para elucidar a eficiência da inativação nos tratamentos proposto no presente estudo. Todas as amostras microbiológicas empregadas nos ensaios pertenciam ao laboratório de microbiologia do grupo de pesquisa RRESSA.

4.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DESINFECÇÃO

Os testes de avaliação dos compostos foram realizados usando água destilada no Agitador Jar Test (Ethik Technology, 218/6LDB), o qual contém 6 jarros de capacidade de 2 litros, com agitadores reguláveis. O gradiente de agitação utilizado foi 90 s^{-1} . Os extratos naturais foram avaliados isoladamente quanto a sua atividade biocida, iniciando os ensaios com o ECV e, posteriormente, com o ESU. Nos jarros 1 a 4 foram adicionados 500 mL de água destilada e 500 mL da solução do extrato e, a cada um dos últimos jarros (5 e 6), foi adicionado 1 litro de água destilada, conforme figura 3 tendo em vista que estes não seriam acrescidos da solução previamente preparada, por serem os controles. Nos jarros 1 e 2 as concentrações testadas foram de 2 mg/mL para o experimento com ECV, 3 mg/mL para o ESU e 5 mg/mL para os jarros 3 e 4, em todos os ensaios (Figura 3).

Figura 1: Representação esquemática dos ensaios *Jar test* utilizados na execução deste trabalho



Legenda: dest: Água destilada. **Fonte:** Elaborado pela autora

Para determinar a cinética de inativação dos patógenos entéricos ao longo do experimento foram inoculadas amostras com *S. enterica-Typhimurium* (5.0×10^7 UFC mL⁻¹), *E. coli* ($3,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹), bacteriófagos PhiX-174 ($7,8 \times 10^{11}$ UFP mL⁻¹) e os bacteriófagos MS2 F-específico ($6,2 \times 10^7$ UFP mL⁻¹) em cada jarro (Figura 3). Foram coletados 1 mL de amostra proveniente dos tratamentos e controles nos seguintes tempos de contato: 0, 10, 20, 40, 60 e 120 min para a enumeração das bactérias; para a enumeração dos bacteriófagos, os tempos foram: 0, 15, 30, 60, 120 e 180 min. Segundo FONG e LIPP (2005) os vírus são normalmente apontados como mais estáveis no ambiente e mais resistentes frente às bactérias. Por essa razão, entendeu-se que o tempo de contato com os bacteriófagos deveria ser mais prolongado. Os experimentos foram realizados em duplicatas, os resultados obtidos foram contabilizados por meio da média aritmética através da contagem de unidades formadoras de colônia UFC/mL em cada placa. Durante os ensaios, a temperatura da água se manteve entre 20 a 25 °C e as variações do pH foram monitoradas em cada jarro antes e depois dos ensaios.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE *E. coli* e *S. enterica*

Para avaliar *S. enterica* e *E. coli*, alíquotas de 1 mL das amostras provenientes dos tratamentos e controles de cada jarro ao longo do experimento foram coletadas nos diferentes tempos de contato e acrescidas de 9 mL de solução com NaCl tamponado e diluídas em série até o esgotamento. A quantificação *S. enterica*, foi de acordo com a ISO 6579 (2002), em que, no mínimo, duas diluições com alíquotas de 100µL das amostras previamente diluídas foram semeadas em Ágar XLD (Xilosa, Lisina, Desoxicolato) e incubadas por 24 horas à temperatura de 37°C. Colônias típicas foram contabilizadas e os resultados expressos em unidades formadoras de colônias (UFC) por mL. Já a *E. coli* foi enumerada segundo a ISO 4832 (2006), de modo que alíquotas de 100µL com, no mínimo, duas diluições das amostras previamente diluídas foram inoculadas em placas de Petri com ágar MacConkey. Então, as Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL foram contabilizadas após 24 horas de incubação à temperatura de 37°C.

4.6 QUANTIFICAÇÃO PHIX-174 E MS2

As análises dos bacteriófagos seguiram a ISO 10705-2: 2000 (2001), pelo método de ágar duplo (Adams, 1959) com o cultivo de bactérias hospedeiras a 37°C por 3-5 horas para enumeração dos fagos. A bactéria utilizada para a propagação dos bacteriófagos PhiX-174 foi a *E. coli* (ATCC13706), de acordo com a ISO (ISO10705-2: 2000 (2001)). A enumeração dos bacteriófagos MS2, foi de acordo com a ISO 10705-1:1995 utilizando *Salmonella typhimurium* WG49 NCTC12484 para propagação. As placas contendo as amostras avaliadas foram contabilizadas após 12 horas de incubação a 37°C. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Placa (UFP) por mL.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

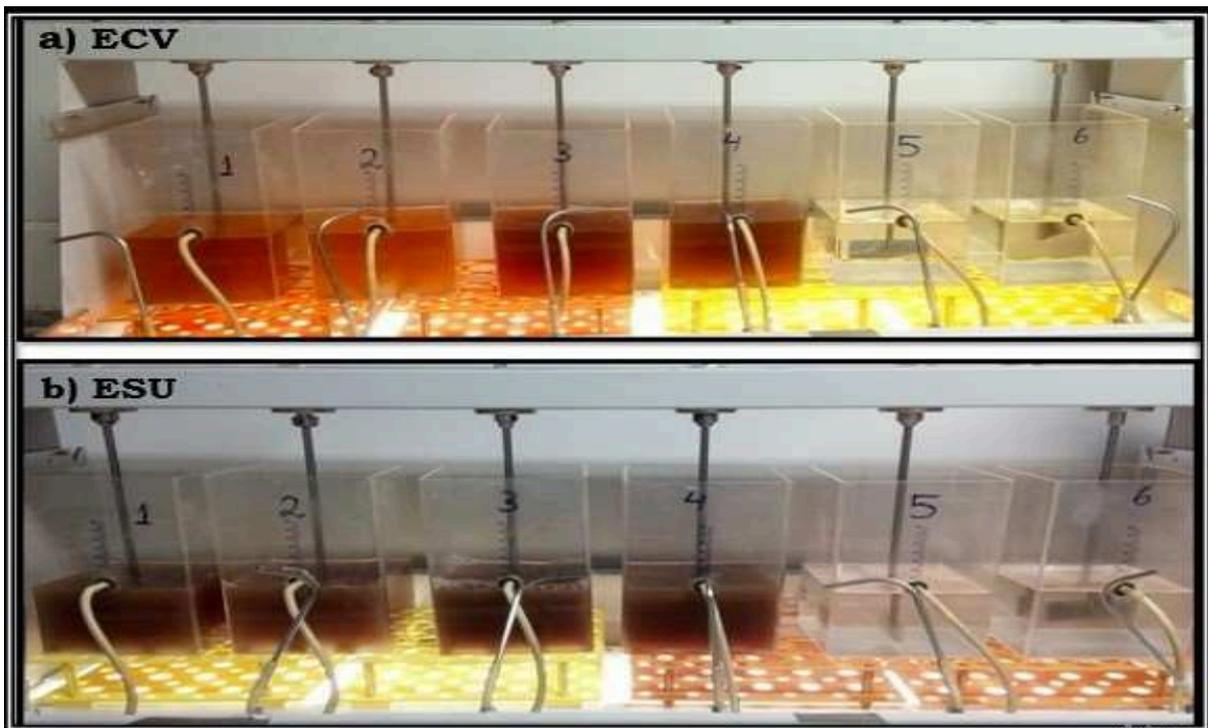
Para avaliar a inativação dos bioindicadores microbiológicos entéricos testados nos diferentes tempos de contato, foi utilizado o software *Statistica 12*. Os testes aplicados foram o *One-Way* de variância (ANOVA) e, posteriormente, para analisar mais detalhadamente as diferenças entre os tratamentos, foi usado o Bonferroni como teste *post hoc*. Os valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos. O T_{90} também foi usado para estimar o tempo para redução 1 Log_{10} (90%) dos bioindicadores microbiológicos entéricos (SINTON; HALL; BRAITHWAITE, 2007), calculado por regressão linear utilizando o *Microsoft Excel*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO EXTRATO DE CHÁ VERDE E EXTRATO DE SEMENTE DE UVA

Os parâmetros físico-químicos avaliados após a adição dos extratos frente às diferentes concentrações dos ECV e ESU foram: pH, turbidez, temperatura, cores aparente e verdadeira (Figura 4; Quadro 1).

Figura 4: Jar-test após a adição do ECV e ESU diluídos em 1L de água destilada



Legenda: Imagem 4a *Jar-test* após a adição do ECV. Nos jarros 1 e 2 concentrações finais de 2 mg/mL e de 5 mg/mL nos jarros 3 e 4. Imagem 4b *Jar-test* após a adição do ESU concentrações finais de 3 mg/mL nos jarros 1 e 2 e 5 mg/mL nos jarros 3 e 4, os jarros 5 e 6 foram reservados para o controle em ambos os ensaios. Imagem fotográfica: Carlon, 2018.

Conforme o Quadro 1, verifica-se que não houve variações na temperatura para os dois tratamentos (ECV e ESU). O pH inicial e final para ambos os extratos apresentaram caráter ácido frente às diferentes concentrações, permanecendo abaixo de 5,0. Quanto à turbidez, é possível observar no Quadro 1, que a maior concentração de 5 mg/mL (jarros 3 e 4) apresentou valores elevados de turbidez para os dois compostos testados, quando comparados com o tratamento na concentração 2 mg/mL em 3 mg/mL de extrato (Jarros 1 e 2 das Figuras 4-a e 4-b). Dadas estas características físico-químicas de pH e turbidez observadas, o direcionamento da água tratada com ESU ou ECV para consumo humano não é apropriado, pois não obedece as “Diretrizes para qualidade da água potável”

estabelecidas pela OMS (2011) no que se refere à cor, turbidez e pH. Segundo esta mesma diretriz (OMS, 2011), a água que, mesmo potável, não se apresentar incolor, inodora e insípida pode ser reconhecida como insegura pelos consumidores e, conseqüentemente, rejeitada. Entretanto, seu emprego na agricultura pode ser testado em estudos futuros no intuito de se avaliar a água com ESU ou ECV como candidatas na substituição ao cloro em sistemas de irrigação agrícola.

Em se tratar da solubilidade do extrato, neste estudo, os resultados indicam a presença de partículas em suspensão resultantes da aplicação dos extratos na água destilada. Nas soluções com presença de extrato havia formação de precipitado no fundo dos jarros, o que exigia agitação constante pelo equipamento *jar test* para evitá-los. Vale destacar que foi observado que o ESU demonstrou ser menos solúvel em água destilada, diferentemente do ECV. Essa diferença na solubilização dos compostos pode ser o motivo para o ESU apresentar valores superiores de turbidez quando comparado ao ECV, atingindo valores próximos de 1300 uT, para a concentração 5 mg/mL. Já para a mensuração de turbidez para a concentração 5 mg/mL com ECV, a média foi de 803 uT (Quadro 1).

O Quadro 1 também exhibe os resultados obtidos de turbidez para o tratamento controle (jarros 5 e 6). Nestes, a água destilada foi artificialmente contaminada com 1% (10 ml) dos bioindicadores escolhidos nos ensaios de desinfecção associados ao meio de cultura utilizado para propagá-los. A média geral foi de 8,29 uT. O aumento da turbidez nos controles (Quadro 1) pode se dever à presença dos patógenos e o meio de cultura inoculado nos jarros.

