

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANEAMENTO,
MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS

**Avaliação do Efeito Desinfetante do
Cloro em Fezes Contendo o *Vibrio*
*cholerae***

Patrícia Procópio Pontes

Belo Horizonte

1993

Patrícia Procópio Pontes

**Avaliação do Efeito Desinfetante do
Cloro em Fezes contendo o *Vibrio
Cholerae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de concentração: Saneamento

Linha de pesquisa: Tratamento de águas residuárias

Orientador: Prof. Carlos Augusto de Lemos Chernicharo

Belo Horizonte

Escola de Engenharia da UFMG

1993

Página com as assinaturas dos membros da banca examinadora, fornecida pelo Colegiado do Programa.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram para a execução do trabalho, em especial:

- ao Professor Carlos Augusto de Lemos Chernicharo, por sua preciosa orientação e supervisão;
- ao Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Escola de Engenharia da UFMG pelo apoio e colaboração;
- à Secretaria de Saúde do Estado de Minas Gerais pelo apoio prestado durante a pesquisa, em especial a Luiza, Raquel e Rômulo;
- ao pessoal da Fundação Ezequiel Dias, pela colaboração durante as diversas etapas da pesquisa;
- ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida.
- à WALLACE e TIERNAN, pelo empréstimo de equipamento para análise.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1.	Cólera	15
2.1.1.	O Gênero <i>Vibrio</i>	16
2.1.2.	<i>Vibrio cholerae</i>	18
2.1.3.	Características do vibrião	21
2.1.4.	Epidemiologia	24
2.1.4.1.	Distribuição geográfica	24
2.1.4.2.	Reservatório	27
2.1.4.3.	Transmissão	27
2.2.	Prevenção e Controle da Cólera	29
2.2.1.	Medidas Individuais	29
2.2.2.	Medidas de Saneamento	30
2.3.	Desinfecção	33
2.3.1.	Cinética de inativação de microrganismos	33
2.3.2.	Cinética de inativação na presença de desinfetantes	35
2.3.3.	Fatores que influenciam a eficiência da desinfecção	37
2.3.3.1.	Tempo de contato	38
2.3.3.2.	Concentração e tipo de agente químico	39
2.3.3.3.	Intensidade e natureza do agente físico	39
2.3.3.4.	Temperatura	40
2.3.3.5.	Número de organismos	41
2.4.	Desinfecção Com Cloro	42
2.4.1.	Histórico	42
2.4.2.	Química do cloro	43
2.4.2.1.	Propriedades	43
2.4.2.2.	Reação com a água	45
2.4.2.3.	Demanda de cloro	47
2.4.2.4.	"Breakpoint"	49
2.4.2.5.	Eficiência da cloração	51
2.4.2.6.	Metodologias para a determinação de cloro residual	57
2.5.	Outor Métodos de Desinfecção	62
2.5.1.	Agentes químicos	62
2.5.1.1.	Ozônio	63
2.5.1.2.	Dióxido de cloro	65
2.5.1.3.	Ácido peracético	66
2.5.1.4.	Iodo	67
2.5.1.5.	Bromo	68
2.5.1.6.	Cloreto de bromo	68

2.5.1.7.	Metais pesados e seus compostos	69
2.5.1.8.	Tensoativos	70
2.5.1.9.	Álcalis e ácidos	70
2.5.2.	Agentes físicos	70
2.5.2.1.	Radiação ultravioleta	71
2.5.3.	Agentes mecânicos	73
3.	METODOLOGIA	74
3.1.	Determinação de Cloro Residual em Amostras com Elevada Turbidez e Alta Concentração de Matéria Orgânica	74
3.1.1.	Metodologias utilizadas	74
3.1.2.	Características das amostras	75
3.1.3.	Testes realizados	76
3.1.3.1.	Método DPD	76
3.1.3.2.	Método do potencial de oxi-redução (ORP)	77
3.1.3.3.	Método da titulação amperométrica	82
3.1.4.	Testes realizados na amostra de fezes	82
3.2.	Determinação do "breakpoint" em amostras de Fezes	84
3.3.	Testes de sobrevivência do Vibrião	86
3.4.	Testes de Desinfecção	90
3.4.1.	Testes em amostras de fezes inoculados com vibrião	90
3.4.2.	Testes em amostras de fezes sem inóculo do vibrião	91
3.4.3.	Testes em amostras de cultura pura de vibrião	92
3.5.	Descloração das amostras para análise bacteriana	94
3.6.	Análise Estatística dos Resultados	95
4.	RESULTADOS	96
4.1.	Determinação de cloro residual na amostra de esgotos	96
4.1.1.	Resultados do Método DPD	96
4.1.2.	Resultados do Método do Potencial de Oxi-redução	98
4.1.2.1.	Testes com amostras de água destilada	98
4.1.2.2.	Testes com amostras de esgoto	99
4.1.3.	Resultados do Método da Titulação Amperométrica	100
4.1.4.	Análise estatística das metodologias para determinação de cloro residual	104
4.1.4.1	Correlação entre os métodos DPD e ORP	104
4.1.4.2	Correlação entre os métodos DPD e titulação amperométrica	104
4.2.	Determinação do Cloro Residual em Amostras de Fezes	105
4.3.	Resultados da Determinação do "breakpoint" em amostras de esgoto	107
4.4.	Resultados da Determinação do "breakpoint" em amostras de fezes	108
4.5.	Resultados dos Testes de Sobrevivência do Vibrião	109

4.6.	Testes de Desinfecção	110
4.6.1.	Desinfecção de Vibriões em Amostras de Fezes	110
4.6.2.	Desinfecção de Vibriões em Cultura Pura	111
4.6.2.1.	Resultados obtidos para tempo de contato de 30 minutos, sem mistura	111
4.6.2.2.	Resultados obtidos para tempo de contato de 30 minutos, com mistura.	112
4.6.2.3.	Resultados obtidos para tempo de contato de 15 minutos, sem mistura.	113
4.6.2.4.	Resultados obtidos para tempo de contato de 15 minutos, com mistura.	114
4.6.3.	Desinfecção de Fezes	115
4.6.3.1.	Resultados obtidos para tempo de contato de 30 minutos, sem mistura	115
4.6.3.2.	Resultados obtidos para tempo de contato de 30 minutos, com mistura	116
4.6.4.	Análise Estatística dos Testes de Desinfecção	117
4.6.5.	Correlação dos testes de Desinfecção com a Lei de Chick	120
5.	DISCUSSÃO	126
5.1.	Análise Comparativa dos Métodos para Determinação de Cloro Residual	126
5.2.	Análise dos Testes de Sobrevivência de Vibriões	128
5.3.	Análise Global dos Testes de Desinfecção	129
5.3.1.	Cloro residual e eficiência da desinfecção	130
6.	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	134
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
8	ANEXOS	145

LISTA DE QUADROS

2.1.	Características bioquímicas do "V.C." clássico e "El Tor"	19
2.2.	Resultados de análises microbiológicas e físico-químicas. Cloração de efluente de digestor anaeróbio	38
2.3.	Compostos formados pela oxidação da amônia pelo cloro	48
2.4.	Eliminação e destruição de bactérias por diferentes processos de tratamento	73
3.1.	Características das amostras de esgoto e fezes	75
3.2.	Resumo dos testes realizados para os métodos DPD, DRP e de titulação amperométrica (amostra de esgotos)	77
3.3.	Testes realizados em amostra de fezes utilizando-se o método DPD	83
3.4.	Testes para determinação de cloro residual total e livre em amostras de fezes	84
3.5.	Sobrevivência do vibrião em amostra de fezes	86
3.6.	Testes de desinfecção de vibrião em amostra de fezes para tempos de contato de 30 minutos	91
3.7.	Testes de desinfecção de coliforme em amostras de fezes para tempos de contato de 30 minutos com e sem mistura	92
3.8.	Testes de desinfecção de vibriões em cultura pura para tempos de contato de 30 e 15 minutos	93
4.1.	Resumo dos resultados de avaliação da dosagem de cloro através do método DPD	97
4.2.	Resultados de avaliação de cloro livre (amostra: água destilada)	98
4.3.	Resumo dos resultados da determinação da dosagem de cloro em amostra de fezes (método DP)	105
4.4.	Análise estatística para os testes de desinfecção (Culturas puras de vibriões)	118
4.5.	Análise estatística para os testes de desinfecção (Amostra de fezes)	118
4.6.	Análise de regressão não-linear - Lei de Chick (Culturas puras de vibriões)	121
4.7.	Análise de regressão não-linear - Lei de Chick (Amostra de fezes)	124

LISTA DE FIGURAS

2.1.	Desvios da Lei de Chick	37
2.2.	Curva de cloro residual em função da dosagem	50
2.3.	Eficiência desinfetante do ácido hipocloroso e monocloramina	52
3.1.	Aparelho controlador de pH - ORP	79
3.2.	Aparelho controlador de pH - ORP e pHmetro	80
3.3.	Curvas de controle de pH	81
3.4.	Preparação do inóculo de vibrião	88
3.5.	Diluições sucessivas para determinação da concentração do inóculo	88
3.6.	Placa de TCBS para contagem de vibrião	89
4.1.	Correlação entre os métodos DPD e ORP - Cloro livre	100
4.2.	Correlação entre os métodos DPD e amperométrico - Cloro total	102
4.3.	Correlação entre os métodos DPD e amperométrico - Cloro livre	103
4.4.	Curva do "breakpoint" em amostra de esgoto - Método DPD	107
4.5.	Curva do "breakpoint" em amostra de fezes - Método DPD	108
4.6.	Sobrevivência de vibriões em função do tempo	109
4.7.	Desinfecção de vibriões em fezes	110
4.8.	Teste de desinfecção 1 (Amostra: cultura pura de vibriões)	111
4.9.	Teste de desinfecção 2 (Amostra: cultura pura de vibriões)	112
4.10.	Teste de desinfecção 3 (Amostra: cultura pura de vibriões)	113
4.11.	Teste de desinfecção 4 (Amostra: cultura pura de vibriões)	114
4.12.	Teste de desinfecção 1 (Amostra: fezes)	116
4.13.	Teste de desinfecção 2 (Amostra: fezes)	116
4.14.	Teste de desinfecção 1 (Amostra: cultura pura de vibriões) - Ajuste à Lei de Chick	122
4.15.	Teste de desinfecção 2 (Amostra: cultura pura de vibriões) - Ajuste à Lei de Chick	122
4.16.	Teste de desinfecção 3 (Amostra: cultura pura de vibriões) - Ajuste à Lei de Chick	123
4.17.	Teste de desinfecção 4 (Amostra: cultura pura de vibriões) - Ajuste à Lei de Chick	123
4.18.	Teste de desinfecção 1 (Amostra: fezes) - Ajuste à Lei de Chick	125
4.19.	Teste de desinfecção 2 (Amostra: fezes) - Ajuste à Lei de Chick	125
5.1.	Curva do "breakpoint" e sobrevivência de coliformes para TC=30 min., sem mistura	131

5.2.	Curva do "breakpoint" e sobrevivência de coliformes para TC=30 min., com mistura	132
5.3.	Dosagem requerida de cloro em função da concentração de amônia	133

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos principais (i) a avaliação das metodologias para determinação de cloro residual em esgotos, quando aplicadas a amostras com alta turbidez e elevada concentração de matéria orgânica e (ii) avaliar o efeito desinfetante do cloro sobre o *Vibrio cholerae*. A primeira fase da pesquisa consistiu na realização de testes de laboratório para se avaliar a aplicabilidade dos métodos DPD, potencial de oxi-redução e titulação amperométrica na determinação do cloro residual em amostras de fezes e esgotos brutos. Em uma segunda etapa, foram realizados testes de desinfecção em cultura pura de vibriões e em amostras de fezes, tendo sido avaliados os efeitos da dosagem de cloro, do tempo de contato e da mistura da amostra.

Os resultados obtidos indicaram uma boa correlação entre os métodos avaliados, sendo que o da titulação amperométrica apresentou-se mais preciso e menos sujeito a interferências, não obstante foi confirmada a aplicabilidade dos três métodos testados na determinação de cloro residual em amostras de fezes e esgotos brutos. Em relação aos testes de desinfecção, os resultados obtidos para a amostra de fezes indicaram que dosagens de cloro da ordem de 1.500 mg/l foram suficiente para a eliminação de coliformes fecais (independentemente do tempo de contato e da mistura aplicada). Para os testes de desinfecção de vibriões em culturas puras, as dosagens de cloro necessárias foram da ordem de 600 mg/l. Tanto nas amostras de fezes quanto nas de cultura pura, as variáveis tempo de contato e mistura não afetaram significativamente o processo de desinfecção.

ABSTRACT

This work had as the main objectives (i) the evaluation of the methodologies for the determination of residual chlorine in wastewaters, when applied to samples of high turbidity and elevated concentrations of organic matter and (ii) the evaluation of the effects of chlorine dosagens upon the Vibrio cholerae. The first phase of the research consisted in the development of laboratory tests for evaluating the applicability of the DPD, oxi-reduction potential and amperometric titration methods in a the determination of residual chlorine in feces and raw wastewater samples. In the second phase, disinfection tests in pure cultures of vibrio cholerae and in feces samples were carried out, and the effects of chlorine dosages, contact time and sample mixing were evaluated.

The results indicated a good correlation among the three methods, with the amperometric titration one being more accurate and less subject to interferences, although it was confirmed that all three methods can be applied in the determination of residual chlorine in feces and raw wastewater samples. In relation to the disinfection tests, the results for the feces sample indicated that chlorine dosages of around 1500 mg/l were sufficient for the elimination of fecal coliforms, (independently of the contact time and the applied mixing). For the disinfection tests of pure cultures of Vibrio cholerae, the necessary chlorine dosages were around 600 mg/l. In both samples, the contact time and mixing variables did not significantly affect the disinfection process.

1. INTRODUÇÃO

A presença de focos epidêmicos de cólera em diversas regiões do Brasil tem demandado das autoridades competentes a implementação de medidas emergenciais, numa tentativa de evitar uma maior propagação da doença. Esta é, sem dúvida, uma tarefa bastante difícil, uma vez que a ausência generalizada de infra-estrutura de saneamento básico favorece a disseminação da doença. Entretanto, algumas medidas de caráter corretivo têm sido adotadas na tentativa de conter o avanço da doença, dentre elas a desinfecção de fezes e vômitos de pacientes coléricos com a utilização de compostos de cloro. Dessa forma, hospitais, postos de saúde, empresas de ônibus etc, têm procurado atuar de acordo com as recomendações emanadas do Ministério da Saúde e das Secretarias Estaduais de Saúde, no trato dos dejetos de pessoas com suspeita de doença.

Face às incertezas quanto às dosagens de cloro efetivamente necessárias para a eliminação do vibrião colérico, desenvolveu-se a presente pesquisa para se avaliar o efeito desinfetante do cloro sobre o vibrião, através da combinação de diferentes variáveis que possam interferir no processo de desinfecção, como dosagem, tempo de contato e mistura. Para o desenvolvimento da referida pesquisa, foi firmado um convênio entre a Secretaria de Saúde do Estado de Minas Gerais, Fundação Ezequiel Dias e Fundação Christiano Ottoni através do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da EEUFMG.

O presente trabalho retrata duas fases da pesquisa. A primeira refere-se à escolha da metodologia para se avaliar o teor do cloro residual em amostras

de fezes e vômitos de pacientes com suspeita de doença. Tal avaliação se fez necessária face às incertezas da aplicabilidade das metodologias apresentadas na bibliografia especializada, na determinação de cloro residual em amostras de elevada turbidez e alta concentração de matéria orgânica.