Conforme ilustrado na Figura 4-a, após adição do ECV a água destilada exibiu uma coloração esverdeada, sendo mais intensa nas concentrações de 5 mg/mL (jarros 3 e 4). Em relação ao ESU (Figura 4-b), foi observado que a homogeneização do composto na água gera uma coloração roxa escura, também mais intensa nas concentrações de 5 mg/mL (jarros 3 e 4). Essa percepção da cor permaneceu durante os 120 minutos em todas as concentrações aplicadas nos ensaios. No Quadro 1, verifica-se que as concentrações 5 mg/mL para o ECV, os valores médios de absorvância medidos para a cor aparente (amostra não filtrada), assim como os resultados obtidos para a cor aparente do ESU (3 e 5 mg/mL), ficaram acima do limite de detecção da técnica. Desse modo, não foi possível medir os valores de absorvância no espectrofotômetro nas concentrações empregadas.

A cor aparente dos controles demonstra que essas amostras sofreram elevação em razão da presença de microrganismos e do meio de cultura empregado. Entretanto, mais

estudos precisam inferir se essas características são mantidas após um período superior ao observado e também avaliar a estabilidade desses compostos em água de reuso, potável e efluente.

Quadro 1- Parâmetros físico-químicos do ECV e do ESU no experimento

	Jarros	pH		Turbidez (uT)	CA e CV (uH)		Temperatura (°C)
		Inicial	Final		CA	CV	
ECV	1	3,53	4,27	186	3504	2239	23
	2	3,45	4,28	221	3897	2095	22
	3	3,15	3,69	815	+	3986	22
	4	3,16	3,77	782	4488	2067	22
	5	6,05	6,22	8,23	399	16	22
	6	6,01	6,2	8,28	405	18	22
ESU	1	4,18	4,69	779	+	2805	20
	2	4,16	4,74	731	+	2698	20
	3	4,13	4,48	1200	+	4323	20
	4	4,2	4,49	1246	+	4466	20
	5	6,05	6,03	8,38	544	16	20
	6	6,03	6,03	8,2	573	18	20

Legenda: uT: unidade e turbidez; CA: cor aparente; CV: cor verdadeira; (+): acima do limite de detecção da técnica.

5.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO EXTRATO DE CHÁ VERDE

5.2.1 Concentrações médias de *E. coli* e *S. enterica* por todo o período avaliado com ECV

As concentrações médias das bactérias *E. coli* e *S. enterica*, dadas em \log_{10} , ao longo do tratamento com o ECV para cada jarro, estão descritas nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5 – Concentrações médias de *E. coli* (em \log_{10}) para cada jarro com o tratamento proposto com o ECV ao longo do experimento

Tempo (min)	Jarro 1 (2mg/mL)	Jarro 2 (2mg/mL)	Jarro 3 (5mg/mL)	Jarro 4 (5mg/mL)	Jarro 5 (Controle)	Jarro 6 (Controle)
0	7,07	7,07	7,07	7,07	7,07	7,07
10	7,05	7,18	7,15	6,77	6,57	7,04
20	7,18	7,02	6,90	7,12	7,22	6,98
40	6,71	6,47	6,64	6,72	7,05	6,98
60	6,70	6,52	6,35	6,15	6,83	6,88
120	6,23	6,38	5,91	5,79	6,44	6,46

Tabela 6 - Concentrações médias de *S. enterica* (em \log_{10}) para cada jarro com tratamento proposto com o ECV ao longo do experimento

Tempo (min)	Jarro 1 (2mg/mL)	Jarro 2 (2mg/mL)	Jarro 3 (5mg/mL)	Jarro 4 (5mg/mL)	Jarro 5 (Controle)	Jarro 6 (Controle)
0	7,22	7,22	7,22	7,22	7,22	7,22
10	6,52	7,00	6,90	6,49	7,44	6,63
20	6,38	6,47	6,41	6,50	NA	NA
40	6,56	6,63	6,47	6,23	6,76	6,48
60	NA	NA	6,14	6,23	6,43	6,19
120	6,25	6,33	5,93	6,01	6,44	6,28

Legenda: NA (Não Avaliado)

Cabe ressaltar em relação à Tabela 6, que no tempo de 60 minutos para a concentração 2 mg/mL (jarras 1 e 2) e 20 minutos para os jarras 5 e 6 (jarras sem tratamento), os resultados se mostraram acuatadamente discrepantes das demais amostras analisadas. Esse fato ocorreu em virtude da baixa diluição das amostras no momento de emplacá-las, afetando, assim, a acurácia dos resultados. Para reduzir essa distorção, optou-se por desconsiderar os seus dados para análise estatística e classificá-los como “não avaliados” (NA).

Nas Tabelas 7 e 8 são apresentadas as concentrações médias em \log_{10} das bactérias *E. coli* e *S. enterica*, nessa ordem, a partir das concentrações médias de cada jarro para as duas concentrações testadas do ECV (2 e 5 mg/mL) e as remoções por tempos de coleta, bem como a remoção final do experimento.

Os valores médios das remoções por tempos de coleta, representadas entre parênteses,

foram obtidos por meio da diferença (em \log_{10}) ao longo do experimento em cada tempo de contato avaliado. Para a obtenção da remoção final foi realizada a diferença da concentração média inicial (T0) e final (T120) das bactérias entéricas.

Tabela 7 – Concentrações médias a partir das duplicas (em \log_{10}) de *E. coli* no tratamento proposto com o ECV e as remoções em \log_{10} ao final do experimento

Tempo (min)	2 mg/mL		5 mg/mL		Controle	
0	7,07		7,07		7,07	
10	7,11	(-0,04)	6,96	(0,11)	6,8	(0,27)
20	7,10	(0,01)	7,01	(-0,05)	7,1	(-0,30)
40	6,59	(0,51)	6,68	(0,33)	7,01	(0,09)
60	6,61	(-0,02)	6,25	(0,43)	6,85	(0,16)
120	6,31	(0,30)	5,86	(0,39)	6,45	(0,40)
Remoção Final	0,76		1,21*		0,62	

Tabela 8 – Concentrações médias a partir das duplicas (em \log_{10}) de *S. enterica* no tratamento proposto com o ECV e as remoções em \log_{10} ao final do experimento

Tempo (min)	2 mg/mL		5 mg/mL		Controle	
0	7,22	-	7,22	-	7,22	-
10	6,76	(0,46)	6,69	(0,53)	7,03	(0,19)
20	6,42	(0,34)	6,45	(0,24)	NA	-
40	6,59	(-0,17)	6,35	(0,10)	6,62	-
60	NA	-	6,18	(0,17)	6,31	(0,31)
120	6,29	-	5,97	(0,21)	6,36	(-0,05)
Remoção Final	0,93		1,25*		0,86	

Legenda: São apresentados os valores das remoções parciais (entre parênteses: por tempo de coleta) e remoções finais obtidos mediante a diferença (em \log_{10}) da concentração inicial e final de *S. enterica*. NA (Não Avaliado). Diferença significativa ($p < 0,05^*$).

A partir dos resultados das remoções das bactérias *E. coli* e *S. enterica*, frente ao tratamento com o extrato natural de chá verde modelou-se a cinética de inativação desses patógenos entéricos.

5.2.2 Cinética de inativação de *E. coli* e *S. enterica* com ECV

As concentrações médias das bactérias *E. coli* e *S. enterica* ao longo do experimento com o ECV, foram plotadas no *software Statistica 12* e ilustradas nas Figuras 5a-5b.

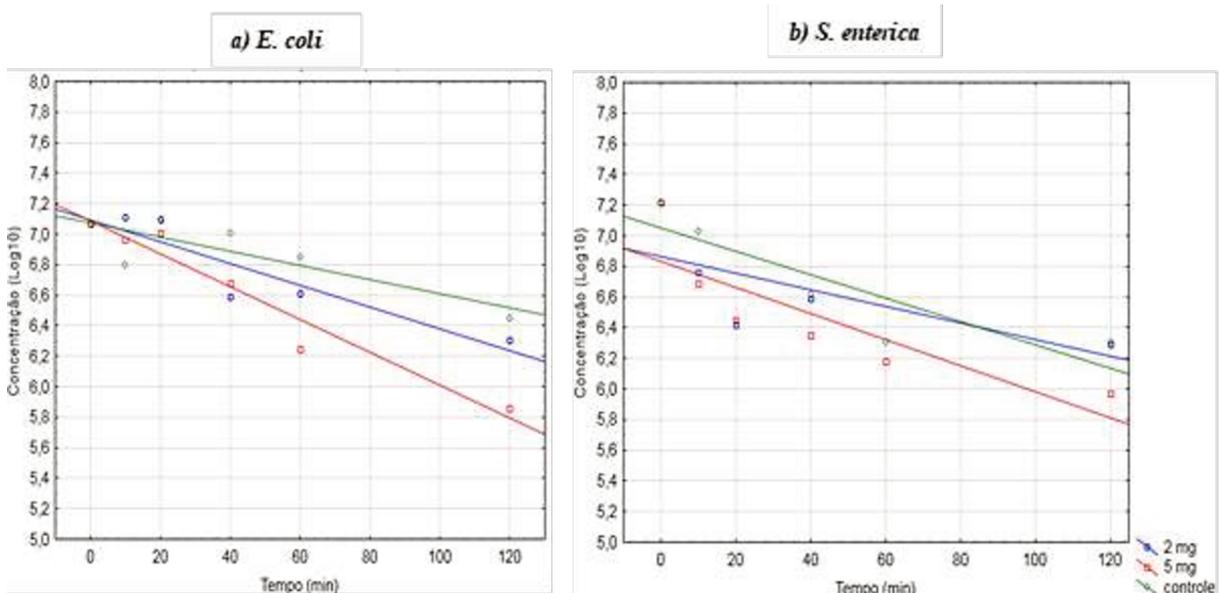
Nas concentrações de 2 mg/mL, o ECV atingiu 0,76 \log_{10} de remoção de *E. coli* (Figura 5-a), sendo constatado no teste *One-Way* de variância (ANOVA) que não houve diferença significativa do seu respectivo controle sem o extrato ($p \geq 0,05$). Já o tratamento frente à concentração de 5 mg/mL, o teste *One-Way* de variância (ANOVA) demonstrou redução

significativa quando comparado ao controle, apresentando um decaimento de 1,21 log₁₀ ao final dos 120 minutos de exposição (p=0,01), conforme representado na Figura 5-a e Tabela 7.

O teste Bonferroni como teste *post hoc* demonstrou que o decaimento da *E. coli* na concentração 5 mg/mL de ECV foi significativamente maior (p=0,03) em relação à de 2 mg/mL ao final dos 120 minutos.

Quanto ao decaimento da *S. enterica* (Figura 5-b e Tabela 8), ao longo dos 120 minutos, frente à concentração de 5 mg/mL de ECV, observou-se uma redução de 1,25 log₁₀, que de acordo com o teste *One-Way* de variância (ANOVA), demonstrou ser diferente (p=0,04) quando comparado com o seu respectivo controle. O tratamento na concentração 2 mg/mL alcançou 0,93 log₁₀ de remoção após 120 minutos de exposição, não apresentando diferença significativa quando confrontado ao seu controle (p≥0,05).

Figura 5: Cinética de remoções médias de *E. coli* e *S. enterica* no experimento com ECV após 120 minutos



Percebe-se pela análise gráfica do decaimento das bactérias testadas que a concentração de 5 mg/mL do extrato de chá verde, de fato se mostrou mais eficaz em seu propósito de inativação. Já na concentração de 2 mg/mL de ECV, as linhas de tendência se aproximaram da orientação do controle sem extratos.

Com base nos resultados obtidos, foi estimado o tempo necessário para redução de 1log₁₀ (T₉₀) das bactérias entéricas *E. coli* e *S. enterica* ao longo do experimento com ECV nas concentrações de 2 e 5 mg/mL. O T₉₀ foi calculado e ajustado por regressão linear, a partir das curvas de inativação das bactérias testadas. O T₉₀, o coeficiente de determinação (r²) e o coeficiente de inativação (-k) estão sumarizados no Quadro 2.

Quadro 2: Resultados de “-k”, “T₉₀” e “r²” das bactérias *E. coli* e *S. entérica* ao longo do experimento com ECV.

		-k	T ₉₀	r ²
<i>E. coli</i>	2 mg/mL	- 0,007,1	2,3h	0,85
	5 mg/mL	- 0,0108	1,5h	0,94
	Controle	- 0,0046	3,6h	0,769
<i>S. enterica</i>	2 mg/mL	0,0054	3,1h	0,52
	5 mg/mL	0,0085	1,9h	0,72
	Controle	- 0,0076	2,2h	0,7782

Os valores de T₉₀ para *E. coli* ao longo do tratamento proposto com ECV nas concentrações de 2 e 5 mg/mL foram respectivamente: 2,3 horas (r² = 0,85) e 1,5 horas (r² = 0,95). O tempo para a redução de 1Log₁₀ (T₉₀) para *S. enterica* foi maior, sendo 3,1 horas (r² = 0,52) no tratamento com 2 mg/mL e com 5 mg/mL de ECV atingiu 1,9 horas (r² = 0,72). Percebe-se, portanto, que a solução de ECV em concentração de 5mg/mL reduziu de forma drástica e rápida a concentração de *E. coli* em relação ao seu respectivo controle, uma vez que na concentração de 5mg/mL foram removidas 90% das bactérias após 1,5 hora. Já para remoção do mesmo percentual de bactérias seriam necessárias 3,6 horas utilizando-se a respectiva solução controle. Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, a EPA (do inglês *Environmental Protection Agency*), um tratamento eficiente deve ser capaz de remover ou inativar 99,99% (4 logs) dos vírus entéricos e 3 logs de bactérias presentes na água de consumo (USEPA, 2011).

Em se tratar da *E. coli*, apenas 6 horas de tratamento seriam necessárias para uma remoção de 4 logs, enquanto o controle exigiria mais que o dobro de tempo: 14,6 horas. Por outro lado, o ECV não demonstrou influência sobre a *S. enterica*. Neste caso, embora o aumento na concentração de ECV de 2 para 5 mg/mL representou uma redução de, respectivamente, 3,1 horas para 1,9 hora necessárias para remoção de 90% de *S. enterica*, seu respectivo grupo controle exigiria apenas 2,2 horas para remoção do mesmo percentual desta bactéria. O achado demonstra, portanto, a ineficiência do ECV na remoção da bactéria *Salmonella*. Vale salientar que dada a carência de ECV para fins de pesquisa científica, com alto nível de pureza, a aquisição do ECV ocorreu via importação como produto comercial (suplemento alimentar), o que pode ter impedido resultados mais expressivos. Neste caso, uma vez que o ECV é composto por *Camellia sinensis*, futuros estudos utilizando-se o extrato desta espécie vegetal podem ser realizados no estabelecimento de avaliações comparativas aos achados deste estudo.

Em um estudo conduzido por Farooqui *et al.* (2015), foi demonstrado que a associação de *Camellia sinensis* e *Juglans regia* promove um efeito sinérgico frente à resistência bacteriana à multidroga. Portanto, futuros estudos necessitam ser conduzidos no intuito de se avaliar se os achados aqui apresentados com a utilização de ECV contendo exclusivamente a planta *Camellia sinensis* seriam mantidos em ocorrência de associação à outras plantas. Baseando-se nos achados de Farooqui *et al.* (2015), se efeitos sinérgicos no contexto do presente estudo permitirem maior capacidade de remoção bacteriana e também corresponderem às exigências das “Diretrizes para qualidade da água potável” estabelecidas pela OMS (1997), estas soluções tornariam-se candidatas para tratamento de águas residuárias.

Portanto, os resultados obtidos no teste para estimar o tempo necessário para redução de 90% (T_{90}) dos patógenos avaliados mostraram-se também mais eficientes nos tratamentos frente a concentração de 5 mg/mL de ECV, corroborando com os resultados obtidos no teste de cinética para avaliar a inativação das bactérias ao longo do tempo. Pode-se prever um tempo menor (1,5 horas; *E. coli* e 1,9 horas; *S. enterica*) para a redução de 1Log₁₀ (Quadro 2).

5.2.3 Concentrações médias de MS2 e Phix-174 por todo o período avaliado com ECV

Nas Tabelas 9 e 10, respectivamente, estão apresentadas as concentrações médias em log₁₀ dos bacteriófagos MS2 e PhiX-174, ao longo do tratamento com o ECV para cada jarro, frente às concentrações de 2 mg/mL (jarros 1 e 2) e 5 mg/mL (jarros 3 e 4).

Tabela 9 – Concentrações médias de MS2 (em log₁₀) para cada jarro com o tratamento proposto com o ECV ao longo do experimento

Tempo (min)	Jarro 1 (2mg/mL)	Jarro 2 (2mg/mL)	Jarro 3 (5mg/mL)	Jarro 4 (5mg/mL)	Jarro 5 (Controle)	Jarro 6 (Controle)
0	6,07	6,07	6,07	6,07	6,07	6,07
15	5,52	6,00	5,90	5,83	5,78	6,01
30	6,12	6,21	6,15	6,23	5,81	5,99
60	5,18	6,18	6,22	6,01	6,76	6,31
120	6,34	5,18	6,14	6,23	6,46	6,30
180	6,25	6,33	5,93	6,01	6,44	6,38

Tabela 10 - Concentrações médias de PhiX-174 (em \log_{10}) para cada jarro com o tratamento proposto com o ECV ao longo do experimento

Tempo (min)	Jarro 1 (2mg/mL)	Jarro 2 (2mg/mL)	Jarro 3 (5mg/mL)	Jarro 4 (5mg/mL)	Jarro 5 (Controle)	Jarro 6 (Controle)
0	6.71	6.71	6.71	6.71	6.71	6.71
15	6.17	5.77	5.98	6.13	6.27	6.59
30	6.07	6.20	6.93	6.28	6.50	6.47
60	6.28	6.40	6.31	6.35	6.76	6.75
120	6.01	6.61	6.53	6.42	5.48	6.95
180	6.68	6.54	6.32	6.29	6.15	6.28

Nas Tabelas 11 e 12 são apresentadas as concentrações médias de MS2 e PhiX-174, a partir das concentrações médias de cada jarro para as duas concentrações empregadas. Os valores das remoções parciais (por tempo de coleta) e remoções finais obtidos mediante a diferença (em \log_{10}) da concentração inicial e final das bactérias entéricas são apresentados.

Tabela 11 - Concentrações médias a partir das duplicas (em \log_{10}) de MS2 no tratamento proposto com o ECV e as remoções em \log_{10} ao final do experimento.

Tempo (min)	2 mg/mL	5 mg/mL	Controle
0	6,07	6,07	6,07
15	5,76	(0,31)	5,89
30	6,16	(-0,40)	5,9
60	5,68	(0,48)	6,07
120	5,76	(-0,08)	6,38
180	6,29	(-0,53)	6,31
Remoção Final	0	0,10	0

Legenda: São apresentados os valores das remoções parciais (entre parênteses: por tempo de coleta) e remoções finais obtidos mediante a diferença (em \log_{10}) da concentração inicial e final de MS2.

Tabela 12 – Concentrações médias a partir das duplicas (em \log_{10}) de PhiX -174 no tratamento proposto com o ECV e as remoções em \log_{10} ao final do experimento.

Tempo (min)	2 mg/mL	5 mg/mL	Controle
0	6,71	6,71	6,71
15	5,97	(0,74)	6,43
30	6,13	(-0,16)	6,48
60	6,34	(-0,21)	6,75
120	6,31	(0,03)	6,21
180	6,61	(-0,30)	6,21
Remoção Final	0,10	0,40	0,49

Legenda: São apresentados os valores das remoções parciais (entre parênteses: por tempo de coleta) e remoções finais obtidos mediante a diferença (em \log_{10}) da concentração inicial e final de PhiX -174.

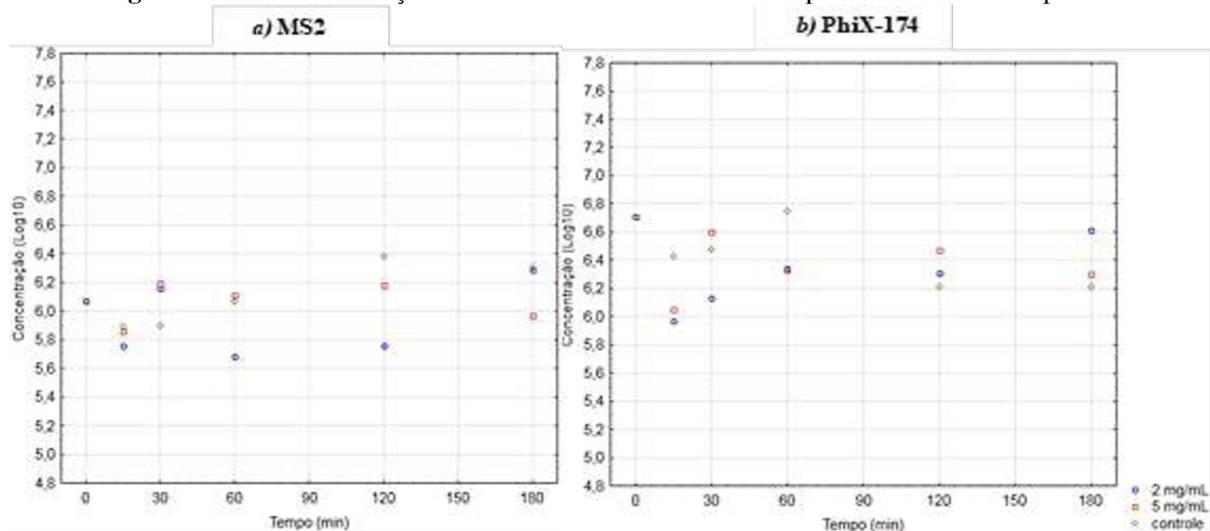
A partir dos resultados de remoção dos bacteriófagos MS2 e PhiX-174, quando

expostos ao tratamento com o extrato natural de chá verde, modelou-se a cinética de inativação desses patógenos entéricos.