A segunda fase refere-se à determinação da dosagem de cloro necessária à eliminação do vibrião em amostras de fezes e vômitos. Tal avaliação teve como objetivo investigar se as dosagens usualmente recomendadas e utilizadas seriam realmente necessárias ao processo da desinfecção, uma vez que se desconhece a existência de estudos que justifiquem a aplicação das dosagens de cloro recomendadas pelo MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL, 1991), da ordem de 10.000 mg Cl/l.

Dessa forma, o trabalho teve como principais objetivos: (i) estabelecer a influência da turbidez e da concentração de matéria orgânica na determinação do cloro residual através de diferentes metodologias, (ii) determinar o melhor método para análise de cloro residual em amostras de fezes e vômitos de pacientes coléricos, (iii) avaliar a correlação entre cloro residual e desinfecção, (iv) determinar a influência do tempo de contato, mistura e dosagem no processo de desinfecção e (v) determinar a dosagem de cloro necessária à eliminação do vibrião em amostras de fezes e vômitos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CÓLERA

A cólera é uma infecção intestinal aguda, causada pelo vibrião colérico (*Vibrio cholerae*). Podem ocorrer casos de infecção assintomática ou casos graves com diarreia profusa, vômitos ocasionais, rápida desidratação, acidose e colapso respiratório (caso mais grave) (BRASIL, 1990).

A doença caracteriza-se por perda de água e eletrólito e inicia-se com uma evacuação repentina e sem dor do intestino. À medida que a doença progride, podem ocorrer vômitos junto com câibra no músculo devido a níveis mais baixos de potássio no sangue (FEACHEM et al., 1983).

Nos casos não tratados, os pacientes ficam desidratados entram em choque e morrem, apresentando taxa de letalidade elevada (50% ou mais) e a morte pode ocorrer em poucas horas (BRASIL, 1990).

Os casos fatais podem ser reduzidos a menos de 1% quando o tratamento apropriado for realizado rapidamente, através de reposição eletrolítica.

A perda de água característica da doença ocorre devido à ação de uma enterotoxina, produzida pelo vibrião, que afeta o tecido epitelial da mucosa gastrointestinal (FEACHEM et al., 1983).

Para os casos ocorridos no Equador, observou-se como sintomas da doença desde diarreia leve com desidratação moderada, até diarreia profusa com desidratação grave e estado de choque; a maioria dos casos apresentou obnubilação, dispnéia, hiperventilação, mal estar abdominal, fortes câibras musculares e evacuação inicial cor de café e logo depois com aparência de água de côco. A maioria dos casos (85%) recuperaram-se após hidratação por via oral; outros (15%) necessitaram de hidratação por via endovenosa (SÃO PAULO, 1991).

No Peru, observou-se, durante as primeiras semanas de epidemia, que 81% dos doentes tinham mais de cinco anos de idade, contrariando dados de 1988 em que 75% dos doentes com diarreia aguda tinham menos de cinco anos de idade (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE - OPS, 1991).

2.1.1. O gênero *Vibrio*

O gênero "*Vibrio*" é constituído por bacilos gram-negativos retos ou ligeiramente curvos e compreende várias espécies. A mais importante é o "*Vibrio cholerae*" uma vez que um de seus sorogrupos é responsável pela cólera.

Outra espécie que deve ser destacada é o *Vibrio parahaemolyticus*, cujo papel na etiologia das toxi-infecções alimentares vem sendo reconhecido de maneira crescente nos últimos anos (TRABULSI, 1991).

O *V. parahaemolyticus* é causador de gastroenterites relacionadas com o consumo de alimentos de origem marinha crus ou semi-crus. Essa espécie

também tem sido citada como causadora de infecção intestinal (NAIR, 1988a).

O *V. parahaemolyticus* é encontrado em ambientes marinhos e muitas infecções causadas por este organismo são de origem ambiental. A ocorrência é favorecida por temperaturas amenas e ele não é encontrado em regiões com temperaturas muito baixas (KELLY & STROH, 1988b). O ambiente marinho pode ser considerado um reservatório para o *V. parahaemolyticus* (FEACHEM et al., 1983).

KELLY & STROH (1988A) realizaram estudos comparativos entre a ocorrência do *Vibrio parahaemolyticus* em pacientes e no meio ambiente. Foi detectada infecção em 13 pacientes (oito com gastroenterites, cinco com infecções), e todas as infecções ocorreram em pacientes com maior exposição ao microrganismo. O *Vibrio parahaemolyticus* foi isolado em 11 a 33% das amostras de água. Nos meses de inverno, quando a temperatura atingia valores menores que 14°C e a salinidade era mais que 13‰ (partes por mil), não foi observada a presença do microrganismo. Para temperaturas mais elevadas $\geq 17^{\circ}\text{C}$ e menor salinidade ($\leq 6,5\text{‰}$) observou-se uma maior concentração do microrganismo.

As demais espécies são encontradas mais raramente em associação com diarreia e outras infecções: *V. hollisae*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. vulnificus*, *V. damsela*, *V. alginolyticus*, *V. metschnikovii* e *V. mimicus* (TRABULSI, 1991).

2.1.2. *Vibrio cholerae*

O *Vibrio cholerae* é um bacilo gram-negativo facultativo, sendo provido de um flagelo polar (SÃO PAULO, 1991), compreende vários grupo sorológicos, caracterizados por antígenos O, ou somáticos, que correspondem aos lipossacarídeos da parede bacteriana. Das amostras desses sorogrupos, somente as do sorogrupo 01 estão associadas à cólera, ou seja, as que aglutinam anti-soro sorogrupo 01. Distinguem-se no sorogrupo 01, três frações anti-gênicas denominadas A, B e C cuja distribuição permite dividir o sorogrupo nos sorotipos Ogawa (frações A e B), Inaba (frações A e C) e Hikojima (frações A, B e C). As amostras desses sorotipos podem apresentar as características bioquímicas do *V. cholerae* clássico ou "El Tor", este último descoberto no início do século na península de Sinai. As principais diferenças entre os dois estão no Quadro 2.1 (TRABULSI, 1991).

O *V. cholerae* produz uma enterotoxina condicionada a um controle genético não envolvendo plasmídeos e que adere à mucosa intestinal. Existem evidências da produção de mucose pelas cepas endêmicas. Recentemente foi descoberto um grupo do vibrião que aglutina anti-soro 01, mas não produz enterotoxinas, são conhecidos como *Vibrio cholerae* 01 atípico (TRABULSI, 1991; NAIR et al., 1988).

Um outro grupo de *Vibrio cholerae* que pode ser identificado é aquele que não aglutina o anti-soro 01, mas que é semelhante ao *Vibrio cholerae* 01 bioquímica e geneticamente. São chamados *Vibrio cholerae* NAG (non-aglutinable) ou NCVs (non-cholerae vibrios), não causam cólera, mas

muitos deles têm sido encontrados em indivíduos com diarreia e produzem toxina semelhante à colérica (FEACHEM et al., 1983).

Em dezembro de 1992, foi observada a ocorrência da epidemia de uma doença idêntica à cólera, ao sul de Bangladesh. O agente isolado dos pacientes foi o *Vibrio cholerae* não 01. A doença é indistingüível da cólera no exame clínico e na resposta ao tratamento. A cepa não se encaixa nos 138 sorogrupos de *Vibrio cholerae* existentes e ao novo sorogrupo (0139) foi dado o nome de Bengal. As cepas isoladas eram grandes produtoras de uma enterotoxina semelhante à da cólera e acredita-se que ela tenha um potencial pandêmico (INTERNATIONAL CENTRE DIARRHOEAL DISEASES RESEARCH CHOLERA WORKING GROUP, 1993).

Estudos realizados por NAIR et al. (1988a) nos quais o *Vibrio cholerae* NAG foi isolado no ambiente aquático de Calcutá (uma área hiperendêmica de cólera), foi observado que apenas 0,5% dos vibriões produziram a toxina da cólera. Entretanto, o papel do *Vibrio cholerae* NAG na epidemiologia da cólera, como reservatório ambiental do *Vibrio cholerae* ainda não está claro.

Quadro 2.1. - Características bioquímicas do *V.cholerae* clássico e "El Tor"

Características	Biotipos	
	Clássico	El Tor
Hemólise (em tubo)	-	+/-
Sensibilidade à polimixina	sensível	resistente
Produção de acetoína	-	+
Aglutinação de hemácias de pinto ou galinha	-	+
Sobrevida no meio ambiente	menor	maior

Fonte: TRABULSI, 1991

O vibrião colérico pode responder a condições adversas por entrar em fase biológica viável, porém não cultivável pelos métodos comuns usados nos laboratórios de microbiologia. Nesta fase, que parece ser parte de um "ciclo de vida" e que tem semelhanças com a formação de endosporos pelas bactérias gram-positivas, o vibrião colérico é denominado "microvibrio". Esta fase deve contribuir para a sazonalidade da doença (GELLI, 1993).

O biotipo "El Tor" foi o responsável por quase todas as epidemias recentes de cólera, embora ainda ocorram casos provocados pelo biotipo clássico no subcontinente indiano (BRASIL, 1990). A substituição do biotipo clássico pelo "El Tor" talvez esteja relacionada com a maior capacidade de sobrevivência do último na água e no intestino humano (TRABULSI, 1991).

Existem certas diferenças entre os dois biotipos. Em geral o "El Tor" é mais resistente, ou seja, sobrevive mais tempo no meio ambiente, cresce melhor e mais rápido nos meios de cultura e é mais resistente aos agentes químicos. Existem, além disso, diferenças epidemiológicas (BRASIL, 1990):

- a) em sua maioria, os casos devidos ao biotipo "El Tor" são leves ou assintomáticos;
- b) a ocorrência de casos secundários, nas famílias afetadas, é menor nas infecções causadas pelo biotipo "El Tor";
- c) portadores crônicos do vibrião "El Tor" têm sido registrados.

Evidências recentes sugerem que a virulência do biotipo "El Tor" pode estar aumentando (KHAN & SHAHIDULLAH, 1980).

Em regiões endêmicas, o número de casos assintomáticos é maior (BART et al., 1970). Uma explicação para este fato seria a presença de anticorpos em

grupos de risco. Foi investigada a presença de anticorpos em 559 voluntários, na região endêmica da costa do Golfo do Texas. Ocorreram níveis elevados de anticorpos vibriocidas em 14% dos voluntários e em 6,8% dos voluntários observou-se a presença de anticorpos à enterotoxina do *Vibrio cholerae*. Foram observados níveis mais elevados de anticorpos em grupos de risco, voluntários que apresentam maior exposição à água do mar, como pescadores, trabalhadores do porto e consumidores de peixe (HUNT, 1988).

2.1.3. Características do Vibrião

O vibrião colérico é um germe frágil, que suporta mal certas condições ambientais desfavoráveis como o dessecamento, a exposição à luz solar e a competição com outros microrganismos.

Seu tempo de sobrevivência na água depende de diversos fatores tais como a temperatura, o pH, a riqueza em bactérias, sais e matéria orgânica.

O vibrião colérico pode conservar sua viabilidade durante vários dias, em alimentos alcalinos e úmidos, desde que não tenha que competir com outros germes (BRASIL, 1990).

O vibrião é extremamente móvel, exceto quando sob influência de antibióticos ou de drogas. Apresenta crescimento ótimo mais em condições aeróbias do que em condições anaeróbias, requer uma temperatura entre 10°C e 40°C com um ótimo aos 37°C; pH de 7 a 9,6; multiplica-se rapidamente na presença de 0,5% a 2,0% de cloreto de sódio e pressão osmótica entre 250 e 700 mosm em meio comum de cultura. O pH igual ou

abaixo de 5 é prejudicial ao bacilo. Pressão osmótica acima de 1200 mosm é desfavorável à sua sobrevivência (SÃO PAULO, 1991).

À temperatura de 30-32°C, o vibrião colérico sobrevive cerca de 2 a 5 dias, em peixes e mariscos; 1 a 7 dias em vegetais; 7 a 14 dias no leite e produtos derivados, na água limpa de reservatórios e poços; e de 10 a 13 dias, na água do mar. Em água contaminada, sua sobrevivência cai para 1 a 2 dias (BRASIL, 1990).

Em baixas temperaturas (5 a 10°C), seu período de sobrevivência aumenta de maneira significativa, podendo chegar a 18 dias, em água potável, e 60 dias em água do mar (BRASIL, 1990).

Trabalhos recentes demonstram que o *Vibrio cholerae* pode sobreviver em baixa salinidade quando o nível de nutrientes e a temperatura são altos (NAIR et al., 1988). Além disso, observou-se, ao contrário do que se esperava, maior sobrevivência do vibrião no verão do que no inverno. Um pH mais alcalino, encontrado no verão, e a maior proliferação do vibrião poderiam se a causa desta maior sobrevivência (SINGLETON et al., 1982; NAIR et al., 1988a).

Com relação à sobrevivência do vibrião em regiões poluídas, foi observado, em pesquisas realizadas na Índia, que, apesar do alto nível de poluição encontrado em certas áreas e do ambiente anóxico, o *Vibrio cholerae* sobrevivia em grandes densidades (NAIR et al., 1988). Já o trabalho realizado por WEST & LEE (1982) indica uma menor sobrevivência do vibrião em regiões poluídas.

O tempo de sobrevivência do vibrião ao aquecimento a 56°C é de 30 minutos e à fervura, somente por alguns segundos. Culturas colocadas sob refrigeração de 1° a 4°C sobrevivem no mínimo por 4 a 6 semanas e

algumas cepas permanecem viáveis no gelo durante 4 meses. Congelamentos rápidos favorecem sua viabilidade. Dessecamento e luz solar podem matar o bacilo em poucas horas. Os vibriões são sensíveis aos vários antissépticos, especialmente ao álcool a 10% e, na ausência de matéria orgânicas, são facilmente destruídos pelo cloro e permanganato de potássio. A sobrevivência do bacilo em material fecal depende da temperatura, umidade e competição microbiana (SÃO PAULO, 1991).

Com relação à sobrevivência do vibrião em fezes, ocorre uma sobrevivência por tempos mais longos em fezes mais líquidas. Na temperatura ambiente em climas tropicais e subtropicais o vibrião sobrevive cerca de cinco dias (FEACHEM et al., 1983). As pesquisas realizadas por CHENG (1963) demonstram que o *Vibrio cholerae* biotipo "El Tor" sobrevive de 1-4 dias em fezes naturalmente infectadas e de 2-4 dias em fezes artificialmente infectadas na temperatura de 29-31°C. SHODA (1934), estudando o *Vibrio cholerae* biotipo clássico, obteve um tempo de sobrevivência de 0,5-2,0 dias a 4°C para fezes artificialmente infectadas na temperatura ambiente.

2.1.4. Epidemiologia

2.1.4.1. Distribuição Geográfica

A cólera existe, sob a forma endêmica, desde épocas remotas, nas regiões do delta do rio Ganges e Bramaputra, na Índia e em Bangladesh. A propagação da doença ocorre, a partir de zonas endêmicas, para diversas regiões do globo, através de meios de transporte (BRASIL, 1990).

Nas regiões endêmicas, a reincidência contínua do vibrião leva a um aumento gradual da imunidade à doença para pessoas mais velhas. Esta poderia ser uma das razões pelas quais a incidência da doença em crianças nessas áreas é mais alta do que em adultos, enquanto em áreas epidêmicas ocorre o contrário (FEACHEM et al., 1983).

Antes de 1900 ocorreram 5 pandemias de cólera, todas causadas pelo *Vibrio cholerae*, biotipo clássico (BRASIL, 1990):

- a primeira de 1817 a 1823
- a segunda de 1826 a 1837
- a terceira de 1846 a 1862
- a quarta de 1864 a 1875
- a quinta de 1887 a 1896

A primeira pandemia atingiu regiões da África e Ásia. A propagação da doença, a partir da segunda pandemia, acompanhou as rotas de comércio,

atingindo Ásia, África, Europa, América do Norte e América do Sul (BRASIL, 1991).

A terceira pandemia, iniciada em 1846, atingiu o Brasil em 1855. Começando a se propagar pelo Pará, atingiu a Bahia em 1855-1856 (36.000 vítimas) e o Rio, destes pontos ela se propagou para o Amazonas e Maranhão (13.000 óbitos); Alagoas (19.000 vítimas); Sergipe (21.000 vítimas); Rio Grande do Norte, Paraíba (28.000 óbitos) e Pernambuco (38.000 mortos); São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (4.000 óbitos). A doença permaneceu até 1867 matando quase 200.000 pessoas (ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS SERVIÇOS MUNICIPAIS DE ÁGUA E ESGOTO - ASSEMAE, 1993).

Na quarta pandemia, a cólera reapareceu em várias ilhas do Caribe, entre 1865 e 1870. A epidemia atingiu também Cuba (1867 a 1870), Estados Unidos (1865 a 1866) e a América do Sul, onde os principais países atingidos foram Chile e Paraguai (OPS, 1991).

A quinta pandemia caracterizou-se por surtos ocorridos no México (1882 a 1883), Argentina (1886 a 1888), Uruguai (1886) e Chile (1886 a 1888). Nos Estados Unidos foi possível controlar a cólera, tendo ocorrido dez casos em Nova York em 1893. O Brasil foi atingido novamente durante a quinta pandemia de 1893 a 1895 (OPS, 1991).

A sexta pandemia, também causada pelo biotipo clássico, foi registrada no início deste século (1902-1923) com epidemias na Ásia e alguns surtos na África e Europa, sem atingir a América. De 1923 a 1960, a cólera ficou restrita a regiões endêmicas na Ásia.

Em 1961, iniciou-se a atual pandemia, a partir de um foco endêmico na Indonésia, quando o *Vibrio cholerae*, biotipo "El Tor", espalhou-se através de movimentos migratórios (BRASIL, 1990).

Em 1963, a sétima pandemia atingiu Coréia, China e as Filipinas. Em 1966, atingiu Paquistão, Afeganistão, Irã, Rússia, Índia e Iraque. Em 1970, a cólera atingiu o Mediterrâneo, no Norte e Oeste da África e algumas partes da Europa Oriental. Foram registrados pequenos surtos na Espanha, em Nápoles e em Portugal, no Japão (em 1977 e 1978) e no Texas (1981). A mais recente manifestação da sétima pandemia, foi a epidemia de cólera no Peru em 1991, onde, no primeiro ano, provocou cerca de 2.850 mortes. A partir de então a cólera propagou-se pelo Equador, Colômbia, Guatemala, México, Panamá, El Salvador, Bolívia, Chile, Venezuela e Brasil" (OPS, 1991; ASSEMAE, 1993).

Os principais fatores para a propagação da doença, durante os últimos trinta anos, foram (FEACHEM et al., 1983; BRASIL, 1990):

- a característica do biotipo "El Tor", de produzir infecções assintomáticas;
- incremento dos fluxos migratórios de turismo e comércio;
- condições precárias de saneamento;
- meios rápidos de transporte;
- falta de vacina eficaz.

2.1.4.2. Reservatório

O único reservatório comprovado do vibrião é o homem e a doença se mantém através do ciclo de transmissão homem - meio ambiente -homem. Alguns animais que vivem em locais infectados expelem o vibrião passivamente. Entretanto, não existem provas concretas de que os animais sejam reservatórios reais (FEACHEM et al., 1983).

Recentes observações sugerem que plantas aquáticas e frutos do mar desempenham o papel de reservatórios (BRASIL, 1991). Alguns pesquisadores acreditam que os reservatórios aquáticos são a principal maneira das pessoas se infectarem e de uma região permanecer endêmica (NAIR, 1988).

2.1.4.3. Transmissão

A transmissão ocorre principalmente pela ingestão de água contaminada com fezes ou vômitos de pacientes ou portadores, pela ingestão de alimentos contaminados por mãos sujas de doentes, portadores e manipuladores dos produtos e pelas moscas. Frutos do mar contaminados com água poluída causaram epidemias em Portugal, Guam e Kiribati (BRASIL, 1990). A propagação por contato direto é incomum.

Indivíduos convalescentes e assintomáticos podem eliminar 10^2 - 10^5 vibriões por grama de fezes, enquanto em um caso ativo elimina-se 10^6 - 10^9 vibriões por mililitro de fezes (SMITH et al., 1961).

A dose infecciosa para adultos é elevada. HORNICK et al. (1971) observaram que era necessário 10^8 vibriões do tipo clássico para produzir diarreia em 50% de adultos voluntários e 10^{11} vibriões para produzir cólera. Com a administração prévia de 2 g de NaHCO_3 , 10^4 vibriões produziram diarreia em 50% dos adultos e 10^8 , cólera (CASH et al., 1974). A acidez gástrica é uma barreira para a infecção pelo vibrião. A dose infecciosa é menor para organismos transmitidos pelo alimento. Isto ocorre provavelmente devido a mais rápida neutralização do ácido gástrico pelo alimento ou pela proteção do vibrião que fica adsorvido nas partículas do alimento (FEACHEM et al., 1983).

O indivíduo infectado passa por um período de incubação de 1 a 3 dias após a ingestão do vibrião. O período de incubação é inversamente proporcional à dosagem ingerida (FEACHEM et al., 1983).

O período de transmissibilidade persiste enquanto se eliminam fezes com o vibrião:

- 50% dos indivíduos com cólera eliminam o vibrião até por cinco dias;
- 30% até por quinze dias;
- 10% até por vinte e cinco dias;
- menos de cinco por cento dos casos ainda excretam o vibrião em um mês.

Portadores crônicos são casos raros (AZURIN et al., 1967). Mais de 90% dos casos de cólera correspondem a formas leves e moderadas, tornando difícil distinguí-los de outras doenças diarreicas agudas (BRASIL, 1990).

2.2. PREVENÇÃO E CONTROLE DA CÓLERA

2.2.1. Medidas Individuais

O uso de antibióticos profiláticos para controlar surtos de cólera demonstrou ser problemático devido ao aumento da resistência do vibrião aos antibióticos em alguns países. Grandes quantidades de tetraciclina (1,788 Kg nos primeiros seis meses) foram usadas como medida terapêutica e profilática seguindo o surto de cólera na Tanzânia em outubro de 1977. Inicialmente, o vibrião demonstrou sensibilidade à tetraciclina mas, após seis meses 76% dos que foram isolados eram resistentes (MHALU et al, 1979).

TOWNER et al. (1980) observaram que a resistência ocorria devido a *plasmídios* transferíveis que conferiam uma resistência múltipla ao antibiótico.

A partir do isolamento de vibriões em Bangladesh, observou-se a existência de resistência múltipla ao antibiótico em 5-36% dos vibriões (THREFALL, ROWE & HUQ, 1980).

A utilização de vacinas na prevenção da cólera não tem sido muito eficiente até o momento. O grau de proteção de vacinas é inferior a 70% e a imunidade dura cerca de quatro meses. SOMMER & MOSLEY (1973), através de um estudo realizado em Bangladesh, observaram que a vacinação em massa era cara e ineficiente. A Organização Mundial de Saúde não recomenda a utilização de vacina contra a cólera (OPS, 1991).

2.2.2. Medidas de Saneamento

A melhoria nas condições de abastecimento de água de abastecimento, coleta e tratamento de esgotos, destinação dos resíduos sólidos, saúde e educação, são responsáveis pela eliminação da cólera nos países desenvolvidos e em bairros de classe média em países em desenvolvimento. A cólera é uma doença característica de países pobres.

A influência do suprimento de água e de outras medidas de saneamento na incidência de doenças em comunidades pobres tem sido estudada por diferentes pesquisadores. Estudos realizados em Bangladesh não demonstraram influência significativa (BRISCOE, 1978), enquanto um estudo nas Filipinas demonstrou uma influência mais significativa (AZURIN & ALVERO, 1974). De acordo com esse último estudo, apenas com o fornecimento de água potável, a incidência dessa doença pode ser reduzida em 73%; somente com a disposição adequada de dejetos em 68%; e com a combinação das duas ações foi de 76%.

CYJETANOVIC (1979) utilizou modelos matemáticos para avaliar a relação econômica entre saneamento e imunização como métodos de controle da cólera. O custo estabelecido para o saneamento foi muito baixo (US\$0,15 per capita em preços de 1971) e a eficiência do saneamento foi considerada muito elevada. A análise demonstrou que o saneamento apresentava uma alta relação custo/benefício (benefício considerado apenas na economia de tratamento médico), a imunização apresentou custos que superavam em muito os benefícios, pois a vacina a ser utilizada deveria ser fornecida anualmente para que o impacto sobre a doença fosse satisfatório.

No Brasil, cerca de 30% da população não dispõe de água tratada e cerca de 70% não dispõe de sistemas de esgotamento sanitário através de rede pública. Estes dados estatísticos demonstram a precariedade do quadro sanitário do Brasil, propiciando a instalação e propagação de diversas doenças de veiculação hídrica (BRASIL, 1991).

De uma maneira geral, em grande parte dos países da América Latina a situação é semelhante. No Peru, somente 22,3% da população rural e 67,2% da população urbana recebe água potável, enquanto o esgotamento sanitário atinge metade das zonas urbanas (54,3%) e 16,6% das zonas rurais (OPS, 1991).

As condições deficientes de saneamento proporcionam a ocorrência da epidemia de cólera e a partir do momento que ela se instala deve-se adotar medidas de controle da epidemia (OPS, 1991):

- **Educação Sanitária da População:** Medida destinada a melhorar os hábitos de higiene da população para reduzir os riscos de contrair a cólera. Deve-se fazer uso dos meios de comunicação disponíveis dando ênfase às seguintes mensagens:
 - a água deve ser desinfetada (fervida ou clorada);
 - bebidas de procedência duvidosa devem ser evitadas;
 - a ingestão de alimentos crus deve ser evitada (especialmente os de origem marinha);
 - as mãos devem ser lavadas freqüentemente (especialmente após sair do banheiro);
 - os utensílios de cozinha devem ser limpos imediatamente após o uso.

- **Cloração da água e vigilância da qualidade dos serviços de abastecimento de água da população:** Deve-se melhorar a cloração de água de abastecimento devendo-se manter um valor de cloro residual de 0,5 mg/l na rede de abastecimento de água (OPS, 1991) e de 1,0 mg/l nos sistemas intermitentes (BRASIL, 1991). Deve-se também fornecer cloro para cloração de reservatórios de água domiciliares, recomenda-se a aplicação de hipoclorito de sódio, de modo a se obter 1,0 a 2,0 mg/l de cloro residual livre, com tempo de contato mínimo de trinta minutos antes do uso (BRASIL, 1991).
- **Tratamento adequado de esgotos e resíduos sólidos:** Deve-se realizar disposição adequada de resíduos sólidos, e realizar melhorias sanitárias domiciliares e públicas (OPS, 1991).
- **Tratamento das roupas e dejetos dos doentes:** Usam-se bolsas de plástico para transportar as roupas até a lavanderia do hospital, onde as mesmas devem ser desinfetadas. Qualquer recipiente utilizado pelos doentes deve ser desinfetado com hipoclorito de sódio. O Ministério da Saúde recomenda uma dosagem de 10.000 mg/l para desinfecção de fezes e vômitos de pacientes com cólera e um tempo de contato de uma hora antes de esgotá-los. Recomenda-se ainda que se adicionem produtos químicos aos dejetos de modo que o pH atinja valores maiores que 12 ou inferiores a 3,5 (BRASIL, 1991).
- **Disposição dos cadáveres:** Os cadáveres devem ser desinfetados antes de serem entregues aos familiares e deve-se realizar o enterro o mais rápido possível (OPS, 1991).

2.3. DESINFECÇÃO

A desinfecção consiste na destruição ou inativação de organismos patogênicos, capazes de produzir doenças, ou de outros organismos indesejáveis. A desinfecção se diferencia da esterilização, processo no qual ocorre a destruição de todos os organismos (METCALF & EDDY, 1979).

2.3.1. Cinética de inativação de microrganismos

Os microrganismos patogênicos podem estar presentes na água e sobreviver por semanas na temperatura ambiente ou por meses em baixas temperaturas. A sua sobrevivência depende de inúmeros fatores, tais como pH, oxigênio, turbidez, nutrientes, competição com outros microrganismos, resistência a substâncias tóxicas (AZEVEDO NETTO et al., 1987).

Os processos naturais de diluição, remoção física e morte ou inativação podem reduzir o nível de patogênicos. O efeito da diluição na concentração de organismos pela descarga da água residuária em um rio ou lago pode ser estimado. Inúmeros modelos matemáticos têm sido propostos para estimar a morte de bactérias e a maioria baseia-se na cinética de primeira ordem (EPA, 1986).

O modelo de primeira ordem para a morte natural de organismos em rios é (EPA, 1986):

$$N = N_0 e^{-Kt} \quad (1)$$

Onde:

N_0 = concentração inicial de microrganismos no rio (Nº/100 ml)

N = concentração de microrganismos no tempo 't' (Nº/100 ml)

K = constante de velocidade (d^{-1})

t = tempo (d)

O modelo de 1ª ordem para o decaimento bacteriano em lagoas é (EPA, 1986):

$$N = N_0 / (1 + Kt) \quad (2)$$

Onde:

N_0 = concentração inicial de microrganismos no afluente (Nº/100 ml)

N = concentração de microrganismos no efluente (Nº/100 ml)

t = tempo de detenção hidráulica na lagoa (d)

K = constante de velocidade (d^{-1})

A constante de velocidade pode ser determinada através de experimentos ou podem ser encontrados valores na literatura. Foi obtido um valor de $0,5 d^{-1}$ para a constante K para o decaimento de coliformes no verão e de $0,03 d^{-1}$ para o decaimento de coliformes no inverno em um sistema na lagoa de Utah (EPA, 1986).

2.3.2. Cinética de inativação na presença de desinfetantes

Nos casos em que a morte natural dos microrganismos não é suficiente para evitar a ingestão de patogênicos pelo homem pode-se realizar a desinfecção da água residuária antes do lançamento. A destruição dos microrganismos pelo desinfetante não é instantânea. A desinfecção é função de fatores físicos, químicos e bioquímicos e embora o modelo cinético de desinfecção seja simples, as condições específicas de cada processo podem alterar o modelo (EPA, 1986).

A razão de destruição de microrganismos pode ser expressa por uma relação de 1ª ordem conhecida por Lei de CHICK; de acordo com a equação (1).

A constante 'K' depende do tipo de microrganismo, do tipo de desinfetante e do meio em que ocorre a desinfecção (AZEVEDO NETTO, 1987). Pode-se estabelecer uma relação entre a concentração do desinfetante e a constante de inativação dos microrganismos (EPA, 1986):

$$K = K' C^n \quad (3)$$

Onde:

C= concentração de desinfetante

n= coeficiente de diluição

K'= constante de velocidade corrigida, independente da concentração do desinfetante e da concentração de microrganismos

Uma relação entre a concentração de um desinfetante e o tempo requerido para destruir uma porcentagem de organismos pode ser expressa por (NETTO, 1987):

$$C^n \times t = \text{constante} \quad (4)$$

Onde:

C= concentração de desinfetante

n= constante (função do tipo de desinfetante)

t= tempo requerido para destruir uma porcentagem de microrganismos

O processo de desinfecção é influenciado pela temperatura. Essa influência pode ser avaliada pela equação de Arrhenius (EPA, 1986):

$$K_t' = K_{20}' B^{(T-20)} \quad (5)$$

K_t' : constante de velocidade na temperatura T

K_{20}' : constante de velocidade a 20°C

B: constante empírica

Podem ocorrer desvios da lei de CHICK durante o processo de desinfecção (Figura 2.1). Podem ocorrer casos em que a taxa de inativação decresce progressivamente, o que pode ser explicado pelas diferenças de sensibilidade dos organismos presentes, pela presença de sólidos que protejam os microrganismos da desinfecção ou pelo aumento da resistência ao desinfetante com o tempo (CERF, 1977). Um outro caso que pode ocorrer é o aumento da taxa de inativação com o tempo pois os microrganismos podem ser danificados pela ação do desinfetante antes de sua morte ou pode ocorrer difusão do desinfetante na camada microbiana antes da inativação (EPA, 1986).