5.2.4 Cinética de inativação de MS2 e PhiX-174 com ECV

Os resultados obtidos para os bacteriófagos MS2 e PhiX-174 frente ao ECV nas concentrações testadas de 2 e 5 mg/mL, em pH próximo de 4,0 (Quadro 1 e Figuras 6a-6b), foram aplicados ao teste *One-Way* de variância (ANOVA) e demonstrou semelhança em todos os tratamentos propostos ($p \geq 0,05$). Portanto, os modelos virais testados se comportaram igualmente ao controle, não apresentando tendência de inativação ao longo dos 180 minutos de exposição.

Figura 6: Cinética de remoções médias de MS2 e PhiX-174 no experimento com ECV após 180 minutos.



Em análise das Figuras 6a-6b, é possível notar uma estabilidade na viabilidade dos indicadores virais até o final do tempo de exposição. Dessa forma, percebe-se maior resistência dos bacteriófagos à inativação ao tratamento com o ECV nas duas concentrações testadas (2 e 5 mg/mL).

5.3 DISCUSSÃO DO EXTRATO DE CHÁ VERDE

Em relação à baixa atividade antimicrobiana frente às bactérias testadas na concentração de 2 mg/mL de ECV sendo significativamente menor que o tratamento de 5 mg/L, os resultados vão ao encontro do estudo de Reygaert e Jusufi (2013), que obtiveram uma inativação de 99% das cepas de *E. coli* com menos de 4,0 mg/mL de ECV. Destes, 94% das cepas foram inibidas com menos de 3,5 mg/mL, 76% com menos de 3,0 mg/mL e 40% com menos de 2,5 mg/mL.

Estes resultados indicam que a quantidade de ECV empregada tem relação direta com o aumento da sua capacidade antimicrobiana. Cho *et al.* (2007) relataram que o tempo de contato com matrizes contendo ECV, influencia diretamente a eficiência do tratamento com ECV.

Testes realizados com *E. coli* demonstraram redução significativa em função do tempo em todos os tratamentos avaliados, sendo possível observar que a taxa de inativação de *E. coli* foi proporcional às concentrações de extrato empregadas quando expostas a diferentes tempos de contato. Cho *et al.* (2007) compararam a eficiência na inativação de *E. coli* quando expostas a diferentes concentrações do ECV em função do tempo. Quando expostas por 30 horas ao ECV a 5 mg/mL, foi observada ausência de *E. coli* ao longo do tempo. Para 18 horas de tratamento com o ECV a 10 mg/mL, também foi demonstrada ausência destas bactérias nas amostras avaliadas. Assim, foi constatado um perfil de sobrevivência semelhante das bactérias *E. coli* quando testada nas duas concentrações propostas após exposição em diferentes tempos de contato (Cho *et al.*, 2007).

Araghizadeh, Kohanteb e Fani (2013) constataram que 100% das bactérias *S. mutans* foram sensíveis ao extrato de chá verde nas concentrações 6,25, 12,5, 25,0 e 50,0 mg/mL, *A. actinomycetemcomitans*, *P. Intermediae* e *P. gingivalis* foram sensíveis a 12,5, 25 e 50 mg/mL deste extrato. A concentração inibitória mínima de ECV para *S. mutans* foi de 3,28 mg/mL, para *A. actinomycetemcomitans* foi de 6,25 mg/mL, para ambas *P. gingivalis* e *P. intermedia* foi de 12,5 mg/mL. Araghizadeh *et al.* (2013), em testes realizados utilizando o mesmo tempo de contato, observaram que o ECV não foi capaz de inativar as bactérias avaliadas quando expostas à concentração de 1,56 mg/mL de ECV.

Nesse sentido, estudos demonstraram que a concentração do ECV parece ter forte influência na sobrevivência dos patógenos entéricos, aliado ao tempo de contato com o composto. Assim, sugere-se que as amostras sejam tratadas utilizando concentrações superiores a 5 mg/mL de ECV combinadas com tempos de exposição mais prolongados. Dessa maneira, seriam obtidas novas respostas sobre o aumento da ação biocida do ECV frente aos patógenos entéricos analisados.

Em relação à composição do ECV, Andía Cárdenas, De Vargas e Barrenechea Martel (2000) testaram a atividade antibacteriana dos polifenóis existentes no chá verde frente a cepa de *E. coli* K12. Foi constatado que, embora houvesse uma diminuição decimal das amostras tratadas com epicatequina (EC) e epicatequina-3-galato (ECG), houve redução significativa durante 24 h de exposição. Neste mesmo estudo, após 48 horas de tratamento com EC e ECG, houve recrescimento das comunidades microbianas. Os pesquisadores concluíram que as catequinas EC e ECG, nas concentrações testadas, não foram eficientes no que se referiu à

inativação das bactérias $<1\log$, pois para assegurar que um composto apresenta uma possível ação biocida, o composto deverá promover uma redução $>1\log$. Contudo, quando exposto ao epigallocatequina-3-galato (EGCG) foi observada rápida remoção ($>1\log$) em 48 h de incubação (ANDÍA CÁRDENAS; DE VARGAS; BARRENECHEA MARTEL, 2000).

Vilela (2015) observou que testes com ECV constituídos com mais de 60% de epigallocatequina-3-galato (EGCG) na sua composição, apresentaram sua atividade bactericida aumentada. Também foi observada redução significativa de *S. mutans*, *S. sobrinus* e *L. casei*, *in vitro* e *in vivo* devido aos tratamentos que continham em sua formulação elevadas concentrações de EGCG.

Os resultados obtidos frente à inativação das bactérias entéricas testadas em ambas as concentrações com ECV, podem estar relacionados com o pH ácido encontrado ao longo do experimento. Essa hipótese é reportada em estudos que observaram a redução da capacidade antioxidante de compostos fenólicos em meios ácidos (KUNAMOTO *et al.*, 2001; GLISZCZYŃSKA-SWIGŁO; MUZOLF, 2007; GOSH; CHAKRABORTY, 2015). A razão para a influência do pH ácido na ação antioxidante de compostos naturais pode estar ligada à sua desestabilização de oxidação e alteração estrutural (HUANG *et al.*, 1996; GOSH; CHAKRABORTY, 2015).

Em relação à ausência de remoção significativa observada nos experimentos com ECV dos bacteriófagos, o trabalho de Magri *et al.* (2015) testou a inativação de adenovírus, reovírus e bacteriófagos (MS2, 17X174, 28B) em lodo fecal. Os autores concluíram que, de forma geral, estes bacteriófagos são mais persistentes à inativação baseada em temperatura, mas que a inativação do bacteriófago foi mais rápida em temperaturas mais altas e muito lenta a 10°C. Por sua vez, o decaimento dos vírus entéricos ocorreu mais rapidamente que os bacteriófagos, sugerindo os bacteriófagos, dentre eles o MS2, como microrganismos indicadores substitutos mais persistentes que os vírus entéricos.

Em um estudo que analisou a atividade antiviral do extrato de chá verde, verificou-se que o ECV recém-preparado foi muito eficaz na inativação do norovírus murino (MNV) e hepatite A (HAV) em pH neutro e alcalino, mas foi ineficaz em pH ácido (5,5). Adicionalmente, o armazenamento das soluções durante 24h a várias condições de pH aumentou significativamente a sua atividade antiviral. A hipótese para o maior decaimento viral em função de um tempo de contato prolongado foi ligada à formação de derivados de catequina durante o armazenamento (FALCO *et al.*, 2018). Os resultados podem ter apresentado algumas das possíveis causas para a ineficácia do ECV na desinfecção dos bacteriófagos testados no presente estudo. Primeiramente, os bacteriófagos são microrganismos mais resistentes à

inativação que os próprios vírus entéricos, alguns fatores como temperatura, pH e tempo de contato também devem ser ponderados no processo de inativação. Magri *et al.* (2015) constatou que o aumento de temperatura acelera o processo de desinfecção do MS2. O ECV não foi eficaz contra vírus entéricos em pH ácido e o tempo de contato prolongado aumenta a capacidade antiviral do extrato (FALCO *et al.*, 2018).

Assim, como na atual pesquisa a solução com extratos permaneceu ácida, com temperatura média de 20° C e tempo máximo de 3 horas de exposição com o ECV, futuros trabalhos com maior tempo de contato e maiores concentrações devem ser processados no sentido de alterar a metodologia dos experimentos para avaliar o impacto na inativação viral.

5.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO EXTRATO DE SEMENTE DE UVA

5.4.1 Concentrações médias de *E. coli* e *S. enterica* por todo o período avaliado com ESU

As Tabelas 13 e 14 mostraram estão descritos para *E. coli* e *S. enterica*, respectivamente, os resultados das concentrações médias em \log_{10} de *E. coli* e *S. enterica* para cada jarro ao longo do tratamento com o ESU. Salienta-se que no experimento com o extrato de semente de uva, a menor concentração de extrato utilizada foi de 3 mg/mL.

Tabela 13 - Concentrações médias de *E. coli* (em \log_{10}) para cada jarro com o tratamento proposto com o ESU ao longo do experimento

Tempo (min)	Jarro 1 (3mg/mL)	Jarro 2 (3mg/mL)	Jarro 3 (5mg/mL)	Jarro 4 (5mg/mL)	Jarro 5 (Controle)	Jarro 6 (Controle)
0	6,72	6,72	6,72	6,72	6,72	6,72
10	6,63	6,36	6,77	6,66	6,41	6,16
20	6,81	6,67	6,87	6,58	6,42	6,48
40	6,81	6,82	6,94	6,82	7,04	6,95
60	6,54	6,58	6,48	6,48	6,97	6,94
120	6,58	6,52	6,58	6,41	6,88	6,74

Tabela 14 – Concentrações médias de *S. enterica* (em \log_{10}) para cada jarro com o tratamento proposto com o ESU ao longo do experimento

Tempo (min)	Jarro 1 (3mg/mL)	Jarro 2 (3mg/mL)	Jarro 3 (5mg/mL)	Jarro 4 (5mg/mL)	Jarro 5 (Controle)	Jarro 6 (Controle)
0	6,28	6,28	6,28	6,28	6,28	6,28
10	5,70	5,60	5,59	5,50	NA	5,11
20	6,19	6,12	6,33	6,62	6,36	6,47
40	6,57	6,67	6,72	6,65	6,55	6,56
60	6,37	6,57	6,22	6,39	6,51	6,50
120	6,11	6,17	6,17	6,21	6,43	6,44

As Tabelas 15 e 16 apresentam as concentrações médias das bactérias *E. coli* e *S. enterica*, nessa ordem, a partir das duas concentrações testadas do ESU (3 e 5 mg/mL) e as remoções por tempos de coleta, bem como a remoção final do experimento.

Os valores médios das remoções por tempos de coleta, representadas entre parênteses, foram obtidos por meio da diferença (em \log_{10}) ao longo do experimento em cada tempo de contato avaliado. Para a obtenção da remoção final foi realizada a diferença da concentração média inicial (T0) e final (T120) das bactérias entéricas.