$\text{LN}(N/N_0)$

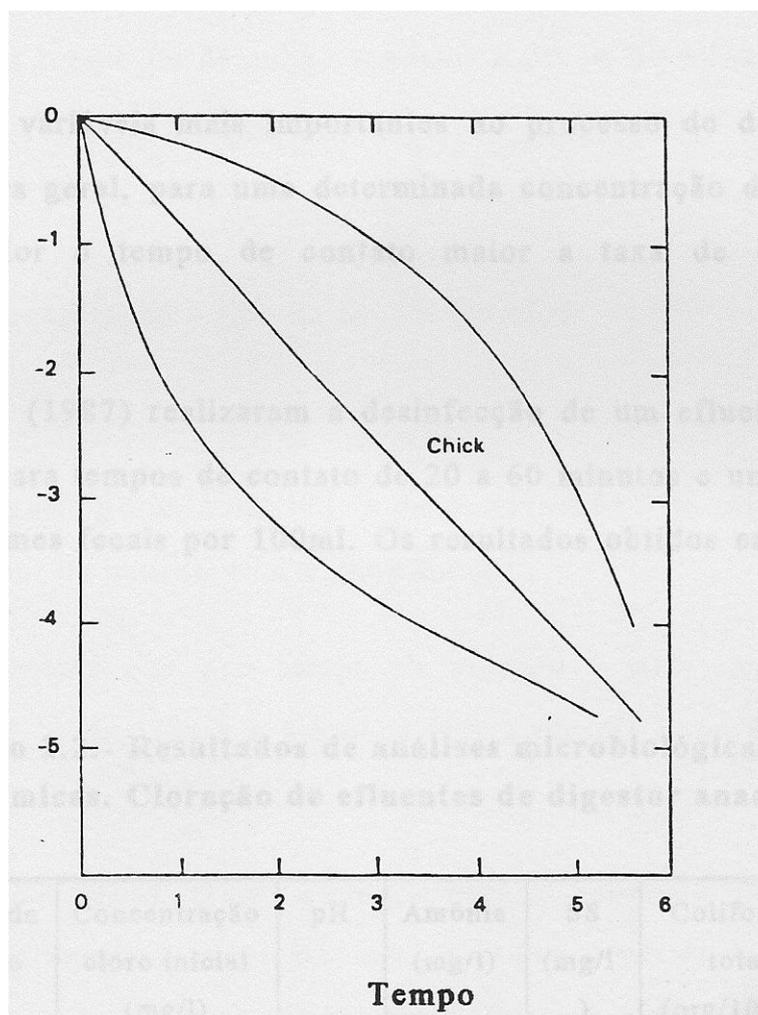


Figura 2.1. Desvios da Lei de CHICK

Fonte: EPA, 1986.

2.3.3. Fatores que influenciam a eficiência da desinfecção

Os fatores que influem da eficiência da desinfecção são: o tempo de contato, a concentração ou intensidade e o tipo de desinfetante, temperatura, número de organismos, tipos de organismos, natureza do meio (METCALF & EDDY, 1979).

2.3.3.1. Tempo de contato

É uma das variáveis mais importantes no processo de desinfecção. De uma maneira geral, para uma determinada concentração de desinfetante, quanto maior o tempo de contato maior a taxa de destruição dos organismos.

GASI et al. (1987) realizaram a desinfecção de um efluente de digestor anaeróbio para tempos de contato de 20 a 60 minutos e um teor de $1,7 \times 10^7$ coliformes fecais por 100ml. Os resultados obtidos encontram-se no Quadro 2.2.

Quadro 2.2.- Resultados de análises microbiológicas e físico-químicas. Cloração de efluentes de digestor anaeróbio.

Ensaio	Tempo de contato (min)	Concentração cloro inicial (mg/l)	pH	Amônia (mg/l)	SS (mg/l)	Coliformes totais (org/100 ml)	Coliformes fecais (org/100 ml)
01	20	5	7.57	46.5	95	3.0×10^4	110
02	30	5	8.11	42.5	60	8.0×10^3	2
03	40	5	7.84	-	95	1.7×10^3	26
04	60	5	8.39	-	120	8.0×10^3	23
05	20	10	7.50	-	110	8.0×10^3	< 2
06	30	10	7.70	-	65	1.3×10^3	< 2
07	40	10	7.67	47.5	55	70	< 2
08	60	10	7.70	-	115	280	< 2
09	20	15	7.65	42.5	95	1.3×10^3	< 2
10	30	15	8.12	-	100	280	< 2
11	40	15	7.48	36.0	95	77	< 2
12	60	15	7.56	-	115	280	< 2

Fonte: GASI et al, 1987.

De uma maneira geral, os autores de trabalhos sobre desinfecção de esgotos com cloro recomendam uma mistura perfeita de cloro na massa líquida e um tempo de detenção superior a 30 ou 60 minutos (CAMPOS, 1993).

2.3.3.2. Concentração e tipo de agente químico

De uma maneira geral, a eficiência da desinfecção está relacionada com a concentração; de acordo com a equação (4).

Se 'n' for maior que 1 o tempo de contato é mais importante que a dosagem, se 'n' for igual a 1 ambos têm a mesma importância (FAIR et al., 1948).

Segundo FEACHEM et al. (1983), para a cloração de esgotos com tratamento primário é necessária uma dosagem superior a 10 mg/l para se alcançar uma densidade de coliformes menor que 100 / 100ml.

2.3.3.3. Intensidade e natureza do agente físico

Quando se utiliza um agente físico como desinfetante a eficiência será função da intensidade e a intensidade será refletida na constante 'K' através de alguma relação funcional.

A inativação de microrganismos por radiação ultravioleta segue a lei de CHICK (DANIEL & CAMPOS, 1993):

$$N = N_0 \cdot e^{-kIt} \quad (6)$$

Onde:

N= densidade de microrganismos efluente (Nº organismos/100 ml)

N₀= densidade de microrganismos afluentes (Nº organismos/100 ml)

I= intensidade da radiação ultravioleta a 254nm (mW/cm²)

t= tempo de exposição (s)

2.3.3.4. Temperatura

O efeito da temperatura na taxa de mortalidade pode ser representado pela equação de Van't Hoff - Arrhenius (EPA, 1986):

$$\ln (t_1 / t_2) = [E (T_2 - T_1)] / (RT_2T_1) \quad (7)$$

Onde:

t₁, t₂: tempo requerido para uma determinada porcentagem de mortes, nas temperaturas T₁, T₂.

E: energia de ativação (J / mol)

R: constante dos gases (8,314 j / mol)

O aumento da temperatura, geralmente, provoca uma morte mais rápida dos organismos (METCALF & EDDY, 1985).

2.3.3.5. Número de organismos

De uma maneira geral, quanto maior a concentração de microrganismos, maior o tempo necessário para uma determinada eficiência de desinfecção (METCALF & EDDY, 1979):

$$C^q N_p = \text{constante} \quad (8)$$

Onde:

C: concentração de desinfetante

q: constante (função da força do desinfetante)

N_p: concentração de organismos eliminados para um determinado tempo

A aglomeração de organismos pode criar uma barreira à penetração do desinfetante (AZEVEDO NETTO, 1987).

2.4. DESINFECÇÃO COM CLORO

2.4.1. Histórico

A primeira obtenção de cloro gasoso foi realizada, em 1774, através da reação de dióxido de manganês com ácido clorídrico. Entretanto, somente em 1815 o cloro foi aceito como elemento químico.

A primeira aplicação do cloro na saúde pública ocorreu através do seu uso como agente profilático durante a epidemia de cólera na Europa em 1831 (EPA, 1986). Entretanto, somente em 1884 realizou-se a cloração de águas residuárias na Inglaterra.

Pesquisas sistemáticas para a verificação da eficiência do cloro na desinfecção de águas residuárias foram desenvolvidas no início do século XX. PHELPS (1909) conduziu estudos de laboratório e de campo que demonstraram que uma dosagem de vários miligramas por litro de cloro e um tempo de contato de 15 minutos resultavam em uma redução eficiente de microrganismos, não ocorrendo, no entanto, a eliminação completa dos microrganismos. O grupo coliforme foi utilizado como indicador da eficiência de desinfecção devido à sua sensibilidade equivalente ao bacilo tifóide na cloração de esgotos.

KELLERMAN et al. (1907) estimaram os custos de cloração em duas estações de tratamento como \$2,00 e \$4,25 / 1.000 m³.

WIGLEY (1919) concluiu que o tempo de contato mínimo, necessário ao processo de desinfecção era de 20 minutos.

Existe, atualmente, alguma resistência à utilização de cloro na desinfecção de águas residuárias devido à possibilidade de recrescimento das bactérias após a desinfecção (EPA, 1986), aos danos causados ao meio ambiente devido as elevadas concentrações de cloro residual, e ao efeito limitado sobre outros patogênicos, tais como vírus (RUDD & HOPKINSON, 1989).

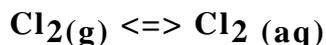
2.4.2. Química do cloro

2.4.2.1. Propriedades

O cloro elementar (Cl_2) é um gás de densidade maior que o ar na temperatura ambiente. Quando comprimido a pressões maiores que a sua pressão de vapor, ele condensa ocorrendo a liberação de calor e uma redução de volume. O cloro comercial é vendido em tanques pressurizados.

O hipoclorito de sódio e o hipoclorito de cálcio também são utilizados no processo de desinfecção. Este último é relativamente estável na forma sólida, sujeito a uma perda de 0,013%/dia. O hipoclorito de sódio é encontrado comercialmente em soluções com concentração de 1 a 16%. Na temperatura ambiente a vida média dessas soluções é de 60 a 1700 dias para soluções de 18 a 3% de cloro, respectivamente (EPA, 1986). Os hipocloritos de sódio e cálcio são mais utilizados em pequena escala, em casos onde há maior preocupação com a segurança do que com o custo (METCALF & EDDY, 1979).

A dissolução de cloro gasoso na água para formar cloro molecular dissolvido é expresso pela lei de Henry:



$$K_H (\text{mol} / \text{latm}) = [\text{Cl}_2(\text{aq})] / P_{\text{Cl}_2}$$

$$K_H = 6,2 \times 10^{-2}$$

Onde:

K_H = constante de Henry

P_{Cl_2} = pressão parcial da fase gasosa (atm)

$[\text{Cl}_2(\text{aq})]$ = concentração molar

O cloro é utilizado na desinfecção de águas residuárias e de abastecimento como agente oxidante e desinfetante. As principais aplicações do cloro como agente oxidante são:

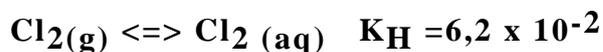
- remoção de cor, odor e gosto no tratamento de água, através de oxidação de compostos orgânicos;
- oxidação de Fe (II) e Mn (II) em águas;
- oxidação de cianeto em efluentes industriais;
- controle de odor, oxidação de sulfeto, remoção de amônia em águas residuárias.

Como agente desinfetante, o cloro pode ser aplicado para desinfecção de águas residuárias e águas de abastecimento. Pode ser utilizado também na desinfecção seletiva para o controle de microrganismos filamentosos no processo de lodos ativados. Além disso, é muito utilizado como desinfetante em piscinas (SNOYEINK & JENKINS, 1980).

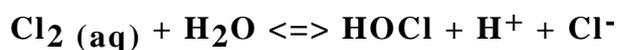
Toda água distribuída deve ser desinfetada e apresentar residual de cloro nos pontos de consumo, de forma a destruir pequenas concentrações de microrganismos que venham a penetrar no sistema. Se a contaminação é elevada, a ausência de residual serve como indicativo (AZEVEDO NETTO, 1987).

2.4.2.2. Reação com a água

Quando se adiciona o cloro à água, tanto na forma gasosa como na líquida, ele reage, ocorrendo reações de hidrólise e ionização:



Se o cloro estiver na forma gasosa, ele irá se dissolver na água, seguindo a lei de Henry. O cloro aquoso reage então com a água, através de uma reação de oxi-redução, originando o ácido hipocloroso e ácido clorídrico, que estará completamente dissociado em soluções aquosas diluídas (SNOYEINK & JENKINS, 1980):



A constante de equilíbrio da reação é dada por:

$$K = \{[\text{HOCl}] [\text{H}^+] [\text{Cl}^-]\} / [\text{Cl}_2] = 4,5 \times 10^{-4} \text{ a } 25^\circ\text{C}$$

A cinética dessa reação é extremamente rápida e a extensão da reação diminui para menores valores de pH e maiores salinidades (EPA, 1986).

O ácido hipocloroso, sendo um ácido fraco, irá se dissociar de acordo com sua constante de equilíbrio e as concentrações das espécies de cloro serão função do pH:



Para valores de pH abaixo de 7,5, há a predominância do HOCl, enquanto que para valores de pH acima de 7,5, o OCl⁻ é a espécie dominante. A quantidade de HOCl e OCl⁻ é denominada cloro residual livre. Na desinfecção, o pH é importante para a eficiência do processo, pois o HOCl é um desinfetante 40 a 80 vezes mais efetivo que o OCl⁻ (METCALF & EDDY, 1979).

Todas as constantes de equilíbrio são funções da temperatura MORRIS (1966) estabeleceu uma correlação entre a constante de equilíbrio e a temperatura (°K):

$$\ln(K) = 23,184 - 0,0583T - 6808 / T \quad (9)$$

O cloro pode ser adicionado na forma de sais de hipoclorito, dando origem a outras reações de equilíbrio:



A adição de cloro gasoso abaixa a alcalinidade do meio devido à produção de ácido forte e HOCl. Entretanto, quando se adiciona cloro na forma de sais de hipoclorito, ocorre um aumento da alcalinidade, no caso da adição de hipoclorito de cálcio, ocorrerá também um aumento na dureza da água (SNOYEINK & JENKINS, 1980).

2.4.2.3. Demanda de cloro

O cloro adicionado à água é consumido pelos inúmeros constituintes presentes ou por decomposição. A diferença entre a dosagem de cloro e o cloro residual é denominada demanda de cloro.

A demanda de cloro é causada por (EPA, 1986):

- reações promovidas pela luz ultravioleta, que são o principal fator para a perda de cloro em águas de piscina;
- reações com compostos inorgânicos (Mn, Fe, NO_2^- , S^{2-}) que consomem cloro por reações redox;
- reações com compostos orgânicos, contendo ligações insaturadas que reagem para formar moléculas orgânicas cloradas;
- reações com amônia para formar cloraminas, pela substituição de um próton por um átomo de cloro.

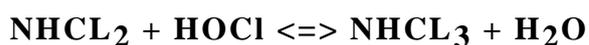
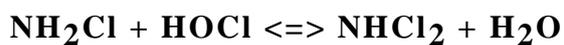
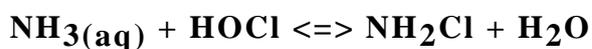
Dentre as reações citadas, a mais importante é a reação do cloro com a amônia, formando cloraminas e eventualmente oxidando amônia a nitrogênio gás ou a uma variedade de compostos de nitrogênio (Quadro 2.3).