Tabela 15 - Concentrações médias a partir das duplicas (em \log_{10}) de *E. coli* no tratamento proposto com o ESU e as remoções em \log_{10} ao final do experimento

Tempo (min)	3mg/mL		5mg/mL		Controle	
0	6,72		6,72		6,72	
10	6,49	(0,23)	6,75	(-0,03)	6,28	(0,44)
20	6,74	(-0,25)	6,72	(0,03)	6,45	(-0,17)
40	6,81	(-0,07)	6,88	(-0,16)	6,99	(-0,54)
60	6,56	(0,25)	6,48	(0,40)	6,95	(0,04)
120	6,55	(0,01)	6,51	(-0,03)	6,82	(0,13)
Remoção Final	0,17		0,21		0	

Legenda: São apresentados os valores das remoções parciais (entre parênteses: por tempo de coleta) e remoções finais obtidos mediante a diferença (em \log_{10}) da concentração inicial e final de *E. coli*.

Tabela 16 - Concentrações médias a partir das duplicas (em \log_{10}) de *S. enterica* no tratamento proposto com o ESU e as remoções \log_{10} ao final do experimento.

Tempo (min)	3mg/mL		5mg/mL		Controle	
0	6,28		6,28		6,28	
10	5,65	(0,63)	5,54	(0,74)	5,11	(1,17)
20	6,15	(-0,50)	6,47	(-0,93)	6,45	(-1,34)
40	6,62	(-0,47)	6,68	(-0,21)	6,55	(-0,10)
60	6,47	(0,15)	6,30	(0,38)	6,50	(0,05)
120	6,14	(0,33)	6,19	(0,11)	6,44	(0,06)
Remoção Final	0,14		0,09		0	

Legenda: São apresentados os valores das remoções parciais (entre parênteses: por tempo de coleta) e remoções finais obtidos mediante a diferença (em \log_{10}) da concentração inicial e final de *S. enterica*.

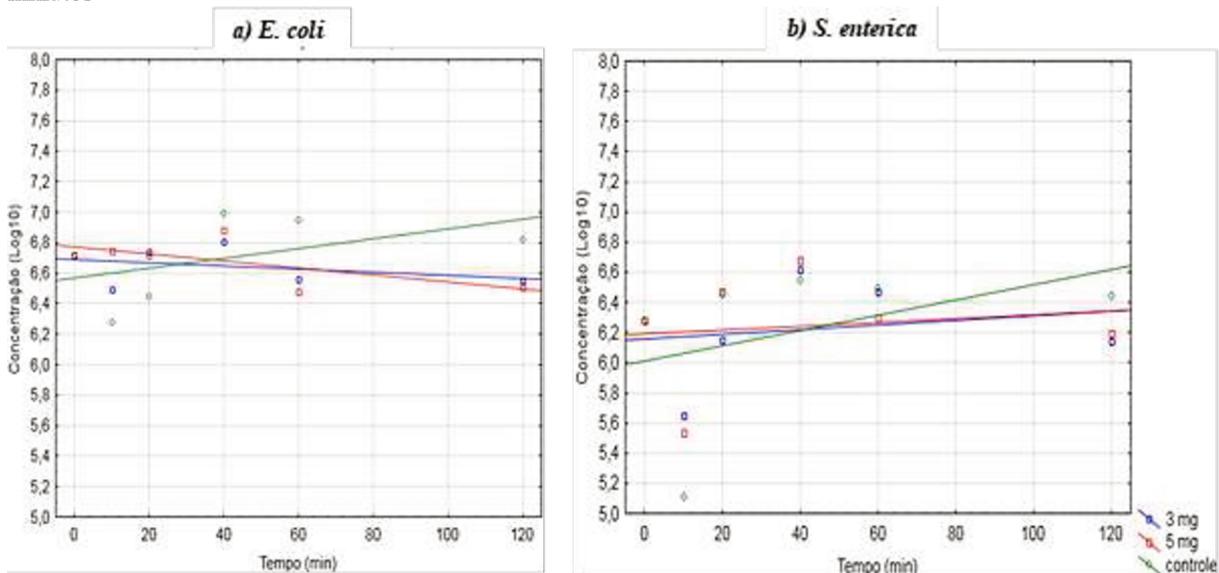
A partir dos resultados de remoção das bactérias *E. coli* e *S. enterica*, quando expostas ao tratamento com o extrato natural de semente de uva, modelou-se a cinética de inativação desses patógenos entéricos.

5.4.2 Cinética de inativação de *E. coli* e *S. enterica* com ESU

O teste One-Way de variância (ANOVA) constatou que as concentrações médias das bactérias *E. coli*, em água destilada por até 120 minutos de tratamento com ESU, nas

concentrações de 3 e 5 mg/mL, não apresentou alteração ($p \geq 0,05$) ao longo do experimento (Tabela 15; Figura 7-a). O comportamento das bactérias *S. enterica* foi semelhante ao das bactérias *E. coli* ($p \geq 0,05$) quando submetidas às mesmas concentrações e tempos de exposição, como representado na Tabela 15 e ilustrado na Figura 7-b.

Figura 7: Cinética de remoções médias de *E. coli* e *S. enterica* no experimento com ESU após 120 minutos



Sugere-se que os resultados aqui demonstrados com o ESU foram ineficientes na inativação dos patógenos avaliados quando submetidos aos tratamentos propostos no presente trabalho. Porém, observou-se nos controles amostrais, um possível recrescimento das bactérias *E. coli* e *S. enterica* ao longo do experimento, conforme ilustrado nas Figuras 7-a e 7-b. Esse novo crescimento microbiano não foi observado nas amostras com a presença do ESU. Indicando que provavelmente o ESU propiciou um efeito bacteriostático contra os patógenos bacterianos avaliados.

5.4.3 Concentrações médias de MS2 e PhiX-174 por todo o período avaliado com ESU

Nas Tabelas 17 e 18 estão descritos os resultados das concentrações médias, em \log_{10} , dos bacteriófagos MS2 e PhiX-174, ao longo do tratamento com o ESU para cada jarro, frente às concentrações de 3 mg/mL (jarros 1 e 2) e 5 mg/mL (jarros 4 e 5), respectivamente.

Tabela 17 – Concentrações médias de MS2 (em \log_{10}) para cada jarro com o tratamento proposto com o ESU ao longo do experimento

Tempo (min)	Jarro 1 (3mg/mL)	Jarro 2 (3mg/mL)	Jarro 3 (5mg/mL)	Jarro 4 (5mg/mL)	Jarro 5 (Controle)	Jarro 6 (Controle)
0	8,30	8,30	8,30	8,30	8,30	8,30
15	8,25	8,33	NA	NA	8,30	8,40
30	8,52	8,10	8,38	8,25	8,45	8,15
60	8,35	8,20	8,18	NA	8,18	8,22
120	8,17	8,11	8,28	8,28	NA	NA
180	8,47	8,30	7,93	NA	NA	NA

Legenda: NA (Não Avaliado)

Tabela 18 – Concentrações médias de PhiX-174 (em \log_{10}) para cada jarro com o tratamento proposto com o ESU ao longo do experimento

Tempo (min)	Jarro 1 (3mg/mL)	Jarro2 (3mg/mL)	Jarro 3 (5mg/mL)	Jarro 4 (5mg/mL)	Jarro 5 (Controle)	Jarro 6 (Controle)
0	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00
15	6,41	6,48	6,88	6,06	6,80	6,48
30	5,60	5,70	6,19	5,80	6,30	7,46
60	5,18	5,27	6,88	6,39	7,01	7,07
120	6,73	6,66	6,71	6,83	7,41	7,48
180	6,76	6,30	6,55	6,15	6,41	NA

Legenda: NA (Não Avaliado)

Tabelas 19 e 20 apresentam as concentrações médias dos bacteriófagos MS2 e PhiX-174, a partir das concentrações médias de cada jarro para as duas concentrações empregadas. Além disso, são demonstrados os valores das remoções parciais (por tempo de coleta) e remoções finais obtidos mediante a diferença (em \log_{10}) da concentração inicial e final dos bacteriófagos.

Tabela 19 - Concentrações médias a partir das duplicas (em \log_{10}) de MS2 no tratamento proposto com o ESU e as remoções ao final do experimento.

Tempo (min)	3mg/mL	5mg/mL	Controle
0	8,30	8,30	8,30
15	8,29	(0,01)	8,35 (-0,05)
30	8,31	(-0,02)	8,30 (-0,05)
60	8,27	(0,03)	8,20 (0,10)
120	8,14	(0,13)	-
180	8,39	(-0,24)	-
Remoção Final	0	0,37	0

Legenda: São apresentados os valores das remoções parciais (entre parênteses: por tempo de coleta) e remoções finais obtidos mediante a diferença (em \log_{10}) da concentração inicial e final de MS2

Tabela 20 - Concentrações médias a partir das duplicas (em log₁₀) de PhiX-174 no tratamento proposto com o ESU e as remoções ao final do experimento.

Tempo (min)	3mg/mL		5mg/mL		Controle	
0	7,00		7,00		7,00	
15	6,45	(0,56)	6,47	(0,53)	6,64	(0,36)
30	5,85	(0,60)	6,00	(0,48)	6,88	(-0,24)
60	5,93	(-0,08)	6,64	(-0,64)	7,01	(-0,13)
120	6,70	(-0,77)	6,77	(-0,14)	7,25	(-0,24)
180	6,53	(0,17)	6,35	(0,42)	6,41	(1,04)
Remoção Final	0,47		0,65		0,59	

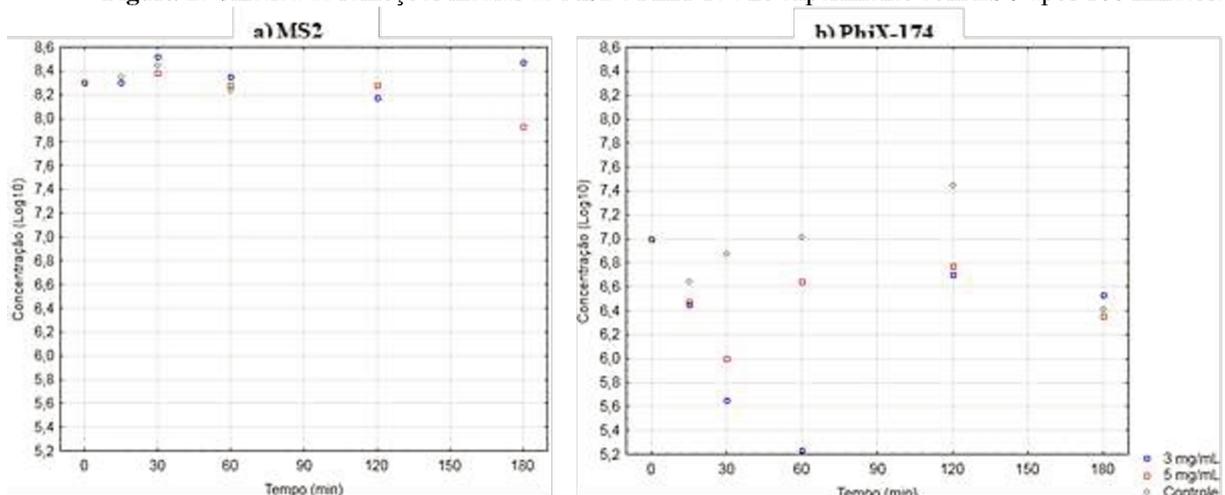
Legenda: São apresentados os valores das remoções parciais (entre parênteses: por tempo de coleta) e remoções finais obtidos mediante a diferença (em log₁₀) da concentração inicial e final de MS2

A partir dos resultados de remoção dos bacteriófagos MS2 e PhiX-174, quando submetidos com o extrato natural de semente de uva, modelou-se a cinética de inativação desses patógenos entéricos.