Quadro 2.3. Compostos formados pela oxidação da amônia pelo cloro

Cl₂ reduzido / N-NH₃oxidado		
Composto	Razão molar	Razão em massa
N ₂ H ₄	0.5	2.54
NH ₂ OH	1.0	5.07
N ₂	1.5	7.61
N ₂ O	2.0	10.10
NO	2.5	12.70
NO ²⁻	3.0	15.20
N ₂ O ₄	3.5	17.70
NO ³⁻	4.0	20.30

Fonte: SNOYEINK & JENKINS, 1980

A formação de cloraminas pode ser descrita pelas seguintes reações:



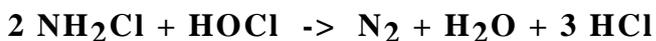
Os três compostos formados, monoclорamina (NH₂Cl), dicloramina (NHCl₂) e tricloramina (NHCl₃) são denominados cloro residual combinado. Juntamente com o cloro residual livre, compõem o cloro residual total da água. As cloraminas apresentam diferentes eficiências desinfetantes (LONGLEY, 1993):



A formação da cloramina é muito rápida para a amônia e outras aminas básicas. O tempo médio para a conversão de 1 mg Cl_2/l e 0,2 mg NH_3/l a monoclорamina em $\text{pH} = 7$ e temperatura de 25°C é de três segundos (WEIL & MORRIS, 1949). Aminoácidos, sendo compostos mais básicos que a amônia reagem mais rapidamente com o cloro (JENSEN & JOHNSON, 1989).

2.4.2.4. "Breakpoint"

A formação de cloraminas e oxidação de amônia se combinam criando uma única curva de residual de cloro em função da dosagem. A medida que a dosagem de cloro aumenta, o residual de cloro inicialmente aumenta até um máximo, no qual a relação entre a concentração molar de cloro ($[\text{Cl}_2]$) e o de amônia ($[\text{NH}_3]$) se iguala a 1. A partir deste ponto, um aumento na dosagem de cloro provoca uma diminuição no cloro residual, até que se atinge um valor mínimo, denominado dosagem do "breakpoint", e ocorre em uma razão molar de 1,5:1 a 2:1, dependendo das condições da solução. As reações responsáveis pelo desaparecimento das cloraminas são:



No "breakpoint" o cloro residual total é zero para a amônia, mas é diferente de zero para compostos orgânicos nitrogenados (JENSEN & JOHNSON, 1989).

Após o "breakpoint" um aumento na dosagem de cloro irá aumentar o valor de cloro residual livre.

WEBER (1940) realizou estudos sobre a dosagem de cloro em água residuária por um tempo de contato de trinta minutos e observou que a dosagem de 70 mg/l era suficiente para se atingir o "breakpoint" (figura 2.2).

GRIFFIN e CHAMBERLIN (1945) realizaram a cloração de águas residuárias e observaram que para tempos de contato de trinta minutos e duas horas não ocorria a curva de cloração com "breakpoint". Apenas para um tempo de 18 horas ocorreu formação do "breakpoint". Entretanto esse trabalho confirma a dosagem de 10 mg de cloro para 1 mg de amônia como dosagem para o "breakpoint" em esgotos primários e secundários.

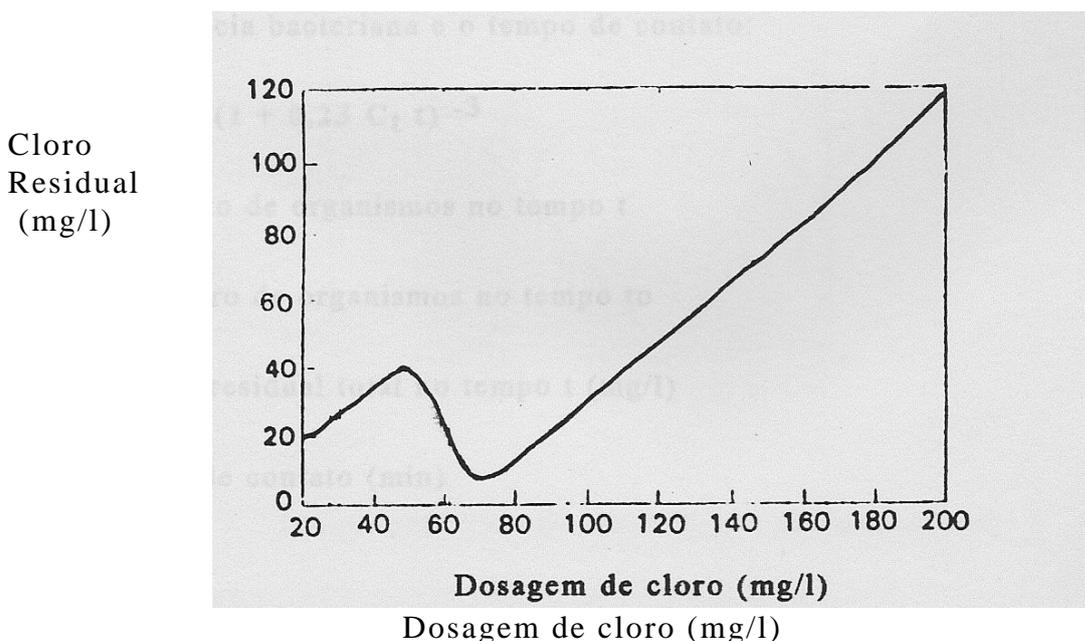


Figura 2.2. Curva de cloro residual em função da dosagem
Fonte: WEBER, 1940.

2.4.2.5. Eficiência da cloração

Quando se utiliza cloro para a desinfecção de águas residuárias, os principais fatores que se podem medir para determinar a eficiência do processo são o número de organismos presentes e o cloro residual para um determinado tempo de contato. O número de coliformes é o indicativo mais utilizado, podendo ser determinado através do método dos tubos múltiplos ou da contagem em placas.

Numerosos ensaios têm demonstrado que, quando os parâmetros físicos que controlam o processo de cloração são mantidos constantes, a eficiência da desinfecção, que pode ser medida através da sobrevivência bacteriana, depende do cloro residual e do tempo de contato ($C \times T$). A eficiência de desinfecção não se altera com o aumento de uma das variáveis e proporcional diminuição da outra.

METCALF & EDDY (1979) descreveram uma relação entre a sobrevivência bacteriana e o tempo de contato:

$$N_t / N_0 = (1 + 0,23 C_t t)^{-3} \quad (10)$$

N_t = número de organismos no tempo t

N_0 = número de organismos no tempo t_0

C_t = cloro residual total no tempo t (mg/l)

t = tempo de contato (min)

a. Compostos de cloro

De uma maneira geral, a predominância de ácido hipocloroso é desejável devido a maior eficiência de cloração que ele proporciona. Entretanto, a monocloramina, para um tempo de contato mais prolongado, proporciona a mesma eficiência desinfetante do ácido hipocloroso (figura 2.3).

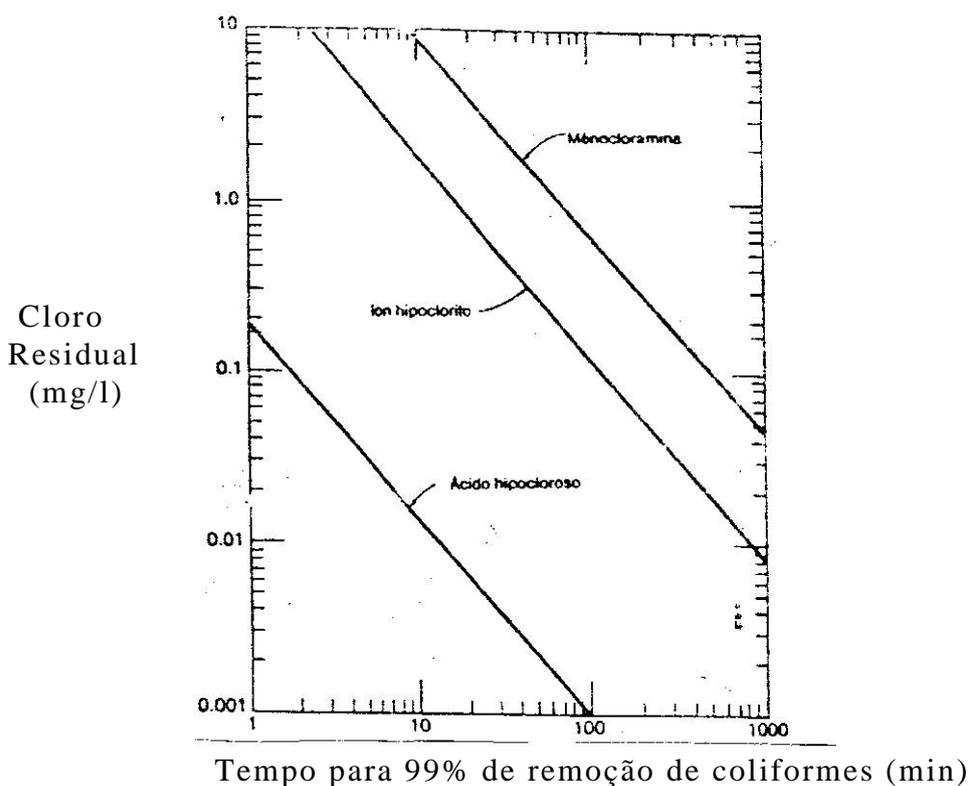


Figura 2.3. Eficiência desinfetante do ácido hipocloroso e monocloramina.

Fonte: METCALF & EDDY, 1979.

Inúmeros pesquisadores têm procurado avaliar a real necessidade de se utilizar cloro livre no processo de desinfecção. RIDEAL segundo WOLF et al. (1984) foi o primeiro a observar a eficiência germicida das cloraminas. Ele observou que a desinfecção ocorria em duas etapas, a fase inicial correspondia ao desaparecimento rápido do cloro livre e a fase seguinte ao processo de formação de cloraminas orgânicas e inorgânicas. Em 1917 foi construída a primeira unidade de tratamento utilizando cloraminas, no Canadá. As cloraminas demonstraram ser mais estáveis que o cloro livre no sistema de distribuição e foram muito mais efetivas na redução do desenvolvimento de algas em reservatórios e na prevenção do crescimento de bactérias no sistema de distribuição (GOEHRING, 1931). Uma outra vantagem das cloraminas seria o menor custo de aplicação e manutenção do sistema (VOGT & REGLI, 1981).

BUTTERFIELD (1943) foi um dos primeiros a observar que a eficiência bactericida das cloraminas é influenciada pelas condições de alto pH e baixa temperatura. A inativação da *E.coli* em pH=7, nas temperaturas de 20-25°C, e com 1,2 mg NH₂Cl / litro de solução é 60 vezes mais rápida do que em pH = 9,5 e entre 2 e 6°C. ESPOSITO (1974) demonstrou que a inativação de *E.coli* aumentava consideravelmente com a diminuição do pH, que favorece a formação de dicloramina.

Em relação à inativação de vírus, as cloraminas requerem um tempo maior ou concentrações mais elevadas do que o cloro livre (WOLFE et al., 1984). TRASK et al. (1945) observaram que a inativação de vírus Theiler's demandaria 5,4 mg/l de cloramina e trinta minutos de tempo de contato em contraste com 1,32 mg/l de cloro livre e um tempo de dez minutos.

KELLY & SANDERSON (1960) investigaram a eficiência desinfetante de cloraminas em poliovírus 1, poliovírus 2, poliovírus 3, cosackievírus B₁ e

B₅. Os resultados obtidos indicam que uma concentração de 0,67 a 1,0 mg/l de cloramina requer 2-8 horas de contato, para inativação em pH neutro a 25°C, em contraste com 0,2-0,35 mg/l de Cl₂, que requerem 4-16 minutos de tempo de contato.

Mais recentemente, MITCHAM et al. (1983) observaram que cloraminas eram tão eficientes quanto o cloro livre na redução de níveis de *E.coli*, estreptococos e vírus entéricos. Foi observado, também, que as cloraminas eram mais eficientes que o cloro na inativação de certos crustáceos do zooplankton e a produção de trihalometanos observada foi inferior a de cloro. WOLFE et al. (1984) observaram que, em pH 6, 7 e 7,5 as taxas de inativação de *E.coli* com preamoniação da amostra de água eram comparáveis com a inativação devido a cloro livre.

b. Mistura

Recentemente, tem sido demonstrada a importância da mistura no processo de desinfecção. Foi observado que a aplicação de cloro em um regime altamente turbulento, com número de Reynolds da ordem de 10⁴, conduz a uma inativação superior à conseguida pela adição de cloro separadamente a um reator de mistura completa. Apesar de se saber da necessidade de mistura, não se sabe o nível ótimo de turbulência.

Uma forma de se medir o grau de mistura é o gradiente de velocidade (LONGLEY, 1978):

$$G = [P / (u V)]^{1/2} \quad (11)$$

G= gradiente de velocidade (s⁻¹)

P = potência requerida ($N\ m/s$)

V = volume do canal de mistura (m^3)

μ = viscosidade do fluido ($N\ s/m^2$)

WHITE (1986) estabelece um gradiente de velocidade mínimo de 500 a $1.000\ s^{-1}$ para se alcançar um teor de coliformes de 23,2 por 100 ml, na desinfecção de águas residuárias.

VENOSA (1983) realizou pesquisas utilizando dois misturadores estáticos ($G = 875\ s^{-1}$ e $G = 115\ s^{-1}$). A performance dos misturadores foi avaliada através da eficiência de remoção de coliformes e observou-se melhores resultados no reator com melhores condições de mistura.

c. Tempo de contato

Em águas residuárias a diferenciação entre cloro livre e cloro combinado geralmente não é utilizada pois, muitas vezes não é economicamente viável adicionar cloro suficiente para se atingir o "breakpoint" e obter-se cloro residual livre, que é mais eficiente na desinfecção. Recomenda-se para este caso um aumento no tempo de contato (METCALF & EDDY, 1979; EPA, 1986).

O Departamento de Serviços de Saúde da Califórnia recomenda um tempo de contato mínimo de trinta minutos para fluxo máximo em um tanque de contato tipo "plug-flow". Plantas com menores tempos de contato apresentam dificuldades em atender aos padrões de desinfecção e utilizam dosagens elevadas de cloro (SEPP, 1981).

d. Características da água residuária

SUNG (1974) estudou a influência dos compostos presentes em águas residuárias tratadas e não tratadas, no processo de desinfecção. Compostos orgânicos e compostos com anéis policíclicos interferem no processo, impedindo-se de utilizar o cloro residual total como medida da eficiência bactericida, pois os compostos orgânicos insaturados reagem com cloro e são detectados na análise de cloro residual total sem exercer poder desinfetante. Para se realizar desinfecção na presença de compostos orgânicos é necessário adicionar maior dosagem de cloro ou tempos de contato mais elevados. Os resultados desse trabalho permitem concluir que a diferente natureza dos compostos presentes é o principal fator a influenciar a dosagem de cloro necessária para a desinfecção. Além disso, a aderência de bactérias ao material particulado protege os organismos do cloro (PELLETIER, 1988).

e. Características dos microrganismos

Uma outra variável importante no processo de cloração é a idade e o tipo de microrganismo. Um cultivo bacteriano jovem (1 dia ou menos) com uma dosagem de cloro de 2 mg/l necessita de um minuto para redução significativa do número de bactérias. Se o cultivo bacteriano apresentar dez dias ou mais, são necessários trinta minutos para a mesma redução. Uma explicação para esse fenômeno seria a resistência oferecida pela envoltura

de polissacarídeo que se desenvolve em organismos à medida que envelhecem. Evidências sobre a desinfecção de vírus e *Escherichia coli* demonstram a necessidade de adicionar cloro além do "breakpoint" para obtenção de cloro livre e destruição do vírus (METCALF & EDDY, 1979).

Comparações da resistência relativa de diferentes grupos de organismos a desinfetantes alternativos indicam que a resistência segue a ordem:

bactéria < vírus < esporos < cistos

As bactérias são o grupo mais suscetível ao ataque de desinfetantes. Vírus são mais resistentes que as bactérias pois são menores e ficam protegidos através do encapsulamento nos sólidos. Além disso, são imunes a interferência metabólica. Esporos e cistos apresentam adaptação fisiológica para sobrevivência em condições desfavoráveis, apresentando grande resistência ao ataque químico (RUDD & HOPKINSON, 1989).

Diversos estudos comprovam que *E.coli*, *Salmonella ssp.*, *Shigella ssp.* e outras bactérias são removidas com eficácia para concentrações de cloro livre de 0,10-0,30 mg/l em águas residuárias. Os vírus exigem maior tempo de contato e nível de cloro residual mais elevado (BASTOS, 1993).

2.4.2.6. Metodologias para determinação de cloro residual

Não é apresentada a aplicabilidade das metodologias da bibliografia especializada (STANDARD METHODS, 1992) para a determinação de cloro residual em amostras de fezes e vômitos. Em tese, poderiam ser utilizadas as mesmas metodologias aplicáveis a esgotos domésticos, embora não sejam

conhecidos os efeitos da elevada turbidez e da alta concentração de matéria orgânica encontradas em fezes diluídas e vômitos. Estes dois fatores (turbidez e concentração de matéria orgânica) influem decisivamente na escolha do método para determinação de cloro residual, devido às dificuldades encontradas na determinação do ponto final das titulações (viragem colorimétrica) e à demanda de cloro com subsequente formação de cloraminas. Apresenta-se, a seguir, um breve resumo das principais metodologias de uso potencial na pesquisa.

a. Método da titulação amperométrica

Para a determinação de cloro residual em amostras que apresentem cor, turbidez, ferro, manganês ou nitrato, a bibliografia especializada recomenda o método de titulação amperométrica, pois o mesmo não sofre interferência destes parâmetros (STANDARD METHODS, 1992), além de poder ser considerado um método padrão para análises laboratoriais de rotina (GORDON et al., 1988). Embora o método da titulação amperométrica seja o mais indicado para estes casos específicos, algumas pesquisas revelam a interferência de monocloraminas e cloraminas orgânicas na determinação de cloro livre por este método, especialmente para altas temperaturas e tempos de titulação prolongados (JENSEN & JOHNSON, 1990a; RAM & MALLEY, 1984).

O método envolve a titulação de um halogênio ativo, utilizando-se um agente redutor (óxido de fenilarsina) de normalidade conhecida (0,00564 N), com aplicação de voltagem constante, da ordem de 200 mV (JENSEN & JOHNSON, 1989). A sensibilidade do método para o cloro residual livre

aumenta com a diminuição da voltagem aplicada. O ponto final da titulação é determinado com o auxílio de um eletrôdo combinado de platina, conectado a um micrômetro. O titulante deve ser adicionado até o ponto em que a leitura do aparelho permanecer constante.

O método possibilita a determinação tanto do cloro livre como do cloro combinado. Para a determinação do cloro livre a titulação deve ser realizada em pH neutro (6,5 a 7,5), faixa na qual a monoclорamina reage lentamente. Já a determinação de cloro combinado deve ser realizada na faixa de pH compreendida entre 3,5 e 4,5 (STANDARD METHODS, 1992).

b. Método DPD

O método DPD é recomendado para amostras que apresentem quantidades significativas de matéria orgânica. A interferência de altas concentrações de monoclорaminas pode ser eliminada pela adição de diacetamida imediatamente após a mistura da amostra com os reagentes (STANDARD METHODS, 1992). Segundo JENSEN & JOHNSON (1990b), a monoclорamina interfere lentamente na medida do cloro residual livre, representando pouca ou nenhuma interferência para leituras realizadas em intervalos de tempos inferiores a um minuto.

O método consiste na utilização de n,n-dietil-p-fenilenediamina (DPD) como indicador no procedimento de titulação com sulfato ferroso amoniacal. Na ausência de íon iodeto, o cloro livre reage instantaneamente com o indicador DPD produzindo uma cor vermelha.

A adição de iodeto provoca a formação de coloração vermelha devido à monocloramina. A adição de íon iodeto em excesso provoca a coloração devido à dicloramina. A titulação é realizada em $\text{pH} = 6,2$ devido à adição de tampão fosfato à solução de DPD. A presença de cloreto de mercúrio no tampão diminui a interferência da monocloramina (STRUPLER, 1985). A taxa de interferência da monocloramina aumenta cerca de 20% quando o cloreto de mercúrio não é adicionado ao tampão fosfato (JENSEN & JOHNSON, 1989).

Este método permite tanto a determinação do cloro livre quanto do cloro combinado.

c. Método do potencial de oxi-redução

como método opcional para se determinar o cloro residual livre pode-se citar o método que utiliza a medição do potencial de oxi-redução (ORP) *on line* através de aparelho controlador de pH e ORP. O método consiste na medição de pH e potenciais de oxi-redução, sendo a determinação do cloro residual livre conseguida através de ábacos. O método fornece o valor de cloro residual livre sem a necessidade de se titular a amostra (WALLACE & TIERNAN, 1991).

Estudos realizados por GORDON et al. (1988) mostraram uma diferença significativa entre os resultados da titulação amperométrica e dos eletrodos de membrana. No trabalho publicado pelos autores é levantada a possibilidade de que os resultados conseguidos com os eletrodos de membrana correspondessem ao cloro livre, enquanto que os da titulação

amperométrica englobariam o somatório do cloro livre e do cloro combinado.

2.5. OUTROS MÉTODOS DE DESINFECÇÃO

A desinfecção pode ser realizada através de agentes químicos, agentes físicos e meios mecânicos. Os desinfetantes mais utilizados são os produtos químicos oxidantes, especialmente o cloro (METCALF & EDDY, 1979; AZEVEDO NETTO, 1987). Entretanto, os efeitos tóxicos da presença de cloro residual na vida aquática, especialmente sobre peixes e macroinvertebrados (VENOSA, 1983), e a formação de compostos supostamente cancerígenos durante a desinfecção de águas de abastecimento (SNOYEINK & JENKINS, 1980), tornou necessária a pesquisa de métodos alternativos de desinfecção.

Dentre os métodos alternativos mais utilizados podem-se citar a desinfecção com ozônio e a radiação ultravioleta (VENOSA, 1983; EPA, 1986).

2.5.1. Agentes químicos

Dentre os compostos químicos utilizados atualmente podem-se citar:

- ozônio
- compostos de cloro (ClO_2)
- ácido peracético
- iodo

- bromo
- cloreto de bromo
- metais pesados e seus compostos
- tensoativos
- álcalis e ácidos

2.5.1.1. Ozônio

O ozônio é um gás incolor de cheiro acre. É uma forma alotrópica do oxigênio onde três átomos do elemento oxigênio combinam-se, formando ozona (O_3). É um composto instável, que se decompõe lentamente em O_2 , devendo ser produzido no local de uso.

O ozônio vem sendo utilizado desde 1903 no tratamento de água potável, tendo como origem a França (Nice). Na Europa, se tornou o principal processo de desinfecção, em 1980 havia mais de 1100 instalações deste tipo (OLIVIERI & RIBEIRO, 1993). Na Rússia é um processo bastante empregado (AZEVEDO NETTO, 1987).

Apresenta um potencial de oxidação elevado (2,07 volts), sendo este valor inferior apenas ao Flúor (2,87 volts). Esta propriedade reflete a sua alta capacidade de desinfecção. O gás pode ser detectado em concentrações mínimas de 0,01 ppm. (OLIVIERI & RIBEIRO, 1993)

A produção de ozônio é realizada de maneira mais eficiente através da técnica de descarga elétrica, que envolve a passagem de ar ou oxigênio

através de eletrodos espaçados entre si, utilizando-se elevada voltagem (STOVER & JARNIS, 1986). A utilização de oxigênio como gás gerador é vantajosa em relação ao ar, devido ao maior rendimento na produção de ozônio; redução de custos de manutenção, operação e investimento inicial; obtenção de ozônio em concentrações mais elevadas e menor consumo energético (OLIVIERI & RIBEIRO, 1993).

A utilização de ozônio em tratamento de água está baseada na sua ação oxidante, que faz com que ocorra remoção de sabor, odor, cor, turbidez, metais pesados, melhoria da coagulação e decantação, controle de algas, remoção de compostos orgânicos. Além disso, o ozônio é um eficiente desinfetante para bactérias e vírus (OLIVIERI & RIBEIRO, 1993).

Teores de 0,3 mg/l de ozônio são suficientes para que ocorra sua ação desinfetante. Testes realizados com vírus da poliomelite tratados com residual de 0,45 mg/l de ozônio e 1,0 mg/l de cloro mostraram que os vírus eram inativados pelo ozônio em dois minutos, comparados com 1,5 a 3 horas quando se usou o cloro (AZEVEDO NETTO, 1987). Testes realizados com *Schistosoma mansoni* indicam a necessidade de uma concentração de 0,3 mg/l de ozônio em três minutos e 1 mg/l de cloro residual em quatro minutos.

A ação desinfetante do ozônio sobre a *Escherichia coli* é 3125 vezes mais rápida do que a do cloro, pois enquanto o ozônio atua pela destruição da parede celular, o cloro atua por difusão celular atacando as enzimas dos microrganismos, necessitando maior tempo de contato para a desinfecção (OLIVIERI & RIBEIRO, 1993).

Em amostras de esgoto, o ozônio pode ser vantajoso, pois se decompõe em oxigênio após a aplicação, aumentando o nível de oxigênio dissolvido no

efluente tratado (EPA, 1986). A presença de residual de ozônio pode ser prejudicial à vida aquática, pois a ozonização produz compostos tóxicos e carcinogênicos, mas pouco se sabe sobre esses produtos (STOVER, 1983). Entretanto, como o ozônio se dissipa rapidamente, geralmente não se encontra residual no corpo d'água (EPA, 1986).

2.5.1.2. Dióxido de Cloro

O dióxido de cloro, tem sido usado para desinfetar água potável, especialmente quando esta contém fenóis ou outros compostos causadores de cor e odor.

A descoberta do dióxido de cloro, produzido através da reação de cloreto de potássio com ácido clorídrico foi realizada em 1811 (MILLER, 1978). Entretanto, a utilização do produto só se tornou mais efetiva com o início da fabricação industrial do cloreto de sódio.

Na Europa, o dióxido de cloro é utilizado como desinfetante em cerca de 500 estações de tratamento de água potável. Nos Estados Unidos, havia, em 1977, 84 estações de tratamento de água utilizando dióxido de cloro (MILLER, 1977).

O dióxido de cloro é considerado um radical livre estável. Em altas concentrações ele reage violentamente com agentes redutores. Logo, a síntese do composto gasoso deve ser realizada em uma corrente gasosa diluída (NOACK & DOERR, 1979). Apresenta um ponto de ebulição de 11°C na pressão atmosférica.

A solubilização do ClO_2 gasoso na água obedece a lei de Henry. Em condições alcalinas ocorre perda de ClO_2 , de acordo com a equação (GORDON, 1972):



O aumento de pH diminui a concentração de ClO_2 . Mesmo em pH neutro, na temperatura ambiente, na ausência de carbonato, a meia vida de soluções de ClO_2 de 0,01; 0,001 e 0,0001 mol / litro é de 0,5, 4 e 14 horas, respectivamente. Logo a solução não deve ser armazenada (GORDON, 1972).

O dióxido de cloro pode ser produzido pela oxidação de um composto de menor valência, ou pela redução de um composto mais oxidado. No processo de tratamento de esgoto o ClO_2 é gerado exclusivamente a partir de cloreto (GORDON, 1972).

Como vantagens da utilização do dióxido de cloro, pode-se citar o fato deste não reagir com a amônia e a reduzida formação de compostos orgânicos halogenados, além de ser um virucida mais eficiente que o cloro. Entretanto, não tem sido muito aproveitado como desinfetante de águas residuárias devido ao alto custo e à necessidade de ser produzido no local onde será aplicado. Além disso, o sistema é mais complexo de operar que o sistema de cloração (EPA, 1986).

2.5.1.3. Ácido peracético

O ácido peracético tem sido utilizado como desinfetante em indústrias, especialmente na indústria de laticínios, mas só recentemente passou a ser

utilizado na desinfecção de águas residuárias (RUDD & HOPKISON, 1989). O ácido peracético se decompõe formando ácido acético.

É considerado um forte agente oxidante, podendo oxidar muitos compostos orgânicos e uma grande variedade de compostos inorgânicos. Pode ser considerado uma alternativa para desinfecção de esgotos. Entretanto, é menos eficiente para desinfecção de microrganismos mais resistentes, tais como vírus, e apresenta custos de operação mais elevados (RUDD & HOPKINSON, 1989).

2.5.1.4. Iodo

O iodo foi utilizado inicialmente em 1920, na tentativa de combater o bócio. Em 1941, a Universidade de Harvard desenvolveu um método de desinfecção utilizando-se iodo. Deste então, tem-se investigado a ação germicida do iodo (AZEVEDO NETTO, 1987).

É um elemento sólido cristalino, não metálico e sublimável nas condições normais; quando aquecido produz vapores violetas tóxicos (AZEVEDO NETTO, 1987). Dependendo da temperatura a solubilidade varia de 200 a 400 mg/l. É o halogênio que apresenta menor potencial de oxidação (REIFF, 1993).

O iodo reage menos facilmente com compostos orgânicos e demais substâncias presentes na água, dessa forma mantém um residual efetivo no sistema de distribuição (REIFF, 1993). Em presença de água ocorrem as seguintes reações:



Assim como os outros halogênios, a eficiência do iodo na destruição de bactérias e protozoários aumenta com a diminuição do pH, entretanto, em relação aos vírus, a eficiência aumenta com o pH. Comparado com o cloro, há necessidade de maiores concentrações de iodo, para o mesmo efeito bactericida (AZEVEDO NETTO, 1987).

2.5.1.5. Bromo

Apresenta-se líquido na temperatura ambiente, é marrom avermelhado e apresenta um ponto de ebulição de 58,7°C. Na forma líquida produz queimaduras quando em contato com a pele. É muito solúvel na água e apresenta boas propriedades germicidas.

O bromo, da mesma forma que o cloro, reage com a amônia. Dessa forma ocorre a formação de bromaminas e bromo residual na água. A principal aplicação do bromo é na desinfecção de piscinas e águas industriais (AZEVEDO NETTO, 1987).

As principais vantagens da aplicação do bromo são a facilidade de manuseio, e menor periculosidade que o cloro e a maior eficiência das bromaminas em relação as cloraminas (AZEVEDO NETTO, 1987).

2.5.1.6. Cloreto de bromo

A existência de cloreto de bromo é conhecida desde 1826. Durante a Segunda Guerra Mundial, foi observada a eficiência do bromo como agente desinfetante. Entretanto, somente após o trabalho da Dow Chemical em 1973, surgiu interesse na utilização industrial do cloreto de bromo (EPA, 1986).

De uma maneira geral, as propriedades do BrCl são intermediárias entre as propriedades do bromo e do cloro. Entretanto, a solubilidade do composto excede a solubilidade dos dois elementos.

O cloreto de bromo forma bromaminas em presença de água que são eficientes desinfetantes em relação às cloraminas e apresentam tempo de vida mais curto. São necessários tempos de contato mais curtos e o impacto ambiental é menor. Pode ocorrer formação de compostos orgânicos bromados que podem ser tóxicos em concentrações elevadas (EPA, 1986).

2.5.1.7. Metais pesados e seus compostos

Alguns metais, como a prata e o cobre, apresentam ação bactericida e algicida. Em 1893, foi observado o desaparecimento de algas em águas contendo quantidades muito pequenas de prata finamente dividida.