5.4.4 Cinética de inativação de MS2 e PhiX-174 com ESU

A inativação de MS2 e PhiX-174 no experimento com ESU em água destilada ao longo dos 180 minutos de tratamento, foi analisada por meio do teste de variância *One-Way* (ANOVA), onde não demonstrou alteração ($p \geq 0,05$) nos parâmetros analisados, em ambas as concentrações testadas de 3 e 5 mg/mL.

Figura 2: Cinética de remoções médias de MS2 e PhiX-174 no experimento com ESU após 180 minutos.



Conclui-se que o tratamento proposto com extrato de semente de uva foi igualmente ineficaz no que tange à inativação dos indicadores virais avaliados (MS2 e PhiX-174), assim como já havia sido constatado no ensaio com as bactérias entéricas. Portanto, não houve tendência de inativação ao longo do tempo de exposição ao ESU nas concentrações empregadas de (3 e 5

mg/mL).

5.5 DISCUSSÃO DO EXTRATO DE SEMENTE DE UVA

Na pesquisa de Zhu *et al.* (2015), os dados indicaram que o efeito inibitório do ESU sobre o crescimento de *E. coli* O157:H7 foi dependente da concentração utilizada de extrato, bem como da concentração inicial dos patógenos entéricos inoculados no tratamento. Em relação a inóculos em concentrações elevadas de *E. coli* O157:H7 (1×10^7 UFC/mL) não foi observado efeito bactericida contra *E. coli* O157:H7. No entanto, na concentração média inicial de 5×10^5 UFC/mL de *E. coli* O157:H7 em matrizes contendo ESU a 4 mg/mL, por até 1 hora de tratamento, foi observado um decaimento mais rápido e significativo. Os autores sugeriram que a resistência à inativação das bactérias em concentrações elevadas pode ser proveniente do mecanismo de *quorum sensing*, que estão envolvidos na comunicação entre as bactérias e que essa interação depende da densidade populacional das bactérias (ZHU *et al.*, 2015). Essa capacidade de comunicação apresenta grande importância na sobrevivência das bactérias e na ecologia microbiana (SOLA *et al.*, 2012).

Estudos de Zhu *et al.* (2015) observaram que inoculando menor concentração de microrganismos bacterianos em matrizes contendo concentrações menores de ESU (0,125 a 1,0 mg/mL) houve favorecimento do crescimento das bactérias. Isto possivelmente ocorreu em razão dos nutrientes adicionais e/ou das fontes de carbono por estímulo do ESU em baixas concentrações. Porém, com o aumento das concentrações de ESU, este efeito estimulatório pode ser superado pela atividade antimicrobiana causando inibição do crescimento (ZHU *et al.* 2015).

O trabalho de Garcia (2018) observou uma inativação de 2,5 logs de adenovírus em meio aquoso após 2 horas de tratamento com ESU (em concentração de 0,01%). O resultado superior ao obtido na presente pesquisa pode ter ocorrido, dentre outros fatores, pelo método empregado na diluição do extrato de semente de uva. Garcia (2018) adotou como solvente o DMSO (Dimetilsulfóxido) em razão da sua alta eficiência em solubilizar o ESU sem formação de precipitado ao longo do tratamento. No presente estudo o ESU foi dissolvido em água destilada, sendo observada a formação de precipitado do ESU ao longo do experimento. A diferença na escolha do solvente para solubilização dos extratos pode ter influenciado na inativação viral e bacteriana.

Su e D'Souza (2011) constataram que a redução do título depende do tipo de vírus, da concentração dos microrganismos, concentração do ESU e da temperatura. A incubação de altos títulos virais (~ 7 logs UFP/mL), a 37°C, com 0,25, 0,5 e 1,0 mg/mL de ESU, durante 120

minutos, reduziu títulos de MS2 em 1,13, 1,43 e 1,60 logs UFP/mL. Com baixos títulos (~ 5 logs UFP/mL), o decaimento de MS2, nas mesmas condições, foi de 1,35, 1,52 e 1,85 logs UFP/mL. Ou seja, em concentração inicial de MS2 menor, os índices de inativação foram superiores em todas as concentrações de extrato. Esses resultados são convergentes ao da presente pesquisa, ao passo que os títulos iniciais superiores a 8 logs para MS2 podem ter correlação com o baixo potencial de inativação identificado. Nota-se que, no caso do ensaio com PhiX-174 com títulos iniciais de 7 logs, o decaimento foi maior em todas as concentrações de extrato. A utilização de vírus mais resistente (bacteriófagos MS2 e PhiX-174) pode ter relação com a menor taxa de inativação detectada, visto que, em geral, são microrganismos indicadores mais persistentes que os vírus entéricos (MAGRI *et al.*, 2015).

Segundo de Su e D'Souza (2011), a redução da temperatura ao padrão ambiente também refletiu no menor decaimento do MS2 quando exposto ao ESU, pois em alta concentração inicial dos bacteriófagos, o decaimento foi reduzido para 1,03, 1,09 e 1,66 logs UFP/mL e com baixo título inicial de MS2 houve inativação de 1,03, 1,16 e 1,16 logs UFP/mL. É possível inferir também que à temperatura ambiente, o fator “concentração inicial do bacteriófago” não foi tão significativo a ponto de os logs de redução se encontrarem próximos em ambas as análises e em alto título, com 1,0 mg/mL de ESU apresentar melhor redução.

Os trabalhos de Li *et al.* (2012) e Su e D'Souza (2011) evidenciaram um indicativo que altas cargas orgânicas podem interferir no tratamento microbicida com o ESU. No primeiro estudo, o ESU na presença de albumina de soro bovino (0,3 g/L) teve ação antiviral reduzida contra o MNV-1; no segundo, o ESU, quando preparado em 2% de leite, teve sua eficácia significativamente diminuída.

O trabalho de Garcia (2018) observou que a matéria orgânica não causou efeitos sobre a atividade do ESU por um período de até 120 min. Verificou-se que frente à peptona a 0,02%, o ESU não apresentou atividade oxidativa, o que não resultou em perda do teor de fenólicos totais (TFT) por todo o período avaliado. Mensurou-se também a capacidade antioxidante do extrato quando utilizada a peptona em pH 6,8 e 2,5. O resultado apontou que não houve decaimento significativo da capacidade antioxidante, mas apresentou diminuição da atividade em pH ácido. A perda de atividade do ESU em pH ácido corrobora com os resultados da presente pesquisa à medida que não se obteve decaimento significativo em nenhum dos patógenos testados com ESU, uma vez que as soluções com o extrato resultaram em pH ácido (~4,5).

Isto nos leva a pensar o pH como ponto de análise para futuras investigações no que tange à utilização do ESU como agente biocida contra vírus entéricos, testando o ESU em diferentes

variações de pH, especificamente em águas sujas uma vez que foi demonstrado por Morrow *et al.* (2005) a ocorrência de patologias renais caninas associadas com a ingestão de uvas ou passas. Resultados obtidos no trabalho de Garcia (2018), acerca da estabilidade do ESU na presença de matéria orgânica (baixa e alta cargas) e sua baixa toxicidade, permitem recomendá-lo para o tratamento de diferentes águas naturais.

6 SUMÁRIO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

- ❖ Houve alterações nos parâmetros físico-químicos avaliados para ambos os compostos (ECV e ESU), tais como os valores elevados de turbidez, cores aparente e verdadeira, além de pH ácido frente às diferentes concentrações testadas;
- ❖ O ECV foi mais eficiente que o ESU na inativação das bactérias *E. coli* e *S. enterica*, na concentração de 5mg/mL;
- ❖ O ECV apresentou redução significativa de 1,21 log₁₀ da bactéria *E. coli* (p=0,01) e de 1,25 log₁₀ da *S. enterica* (p=0,04), ao final dos 120 minutos de exposição ao ECV na concentração de 5 mg/mL;
- ❖ O ESU demonstrou ser menos solúvel em água destilada, diferentemente do ECV;
- ❖ Não houve redução significativa em nenhum dos tratamentos propostos com o ESU, nas concentrações de 3 mg/mL e 5 mg/mL ao longo do experimento;
- ❖ O ESU nas concentrações empregadas demonstrou ao longo do experimento, um possível efeito bacteriostático, uma vez que o tratamento controle exibiu um aumento nas concentrações das bactérias *E. coli* e *S. enterica* ao final do ensaio, o que não foi observado nos tratamentos com a presença do extrato;
- ❖ Os bacteriófagos MS2 e PhiX-174 se mostraram mais resistentes à inativação quando expostos ao tratamento com ESU e ECV, não apresentando redução significativa em nenhum dos tratamentos propostos (p≥0,05).

7 CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo permitiu concluir que:

- Dada a baixa remoção dos patógenos entéricos, a melhor aplicação do ECV e do ESU seria em águas residuárias e destinação ao solo como, por exemplo, na agricultura, na irrigação e no cultivo de vegetais, como estratégia alternativa ao cloro, evitando a formação de trihalometanos;
- Embora os extratos não obtiveram os resultados esperados, os achados aqui demonstrados permitiram um levantamento dos seus efeitos isoladamente, permitindo melhor embasamento para estudos que visem a busca por efeitos sinérgicos, melhorando os índices de desinfecção.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES

Durante este trabalho, apenas foi possível testar em escala laboratorial a remoção das bactérias entéricas *E. coli* ATCC13706, *S. enterica - Typhimurium* WG49 NCTC12484 e os bacteriófago PhiX-174 e MS2 em água destilada com ECV e ESU para demonstrar o potencial biocida desses compostos, assim como, as alterações físico-químicas das amostras após adição dos extratos.

Diante do potencial de inativação significativa das bactérias entéricas testadas na concentração de 5 mg/mL de ECV e um possível efeito bacteriostático no tratamento com ESU, acredita-se que existem indícios necessários para a continuidade da proposta do presente estudo. Ou seja, a condução de novos ensaios de inativação com ECV e ESU frente a outros patógenos entéricos ou ainda com os mesmos bioindicadores utilizados nessa pesquisa, mas com variadas concentrações de extratos em outros meios como o álcool e microrganismos, testando em diferentes fontes de água como, por exemplo, águas residuárias domésticas para aplicação na irrigação ou reuso.

Uma alternativa que poderá contribuir para aumentar a eficiência da sanitização desses compostos na água é a associação deles (ECV e ESU) ou com outros compostos com potencial de desinfecção. Combinados esses esforços, algumas possíveis vantagens dessa prática será a diminuição na demanda por água potável, amenizando as complicações para o ambiente, saúde animal e humano em decorrência da escassez de água.