As dosagens de prata indicadas para a desinfecção são de 25 a 75 ppb (partes por bilhão). A quantidade máxima permitida nos Estados Unidos é de 0,05 ppm. O uso da prata, atualmente, restringe-se a pequenas instalações e piscinas (AZEVEDO NETTO, 1987).

2.5.1.8. Tensoativos

Detergentes são compostos tensoativos que podem ser utilizados como desinfetantes, sendo os detergentes catiônicos os mais eficientes.

Outro exemplo de composto tensoativo são os compostos quaternários de amônia que incluem grande número de detergentes catiônicos. Esses compostos têm uma ação bactericida bastante forte em pH de 7,0 a 9,0. É utilizado na limpeza de piscinas e em torres de resfriamento. O uso desses compostos apresenta alto custo (70 vezes maior que o cloro) e possibilidade de toxidez e de causar gosto na água (AZEVEDO NETTO, 1987).

2.5.1.9. Álcalis e ácidos

A utilização de álcalis e ácidos no processo de desinfecção baseia-se no princípio de que a maioria das bactérias não sobrevive em meios muito ácidos ou alcalinos (METCALF & EDDY, 1979; AZEVEDO NETTO, 1987). Assim, deve-se manter o pH abaixo de três ou acima de onze para eliminação de organismos patogênicos (METCALF & EDDY, 1979).

2.5.2. Agentes físicos

Os desinfetantes físicos mais utilizados são a luz e o calor. O calor é utilizado em indústrias lácticas e de bebidas mas não pode ser aplicado a

grandes quantidades de água devido ao elevado custo (METCALF & EDDY, 1979)

2.5.2.1. Radiação ultravioleta

A luz é utilizada através da radiação ultravioleta, cuja ação germicida foi descoberta no final do século XIX. Inicialmente utilizada para a desinfecção do ar, produtos farmacêuticos e água de abastecimento, a partir de 1975 passou a ser aplicada para a desinfecção de efluentes secundários de esgotos sanitários (DANIEL & CAMPOS, 1993).

Atualmente, é a segunda tecnologia alternativa mais popular nos Estados Unidos, devido às melhorias em lâmpadas modernas, do espaço mínimo necessário para desinfecção, ausência de residual tóxico, excelentes propriedades bactericidas, simplicidade de operação, reduzidos tempos de contato e redução nos custos (VENOSA, 1983).

Estudos realizados na Inglaterra (AZEVEDO NETTO, 1987) demonstram que após a exposição de cercárias de *Schistosoma mansoni* por 4 a 8 segundos aos raios ultravioletas provocou inibição completa do seu desenvolvimento para a fase adulta.

O custo total do processo demonstrou ser competitivo com a cloração. Os principais fatores que afetam o custo do processo são o consumo de energia e a reposição das lâmpadas ultravioleta (EPA, 1986).

O mecanismo de ação da luz ultravioleta está relacionado com o ácido nucleico celular. A radiação ultravioleta atua no DNA dos microrganismos

produzindo dímeros, em sua maioria de timina, que impedem a duplicação normal do DNA, interrompendo o processo de reprodução celular (VENOSA, 1983; DANIEL & CAMPOS, 1993).

O comprimento de onda ótimo é de 265 nm, que além de causar danos celulares, coincide com a absorção máxima dos ácidos nucleicos.

Lâmpadas de vapor de mercúrio são ideais para o processo, apresentando 92% de emissão de luz em um comprimento de onda de 254 nm (VENOSA, 1983). Para este comprimento de onda, a radiação penetra na célula e é absorvida pelos ácidos nucleicos (EPA, 1986).

Pode ocorrer o fenômeno de fotoreativação de organismos expostos a comprimentos de onda entre 310 e 500 nm, entretanto a reativação nunca é completa e apenas uma fração dos organismos é recuperada (VENOSA, 1983). Em um processo de tratamento de efluente secundário foi observada a fotoreativação de coliformes, ocorrendo um máximo de reativação após três horas (WHITBY, 1984). O efluente deste sistema continha menos bactérias, especialmente patogênicos, que o efluente clorado.

Altas concentrações de sólidos suspensos, cor, turbidez e matéria orgânica solúvel na água podem reagir ou absorver a radiação ultravioleta reduzindo a eficiência da desinfecção (EPA, 1986). Microrganismos em presença de material suspenso são protegidos da inativação (QUALLS et al., 1983).

Estudos recentes demonstram que pode ocorrer absorção de radiação por constituintes oxidáveis presentes em esgoto, ocorrendo formação de micropoluentes (LEE et al., 1982). Entretanto, o nível de energia utilizado na desinfecção é muito baixo para que o efeito seja significativo.

A inativação dos microrganismos segue a lei de CHICK; de acordo com a equação 6. Entretanto, a lei de CHICK só é válida quando aplicada individualmente a cada grupo de microrganismos com a mesma sensibilidade à radiação ultravioleta (DANIEL & CAMPOS, 1993).

2.5.3. Agentes mecânicos

As bactérias podem ser eliminadas por meios mecânicos no processo de tratamento de águas residuárias. Na Quadro 2.4 estão indicados os rendimentos típicos de alguns processos (METCALF & EDDY, 1979).

Quadro 2.4. Eliminação e destruição de bactérias por diferentes processos de tratamento

PROCESSO	PERCENTUAL DE ELIMINAÇÃO
Grade grossa	0 - 5
Grade fina	10 - 20
Desarenadores	10 - 25
Decantador primário	25 - 75
Precipitação química	40 - 80
Filtros percoladores	90 - 95
Lodos ativados	90 - 98
Cloração de água residuária tratada	98 - 99
Lagoa de estabilização	99,999

ADAPTADO DE METCALF & EDDY (1979) & MENDONÇA (1990)

3. METODOLOGIA

3.1. DETERMINAÇÃO DE CLORO RESIDUAL EM AMOSTRAS COM ELEVADA TURBIDEZ E ALTA CONCENTRAÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA

3.1.1. Metodologia utilizada

A metodologia básica empregada no trabalho consistiu em se programar uma série de testes, que possibilitassem avaliar as dificuldades inerentes à aplicabilidade de cada um dos métodos para determinação do cloro residual. Os testes foram programados numa primeira fase para determinação de cloro residual em amostras de esgotos domésticos, e posteriormente, em amostras de fezes e vômitos de paciente coléricos.

Nesta primeira etapa dos trabalhos foram testadas três métodos para a determinação de cloro residual:

- a) Método DPD
- b) Método do potencial de oxi-redução (ORP)
- c) Método da titulação amperométrica

3.1.2. Características das amostras

Conforme mencionado anteriormente, os testes de determinação de cloro residual foram realizados em amostras de esgotos e fezes.

A amostra utilizada nos testes foi coletada junto ao interceptor de esgotos do córrego da Mata, em Belo Horizonte.

A partir dos resultados obtidos para a amostra de esgoto foram realizados testes confirmativos na amostra de fezes, que apresentava maior turbidez e uma concentração de matéria orgânica mais elevada, necessitando, portanto, de uma maior diluição da amostra. A amostra de fezes foi coletada de pacientes com diarreia, internados no Centro Geral de Pediatria em Belo Horizonte, no período de junho a agosto de 1993. As principais características das amostras de esgotos e fezes são apresentadas no Quadro 3.1.

Quadro 3.1. Características da amostra de esgoto

Parâmetro	Unidade	AMOSTRA	
		Esgotos	Fezes
Demanda Bioquímica de Oxigênio	mg/l	790	9000
Sólidos Totais	mg/l	504	-
Sólidos em Suspensão	mg/l	165	4500
Nitrogênio Amoniacal	mg/l	14,7	300
Nitrogênio Total	mg/l	18,0	360
Nitritos	mg/l	0,01	0,28
Nitratos	mg/l	0,15	1.0
Turbidez	NTU	150	1500
Coliformes fecais	NMP/100 ml	-	$2,4 \times 10^8$

Nota: As análises foram efetuadas de acordo com STANDARD METHODS (1991)

3.1.3. Testes realizados

Objetivando-se avaliar a aplicabilidade das metodologias testadas, sob os efeitos da turbidez e da concentração de matéria orgânica das amostras, foram realizados diversos testes, variando-se as dosagens de cloro, as diluições e os tempos de contato. O cloro foi aplicado na forma de hipoclorito de sódio a 5%.

3.1.3.1. Método DPD

Os testes com o método DPD foram realizados tanto para análises de cloro total como de cloro livre. As análises de cloro livre foram realizadas utilizando-se a modificação com tioacetamida, quando os tempos de titulação foram superiores a 1 minuto (JENSEN & JOHNSON, 1990). O Quadro 3.2 apresenta o resumo dos testes realizados.

Quadro 3.2. Resumo dos testes realizados para os Métodos DPD, ORP e de titulação amperométrica (amostra de esgotos)

Método DPD		Método ORP		Método Amperométrico e DPD	
Dosagem	Diluição	Dosagem	Diluição	Dosagem	Diluição
5	1:1	10	1:10	10	1:10
5	1:2	30	1:10	30	1:10
5	1:5	50	1:10	50	1:10
5	1:10	70	1:10	70	1:10
10	1:2	90	1:10	90	1:10
10	1:5	110	1:10	110	1:10
10	1:10	130	1:10	130	1:10
20	1:5	135	1:10	135	1:10
20	1:10	140	1:10	140	1:10
		145	1:10	145	1:10
		150	-	150	1:10
		170	-	170	1:10

3.1.3.2. Método do potencial de oxi-redução (ORP)

a. Testes com amostras de água destilada

Como método alternativo ao da titulação amperométrica foi utilizado um controlador de pH-ORP da WALLACE & TIERNAN (Figura 3.1. e 3.2). O aparelho consiste de um eletrodo de platina sensorex conectado a um

analisador de potencial de oxi-redução. O aparelho, inicialmente, foi calibrado com amostras de água destilada cujo teor de cloro residual livre foi obtido através do método DPD. Foram as seguintes as características da amostra de calibração utilizada:

- pH: 7,3
- cloro residual livre: 1,0 mg/l

Após a calibração do aparelho, foram realizadas análises de cloro residual para verificação da correlação entre os resultados dos métodos DPD e ORP, para água destilada.

b. testes com amostras de esgoto

A calibração do aparelho com água destilada não fornece bons resultados para análise de cloro residual em amostras de esgoto, dessa forma procedeu-se à calibração do aparelho utilizando-se amostra de esgoto. A calibração foi realizada de acordo com os procedimentos de calibração explicitados no manual de operação do aparelho (WALLACE & TIERNAN, 1991). O aparelho foi calibrado com amostra cujo teor de cloro residual livre foi obtido através do método DPD. Foram as seguintes as características da amostra de calibração:

- pH: 7,2
- diluição: 1:10
- cloro residual livre: 2,08 mg/l



Figura 3.1. Aparelho controlador de pH-ORP

Após a calibração do aparelho, foram realizadas leituras do potencial de oxi-redução de diversas amostras de esgoto, submetidas a diferentes dosagens de cloro, para um tempo de contato fixado em 30 minutos. O pH dessas amostras foi determinado através de pHmetro Micronal B-374. (Figura 3.1.)

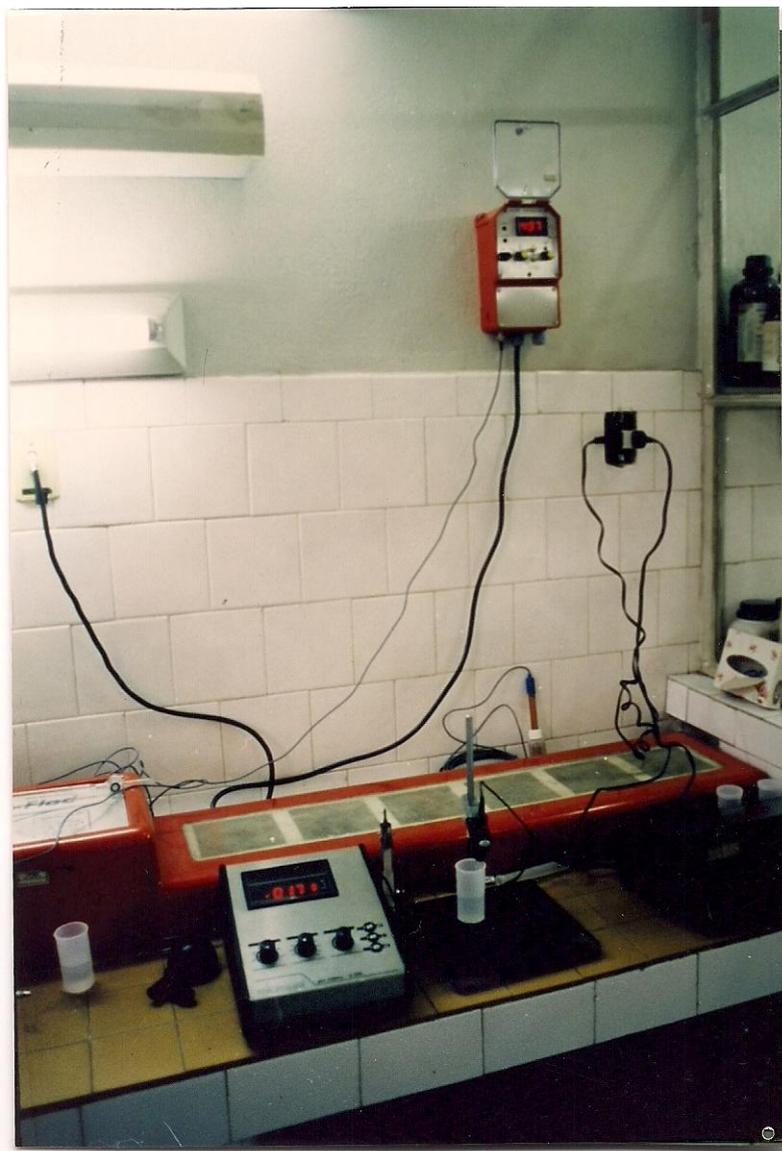


Figura 3.2. Aparelho controlador de pH-ORP e pHmetro

De posse dos valores de pH e ORP, foram determinadas as concentrações de cloro livre das amostras de esgotos com o auxílio do ábaco apresentado na Fig. 3.3. O Quadro 3.2 apresenta o resumo dos testes realizados.