Nesse contexto, estudos de associação de ESU com ECV necessitam ser realizados no intuito de se compreender se um apresenta sobre o outro efeito antagônico ou sinérgico. Além

disso, em virtude da necessidade de utilização do cloro para eliminação de bactérias resistentes ao ESU ou ao ECV, é necessário que também seja avaliada a interação destes com o cloro.

REFERÊNCIAS

ABQ - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE QUÍMICA. **A crise hídrica e a disponibilidade de água para as necessidades humanas**. 4p. Rio de Janeiro. 2015.

ADAMS, M.H. **Bacteriophages**. New York: Interscience Publishers Inc. 1959.

AKSU, Zümriye. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 997-1026, 2005

AL-HABIB, A; AL-SALEH, E.; SAFER, A. M.; AFZAL, M Bactericidal effect of grape seed extract on methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). **The Journal of toxicological sciences**, v. 35, n. 3, p. 357-364, 2010.

AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B.; BAUTISTA, D. A. Antibacterial activity of green tea polyphenols against *E. coli* K 12. **Food/Nahrung**, v. 44, n. 1, p. 60-62, 2000.

ANDÍA CÁRDENAS, Yolanda; DE VARGAS, Lidia; BARRENECHEA MARTEL, Ada. Tratamiento de Agua-Coagulación y Floculación. **Evaluación de Plantas y Desarrollo Tecnológico**. SEDAPAL, v. 6, Lima, 2000.

ARAGHIZADEH, Abdolmehdi; KOHANTEB, Jamshid; FANI, Mohammad Mehdi. Inhibitory activity of green tea (*Camellia sinensis*) extract on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. **Medical Principles and Practice**, v. 22, n. 4, p. 368-372, 2013.

ARJONA-RODRÍGUEZ, S.; TORRES-LOZADA, P.; CRUZ-VÉLEZ, C.; LOAIZA-CADAVID, D.; ESCOBAR-RIVERA, J. Efecto del punto de precloración sobre la formación de trihalometanos en procesos convencionales de potabilización de agua. **Revista Ingenierías Universidad de Medellín**, v. 11, n. 20, p. 57-65, 2012

ASHBOLT, Nicholas John. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. **Toxicology**, v. 198, n. 1-3, p. 229-238, 2004.

AWWA - AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION. **Standards Methods for Water Analysis**. 21th edition, APHA, 2005

AW, T. G.; ROSE, J.B. Detection of pathogens in water: from phylochips to qPCR to pyrosequencing. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 422-430, 2012.

AWWA - AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION. **Standards Methods for Water Analysis**. 21th edition, APHA, 2005

BEACH, B. et al. Typhoid fever, water quality, and human capital formation. **The Journal of Economic History**, v. 76, n. 1, p. 41-75, 2016.

BETTEGA, J. M. P. R.; MACHADO, M. R.; PRESIBELLA, M.; BANISKI, G.; BARBOSA, C. D. A Métodos analíticos no controle microbiológico da água para consumo humano. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 5, p. 950-954, 2006.

- BHUTTA, Zulfiqar A. Current concepts in the diagnosis and treatment of typhoid fever. **Bmj**, v. 333, n. 7558, p. 78-82, 2006.
- BISHA. B. N. Weinsetel, B.F. Brehm-Stecher, A. Mendonca Antilisterial effects of gravinol-s grape seed extract at low levels in aqueous media and its potential application as a produce wash. **J. Food Prot.**, 73 (2010), pp. 266-273
- BORDALO, C. A. L. A “crise” mundial da água vista numa perspectiva da geografia política. **GEOUSP: Espaço e Tempo (Online)**. n. 31, p. 66-78, 2012.
- BARDE, Julia Alexa. What determines access to piped water in rural areas? Evidence from small-scale supply systems in rural Brazil. **World Development**. v. 95, p. 88-110, 2017.
- BOSCH, A. et al. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 295-301, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de procedimentos de vigilância em saúde ambiental relacionada à qualidade da água para consumo humano**. Brasília, DF, 2006.
- BRICK, T.; PRIMROSE, B.; CHANDRASEKHAR, R.; ROY, S.; MULIYIL, J.; KANG, G. Water contamination in urban south India: household storage practices and their implications for water safety and enteric infections. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 207, n. 5, p. 473-480, 2004.
- BULK SUPPLEMENTS. **About us**. Disponível em: <<https://www.bulksupplements.com/about-us>>. Acesso em: 27 dez. 2018.
- CARVALHO, T. **Transferência de Tecnologias de Tratamento de Água em Comunidades Brasileiras de Pequeno Porte**. (Tese de Doutorado) Universidade de São Paulo. 2012.
- CABRAL, J. P. S. Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v. 7, n. 10, p. 3657-3703, 2010.
- CARLANDER, David et al. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. **Immunologic research**, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2000.
- CARVALHO, T. **Transferência de Tecnologias de Tratamento de Água em Comunidades Brasileiras de Pequeno Porte**. (Tese de Doutorado) Universidade de São Paulo. 2012.
- CERQUEIRA, M. M. O. P. et al. Qualidade da água e seu impacto na qualidade microbiológica do leite. MESQUITA, AJ; COELHO, KO. **Perspectivas e avanços na qualidade do leite no Brasil**. Goiânia: Talento, p. 273-290, 2006
- CHO, Y. S. et al. Cellular responses and proteomic analysis of *E. coli* exposed to green tea polyphenols. **Current Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 501-506, 2007.
- COPPO, Erika; MARCHESE, Anna. Antibacterial activity of polyphenols. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 380-390, 2014.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CUSHNIE, T. P T.; LAMB, J. A. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.

D'SOUZA, H. D. Phytochemicals for the control of human enteric viruses. **Current Opinion in Virology**, v. 4, p. 44 – 49, 2014.

DAS, K; TIWARI, R. K. S.; SHRIVASTAVA, D. K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 2, p. 104-111, 2010.

DI BERNADO, L; DI BERNARDO, A; CENTURIONE-FILHO, P. L. Ensaios de tratabilidade de água e dos resíduos gerados em estações de tratamento de água. RIMA Editora, São Carlos. São Paulo. p. 237. 2002.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

FALCO, Irene et al. Fostering the antiviral activity of green tea extract for sanitizing purposes through controlled storage conditions. **Food Control**, v. 84, p. 485-492, 2018.

FAROOQUI, A.; KHAN, A.; KAZMI, S. U. Investigation of a community outbreak of typhoid fever associated with drinking water. **BMC Public Health**, v. 9, n. 1, p. 476, 2009.

FENG, Y. Y. et al. Effects of pH and temperature on the survival of coliphages MS2 and Q β . **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 9, p. 549-552, 2003.

FLORENÇANO, J. C. S.; DE ASSIS, F. C. O abastecimento de água e seus reflexos na saúde da população. **CONSTRUINDO**, v. 6, n. 01, 2014.

FONG, T.-T.; LIPP, E. K. *Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: Health risks, detection, and potential water quality assessment tools.* **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 2, p. 357–371, 2005.

FONGARO, G. **Estudo da incidência de vírus humanos de veiculação hídrica em águas de mananciais.** (Dissertação de mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2012.

FONGARO, G. **Higienização de dejetos suínos visando reciclo agrícola sanitariamente seguro.** (Tese de doutorado) Programa de Biotecnologia e Biociências - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2016.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos.** Artmed Editora, 2013.

FUNASA –FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Panorama do Saneamento Rural no Brasil.** Disponível em: Acesso em: <<http://www.funasa.gov.br/panorama-do-saneamento-rural-no-brasil>> 15 de Janeiro de 2018.

GARCIA, L. A.T. **Percepção pública e qualidade da água distribuída em florianópolis, sc: avaliação e proposição de alternativas de tratamento.** (Tese de Doutorado) Programa de Biotecnologia e Biociências - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2018.

GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, Anna; MUZOLF, Małgorzata. pH-Dependent radical scavenging activity of folates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 20, p. 8237-8242, 2007.

GRADIŠAR, H. et al. As catequinas do chá verde inibem a DNA girase bacteriana por interação com o sítio de ligação do ATP. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 50, n. 2, p. 264-271, 2007.

GRAHAM, H. N. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. **Preventive Medicine**, v. 21, n. 3, p. 334-350, 1992.

GUPTA, Vinod Kumar *et al.* Chemical treatment technologies for waste-water recycling—an overview. **Research Advances**, v. 2, n. 16, p. 6380-6388, 2012.

GUPTA, V. K.; ALI, I.; SALEH, T. A.; NAYAK, A.; AGARWAL, S. Chemical treatment technologies for waste-water recycling—an overview. **Rsc Advances**, v. 2, n. 16, p. 6380-6388, 2012.

GYAWALI, Rabin; IBRAHIM, Salam A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412-429, 2014.

GUTIERREZ, Jorge; BARRY-RYAN, Catherine; BOURKE, Paula. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 1, p. 91-97, 2008.

HAMMER, Katherine A.; CARSON, Christine F.; RILEY, Thomas V. *Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985-990, 1999.

HANJRA, Munir A.; QURESHI, M. Ejaz. Global water crisis and future food security in an era of climate change. **Food Policy**, v. 35, n. 5, p. 365-377, 2010.

HENNING, Susanne M. et al. Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement. **The American journal of clinical nutrition**, v. 80, n. 6, p. 1558-1564, 2004.

HOPPEN, Cinthya et al. Uso de lodo de estação de tratamento de água centrifugado em matriz de concreto de cimento Portland para reduzir o impacto ambiental. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 79, 2006.

HUANG, Shu-Wen et al. Effect of pH on antioxidant activity of α -tocopherol and trolox in oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 2496-2502, 1996.

HUERTAS, A. et al. Evaluation of *Bacillus subtilis* and coliphage MS2 as indicators of advanced water treatment efficiency. **Water Science and Technology**, v. 47, n. 3, p. 255-259, 2003.

HUNTER, Paul Raymond; WAITE, Michael; RONCHI, Elettra. **Drinking water and infectious disease: establishing the links**. CRC Press, 2002.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo demográfico 1991. Rio de Janeiro: IBGE, 1992. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/população/censo1991>>. Acesso em: 10 dez.2018.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo demográfico 2000. Rio de Janeiro: IBGE, 2001. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/população/censo2000>> Acesso em: 10 dez.2018.

IKIGAI, Hajime et al. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1147, n. 1, p. 132-136, 1993.

INSTITUTO TRATA BRASIL. **Situação Saneamento no Brasil**. 2015. Disponível em: <<http://www.tratabrasil.org.br/saneamento-no-brasil> > Acesso em: 01 dez. 2017.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, ISO 6579:2002. **Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Salmonella spp.**, 2002. **J. Sci. Food Agric.**, 89 (2009), pp. 1879-1885

JANSSEN, A. M.; SCHEFFER, J. J. C.; SVENDSEN, A. Baerheim. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. **Planta Medica**, v. 53, n. 05, p. 395-398, 1987.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SELVI, Tamil; SAKARIAH, K. K. *Antibacterial and antioxidant activities of grape (Vitis vinifera) seed extracts*. **Food Research International**, v. 36, n. 2, p. 117-122, 2003.

JOFRE, Juan et al. Coliphages as model organisms in the characterization and management of water resources. **Water**, v. 8, n. 5, p. 199, 2016.

JOSHI, Snehal S.; SU, Xiaowei; D'SOUZA, Doris H. Antiviral effects of grape seed extract against feline calicivirus, murine norovirus, and hepatitis A virus in model food systems and under gastric conditions. **Food Microbiology**, v. 52, p. 1-10, 2015.

KAO, TT.; TU, H. C.; CHANG, W. N.; CHEN, B. H.; SHI, Y. Y.; CHANG, T. C.; FU, T. F. Grape seed extract inhibits the growth and pathogenicity of *Staphylococcus aureus* by interfering with dihydrofolate reductase activity and folate-mediated one-carbon metabolism. **International journal of food microbiology**, v. 141, n. 1-2, p. 17-27, 2010.

KATAYAMA, V. T.; MONTES, C. P.; FERRAZ, T. H.; MORITA, D. M. Quantificação da produção de lodo de estações de tratamento de água de ciclo completo: uma análise crítica. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 20, n. 4, p. 559-569, 2015.

KRONEMBERGER, D. M. P.; PEREIRA, R. S.; ELPIDIO, A. V. F.; SCARCELLO, J.A. JUNIOR, J. C. 2011. **Saneamento e meio ambiente: in Atlas de saneamento**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. 2011.

KUMAMOTO, Midori et al. Effects of pH and metal ions on antioxidative activities of catechins. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 65, n. 1, p. 126-132, 2001.

LEE, S. C; GUO, H.; LAM, S. M. J.; LAU, S. L. A. Multipathway risk assessment on

disinfection by-products of drinking water in Hong Kong. **Environmental Research**, v. 94, n. 1, p. 47-56, 2004.

LI, D. et al. Effect of grape seed extract on human norovirus GII.4 and murine norovirus 1 in viral suspensions, on stainless steel discs, and in lettuce wash water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 21, 2012.

LONGO, Dan L.; FAUCI, Anthony S. **Gastrenterologia e Hepatologia de Harrison-2**. AMGH Editora, 2014.

LUCIDO, Gil Leonardo Aliprandi. **Avaliação de Metodologia para Controle e Medição de Cor em Efluentes Têxteis**.(Dissertação de Mestrado) - Mestrado Profissional em Engenharia Ambiental, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2010.

MAGRI, M. E. et al. Inactivation of adenovirus, reovirus and bacteriophages in fecal sludge by pH and ammonia. **Science of the Total Environment**, v. 520, p. 213-221, 2015.

MATTLE, M. J.; VIONE, M. D.; KOHN, T. Conceptual model and experimental framework to determine the contributions of direct and indirect photoreactions to the solar disinfection of MS2, PhiX174, and Adenovirus. **Environ Science & Technology**, v. 49, n. 1, p. 334-342, 2015.

MEYER, Sheila T. O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. **Caderno Saúde Pública**, v. 10, n. 1, p. 99-110, 1994.

MICHEL, Alix et al. Bacteriophage PhiX174's ecological niche and the flexibility of its *E. coli* lipopolysaccharide receptor. **Applied Environ. Microbiol.**, v. 76, n. 21, p. 7310-7313, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **SAÚDE BRASIL 2017**: Uma análise da situação de saúde e os desafios para o alcance dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_brasil_2017_analise_situacao_saude_desafios_objetivos_desenvolvimento_sustentavel.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2018.

MOLVA, Celenk; BAYSAL, Ayse Handan. Antimicrobial activity of grape seed extract on *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922 vegetative cells and spores in apple juice. **LWT-Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 238-245, 2015.

NAKAYAMA, Motokazu et al. Mechanism of the combined anti-bacterial effect of green tea extract and NaCl against *Staphylococcus aureus* and *E. coli* O157: H7. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 225-232, 2012.

OSWALD, William E. *et al.* Fecal contamination of drinking water within peri-urban households, Lima, Peru. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 4, p. 699-704, 2007.

OTTERPOHL, R. Black, brown, yellow, grey – the new colors of sanitation. **Water**.21. p. 31-41.2001.

PALAMARA, Anna T. et al. Inhibition of influenza A virus replication by resveratrol.

Journal of Infectious Diseases, v. 191, n. 10, p. 1719-1729, 2005.

PASIN, D. B. **Avaliação quantitativa de riscos microbiológicos (AQRM) associados à E. Coli em águas cinza**. Dissertação (Mestrado). Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo. 68p. 2013

PEREIRA, Sabrina Livia de Medeiros. **Características físicas, químicas e microbiológicas do lodo das lagoas da ETA Gramame**. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2011.

PERUMALLA, A. V. S.; HETTIARACHCHY, Navam S. Green tea and grape seed extracts —Potential applications in food safety and quality. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 827-839, 2011.

PIANOWSKI, Eloisa Helena; JANISSEK, Paulo Roberto. Desinfecção de efluentes sanitários com uso de cloro: avaliação da formação de trihalometanos. **Sanare: Revista Técnica da Sanepar**, v. 20, n. 20, 2003.

PORTELLA, Kleber Franke et al. Caracterização físico-química do lodo centrifugado da estação de tratamento de água Passaúna. *In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária Ambiental*, Curitiba, 2003.

PRÜSS, Annette *et al.* Estimating the burden of disease from water, sanitation, and hygiene at a global level. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 5, p. 537-542, 2002.

PUNTES, Suzanne S.; DUNSTAN, Michele. *E. coli* complications in pediatric critical care. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, 2017.

RAUHA, Jussi-Pekka et al. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 3-12, 2000.

REYGAERT, Wanda; JUSUFI, Ilir. Green tea as an effective antimicrobial for urinary tract infections caused by *E. coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 162, 2013.

REYNOLDS, K.A.; Daño Colateral: La secuela crónica de los patógenos propagados por el agua de la llave. **Água Latinoamérica**. p. 3. 2004.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 80-84, 2005.

ROBERT PULLÉS, Marlen. Microorganismos indicadores de la calidad del agua potable en Cuba. **Revista CENIC**. Ciencias Biológicas, v. 45, n. 1, 2014.

ROSS, Z. M. et al. Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 1, p. 475-480, 2001.

SABESP – Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo. **Relatório Anual de Qualidade da Água 2008**. Mairiporã, 2008.

SAHLSTRÖM, Leena et al. A laboratory study of survival of selected microorganisms after heat treatment of biowaste used in biogas plants. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7859-7865, 2008.

SAIGG, Nayane Lins; SILVA, Maria Claudia. Efeitos da utilização do chá verde na saúde humana. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 7, n. 1, p. 69-89, 2009.

SANCHES, S. M.; TAKAYANAGUI, A. M. M.; DO PRADO, E. L.; SEGURA–MUÑOZ, S. I.; VIEIRA, E. M. Determinação de subprodutos clorados formados durante a etapa da oxidação da água com o cloro. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais (Online)**, n. 09, p. 15-19, 2008.

SHAN, B. et al. Antibacterial and antioxidant effects of five spice and herb extracts as natural preservatives of raw pork. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 11, p. 1879-1885, 2009.

SHARMA, A. *et al.* Green tea extract: possible mechanism and antibacterial activity on skin pathogens. **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p. 672-675, 2012.

SHI, John et al. Polyphenolics in grape seeds - biochemistry and functionality. **Journal of Medicinal Food**, v. 6, n. 4, p. 291-299, 2003.

SILVA, T R. **Integrity monitoring of reverse osmosis membranes: Potential for naturally present viruses to verify virus removal comparing to MS2 bacteriophages.** (Tese de Doutorado) - Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, 2017.

SINTON, L.; HALL, C.; BRAITHWAITE, R. Sunlight inactivation of *Campylobacter jejuni* and *S. enterica*, compared with *E. coli*, in seawater and river water. **Journal of Water and Health**, v. 5, n. 3, p. 357-365, 2007.

SOLA, Marília Cristina et al. **Mecanismos de quorum sensing e sua relevância na microbiologia de alimentos.** 2012.

SOUZA, Jeanette Beber; DANIEL, Luiz Antonio. Inativação dos microrganismos indicadores *E. coli*, colifagos e *Clostridium perfringens* empregando ozônio. **Ambiência**, v. 4, n. 2, p. 265-273, 2008.

SU, Xiaowei; D'SOUZA, Doris H. Grape seed extract for control of human enteric viruses. **American Society for Microbiology Journals**, v. 77, n. 12, 2011.

SU, Xiaowei; D'SOUZA, Doris H. Grape seed extract for foodborne virus reduction on produce. **Food microbiology**, v. 34, n. 1, p. 1-6, 2013.

TEIXEIRA, S.R.; SOUZA, S. A. D.; SOUZA, N. R. D.; JOB, A. E.; GOMES, H. M., HEITZMANN NETO, J. F. Caracterização de resíduo de estações de tratamento de água (ETA) e de esgoto (ETE) e o estudo da viabilidade de seu uso pela indústria cerâmica. In: **XXVIII Congresso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Cancun (Mexico)**. p. 27-31. 2002

TOKMAK, B.; CAPAR, G.; DILEK, F. B.; YETIS, U. Trihalomethanes and associated

potential cancer risks in the water supply in Ankara, Turkey. **Environmental Research**, v. 96, n. 3, p. 345-352, 2004.

WANG, Gen-Shuh; DENG, Ya-Chen; LIN, Tsair-Fuh. Cancer risk assessment from trihalomethanes in drinking water. **Science of the Total Environment**, v. 387, n. 1-3, p. 86-95, 2007.

WHO. World Health Organization. *Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. Vol 4. Geneva: World Health Organization*. ISSN 4. 204p, 2006.

WHO/UNICEF – WORLD HEALTH ORGANIZATION AND UNITED NATIONS CHILDREN’S FUND. **Progress on Drinking Water and Sanitation-2014 Update**. 2014.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on water safety plans: a review of proactive risk assessment and risk management practices to ensure the safety of drinking-water**. World Health Organization, 2017.

WINBLAD, U.; SIMPSON-HEBERT, M. (Ed.). **Ecological Sanitation**. EcoSanRes Programme, 2004.

XU, W. et al. Antibacterial effect of grapefruit seed extract on food-borne pathogens and its application in the preservation of minimally processed vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, n. 1, p. 126-133, 2007.

YAVARMANESH, M. et al. Impact of milk components in recovery of the MS2 bacteriophage as an indicator of enteric viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 168, n. 1-2, p. 103-107, 2010.

ZAFRA, Alicia Sánchez. Efectos de los trihalometanos sobre la salud. **Higiene, Sanidad, Ambiente**, v. 8, p. 280-290, 2008.

ZAINUDIN, F. M.; HASAN, H. A.; ABDULLAH, S. R. S.. An overview of the technology used to remove trihalomethane (THM), trihalomethane precursors, and trihalomethane formation potential (THMFP) from water and wastewater. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 57, p. 1-14, 2017.

ZHU, M. J. *et al.* Antimicrobial efficacy of grape seed extract against *E. coli* O157: H7 growth, motility and Shiga toxin production. **Food Control**, v. 51, p. 177-182, 2015.