ORP

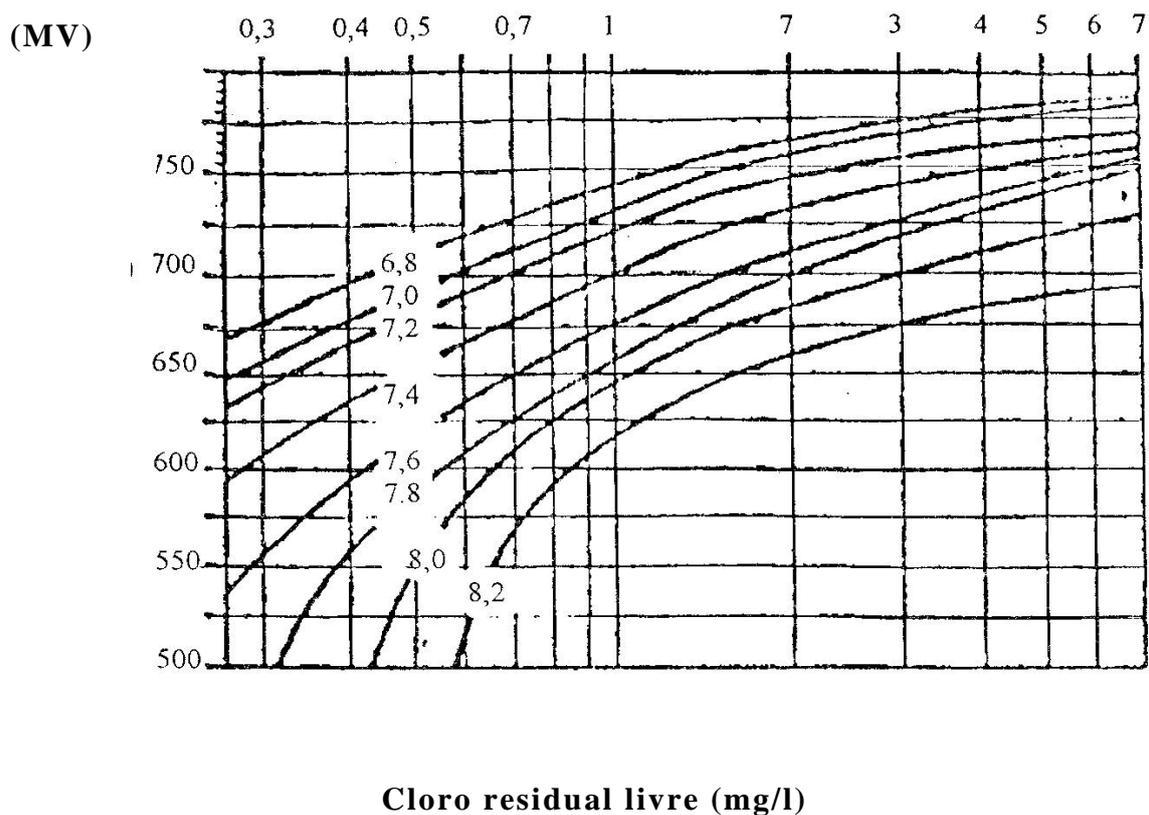


Figura 3.3. Curvas de Controle de pH

Fonte: WALLACE & TIERNAN, 1991.

3.1.3.3. Método da titulação amperométrica

Esse método permite a determinação de cloro residual total e livre. Logo, foram realizados testes para comparação com os demais métodos de acordo com o Quadro 3.2.

3.1.4. Testes realizados na amostra de fezes

A partir dos resultados obtidos para a amostra de esgoto, optou-se pela utilização do método DPD para a amostra de fezes. A escolha do método DPD ocorreu devido à demora na importação de reagentes para o método da titulação amperométrica, à maior simplicidade do método e à boa correlação com o método ORP e da titulação amperométrica conforme pode-se observar na Figura 4.1. No quadro 3.3 estão representados os testes realizados em amostra de fezes, para determinação da diluição mais adequada.

Quadro 3.3. Testes realizados em amostra de fezes, utilizando-se o método DPD

Teste	Dosagem de cloro (mg/l)	Diluição da amostra
1	200	1:10
2	200	1:50
3	200	1:100
4	400	1:10
5	400	1:50
6	400	1:100
7	600	1:10
8	600	1:50
9	600	1:100

3.2. DETERMINAÇÃO DO "BREAKPOINT" EM AMOSTRA DE FEZES

Foram feitas determinações de cloro residual total e livre, em frações da amostra de fezes, para diferentes dosagens, de forma a se obter a curva do "breakpoint" e para se saber a partir de qual dosagem seria obtido cloro residual livre. No Quadro 3.4 estão representados os testes realizados. Os testes foram realizados para um tempo de contato de 30 minutos.

Quadro 3.4 - Testes para determinação de cloro residual total e livre em amostra de fezes

Teste	Dosagem de cloro (mg/l)	Teste	Dosagem de cloro (mg/l)
1	50	13	1500
2	100	14	2000
3	150	15	2500
4	200	16	3000
5	300	17	3500
6	400	18	3750
7	500	19	4000
8	600	20	4250
9	700	21	4500
10	800	22	4750
11	900	23	5000
12	1000		

Foram realizados testes, em paralelo, para determinação do "breakpoint" na amostra de esgoto. A medição do cloro residual foi feita através do método DPD.

3.3. TESTES DE SOBREVIVÊNCIA DO VIBRIÃO

Desejava-se, inicialmente, realizar a desinfecção de fezes de pacientes com cólera, mas os casos de cólera ocorridos no Estado de Minas Gerais concentraram-se nas cidades do interior e tornou-se impossível conseguir tais amostras. Dessa forma, optou-se por realizar a inoculação de vibrião em concentração semelhante à eliminada pelos doentes (10^6 a 10^8 vibriões por mililitro) nas amostras de fezes e verificar sua sobrevivência. No Quadro 3.5, estão representados os testes de sobrevivência do vibrião realizados em amostras de fezes.

Quadro 3.5. Sobrevivência do vibrião em amostra de fezes

Teste	Tempo após a inoculação	Teste	Tempo após a inoculação
1	10 min	8	5 horas
2	20 min	9	6 horas
3	30 min	10	12 horas
4	1 hora	11	24 horas
5	2 horas	12	48 horas
6	3 horas	13	72 horas
7	4 horas	14	

Para o desenvolvimento dos testes de sobrevivência, foi necessária a preparação de inóculos de vibriões de concentração conhecida, a fim de que se pudesse obter na amostra de fezes inoculada uma concentração final de cerca de 10^8 vibriões por mililitro. Foram os seguintes os procedimentos básicos utilizados na preparação dos inóculos e semeadura das amostras de fezes (BIER, 1976):

inoculação de colônias de vibriões em tubo de ensaio contendo água peptonada alcalina (ambiente ideal para multiplicação de vibriões). As colônias utilizadas eram mantidas em laboratórios, em placas de ágar sangue (ASA). A inoculação foi feita com alças de platina;

manutenção do tubo de ensaio inoculado a 37°C , durante intervalos de tempo que variaram de cerca de 3 horas (dependendo da concentração inoculada de vibriões);

preparo de diluições sucessivas da amostra (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6});

inoculação em placa de ágar de TCBS ("Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose"), para cada diluição;

manutenção das placas inoculadas a 37°C , durante cerca de 12 horas;

determinação da melhor diluição e contagem dos vibriões;

introdução do inóculo na amostra de fezes, de forma a se obter uma concentração resultante de 10^8 vibriões por mililitro.

As figuras 3.4 e 3.5 apresentam as etapas envolvidas no processo.

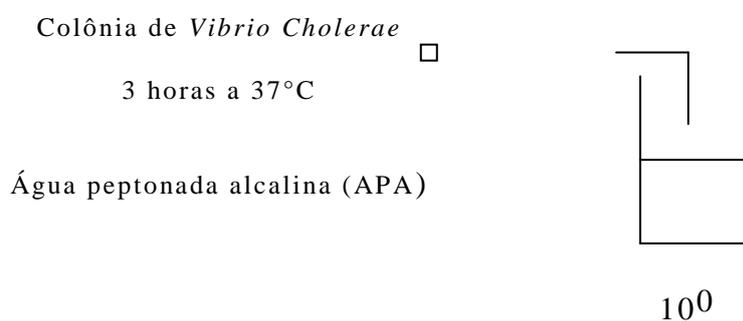


Figura - 3.4. Preparação do inóculo do vibrião

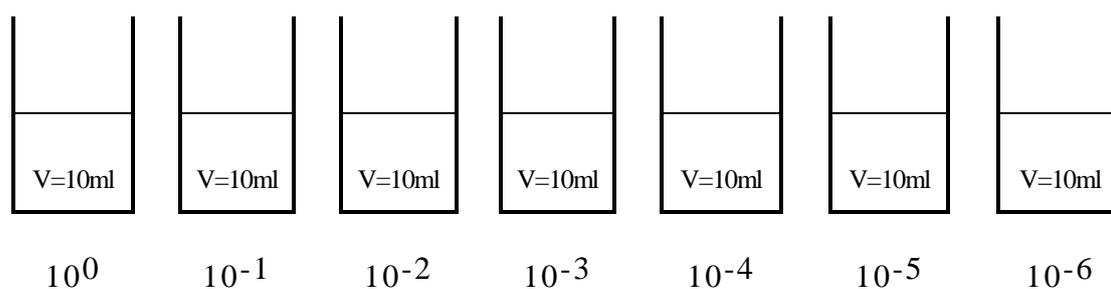


Figura - 3.5. Diluições sucessivas para determinação da concentração do inóculo

O inóculo obtido foi introduzido na amostra de fezes (4 ml de inóculo para 4 ml de amostra) de forma que a concentração obtida fosse de 10^8 vibriões por ml. Verificou-se então a sobrevivência do vibrião em função do tempo (Quadro 3.5.)

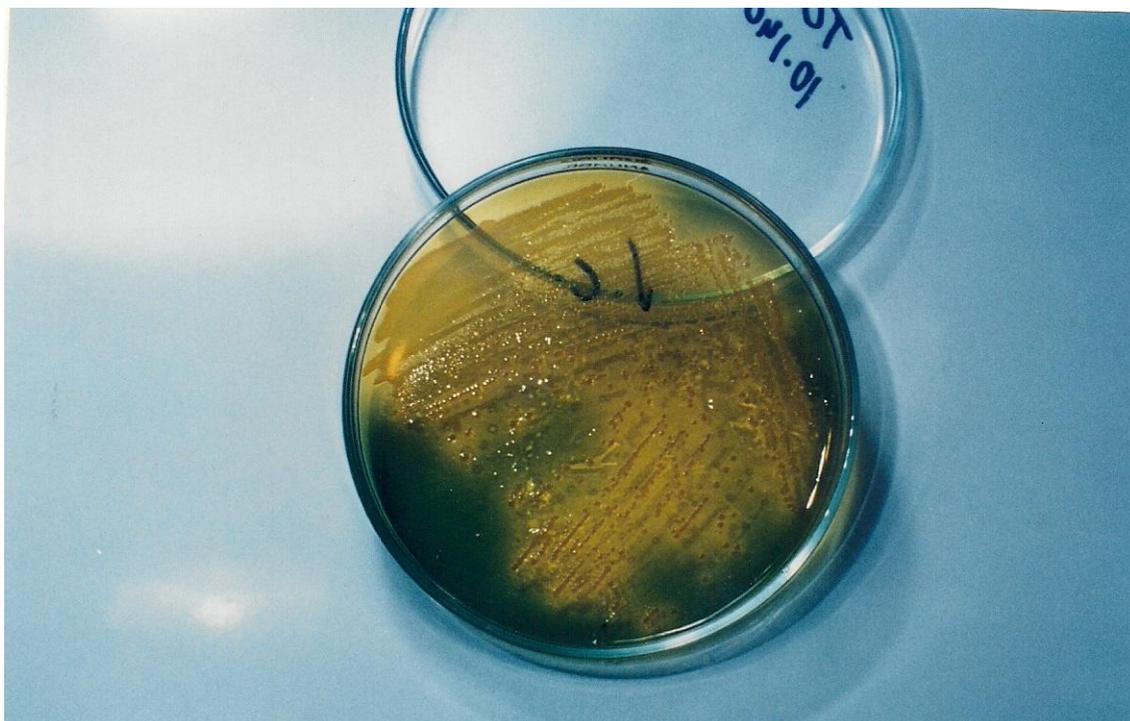


Figura 3.6. Placa de TCBS para contagem de vibrião

3.4. TESTES DE DESINFECÇÃO

Foram realizados testes de desinfecção em amostras de fezes inoculadas com vibrião, amostras de fezes sem vibrião e amostras de cultura pura de vibrião. Os testes foram realizados de forma a se avaliar a eficiência da desinfecção. Utilizou-se um tempo de contato de 30 minutos, por ser este recomendado por alguns autores (CAMPOS, 1993), e o tempo de contato de 15 minutos para efeito de comparação. Uma outra variável importante citada por LONGLEY (1993) é a mistura. Foram utilizadas amostras com mistura, aplicando-se um gradiente de velocidade de 100 s^{-1} através de aparelho para "jar test", apresentado na figura 3.2. e amostras sem mistura. Os teste foram realizados em pH aproximadamente neutro, sem adição de base ou ácido.

3.4.1. Testes em amostras de fezes inoculadas com vibrião

As amostras de fezes foram inoculadas com vibrião e após um tempo de contato de 30 minutos, sem mistura, verificou-se a sobrevivência do vibrião em função da dosagem de cloro aplicada. No quadro 3.6 estão representados os testes realizados.

Quadro 3.6. Testes de desinfecção de vibrião em amostra de fezes para tempos de contato de 30 minutos.

Teste	Dosagem de cloro (mg/l)	Nº de Testes
1	0	02
2	100	02
3	200	02
4	300	02
5	400	02
6	500	02

3.4.2. Testes em amostras de fezes sem inóculo de vibrião

Os testes em amostras de fezes foram realizados para tempos de contato de 30 minutos, com e sem mistura. No quadro 3.7 estão representados os testes realizados.

A eficiência da desinfecção foi avaliada em função da determinação do número mais provável de coliformes fecais antes e após a desinfecção, utilizando-se o método dos tubos múltiplos.

Quadro 3.7. Testes de desinfecção de coliforme em amostras de fezes para tempos de contato de 30 minutos com e sem mistura.

Testes	Dosagem de cloro (mg/l)	Nº de testes
1	0	02
2	100	02
3	200	02
4	300	02
5	400	02
6	500	02
7	600	02
8	800	02
9	1000	02
1000	1500	02

3.4.3. Testes em amostras de cultura pura de vibrião

Devido ao fato do vibrião ser um mau competidor, foram realizados testes de desinfecção em cultura pura, em meio peptonado alcalino, que é o ambiente ideal para a sobrevivência do vibrião (FEACHEM et al., 1983;

BRASIL, 1990). Os testes realizados estão representados no quadro 3.8. Os testes foram efetuados para tempos de contato de 15 e 30 minutos, com e sem mistura.

Quadro 3.8. Testes de desinfecção de vibrião em cultura pura para tempos de contato de 30 e 15 minutos.

Testes	Dosagem de cloro (mg/l)	Nº de testes
1	0	3
2	100	3
3	200	3
4	400	3
5	600	3
6	800	3
7	1000	3

3.5. DESCLORAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE BACTERIOLÓGICA

As análises bacteriológicas de número mais provável de coliformes foram realizadas utilizando-se a Técnica dos Tubos Múltiplos, que consiste de um teste presuntivo e um teste confirmativo. O teste presuntivo é realizado a 35°C em 24-48 horas, ocorrendo uma seleção inicial de organismos que fermentam a lactosa, enquanto o teste confirmativo para *Escherichia coli* é realizado a 44,5°C em 48 +/- 2 horas. A contagem de vibriões foi realizada utilizando-se placas de TCBS, incubadas a 35-37°C por 18-24 horas. Logo, o cloro deve ser removido para evitar um tempo de contato mais prolongado com a amostra. Foram adicionados 2ml de Na₂S₂O₃ 4x10⁻³N para cada 0,2 mg/l de cloro residual livre (RAM & MALLEY, 1984) para remoção de cloro da amostra antes da análise bacteriológica.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Foram realizadas análises estatísticas dos resultados obtidos, nas diversas etapas da pesquisa, de forma a determinar a influência de variáveis, tais como dosagem, tempo de contato e mistura, na desinfecção de vibriões e coliformes. Para determinar a significância da diferença das contagens de vibriões em relação às variações nas diferentes variáveis, foram realizadas análises de variância dos resultados.

Em uma análise estatística de variância, utiliza-se o fator de variância (F_{ratio}) que é um parâmetro estatístico que estima a diferença entre a média de amostras e, apenas se o F_{ratio} é elevado, sugere-se que a variação entre as médias é suficientemente grande para ser atribuída ao acaso. A hipótese "nula", de não existência de diferença entre as médias da população de estudo, pode, então, ser rejeitado (WALPOLE & MYERS, 1989). Para se testar a hipótese nula nesse estudo, o fator de variância (F_{ratio}) foi comparado com seu valor crítico, representado por $F_{0,03}$, que é baseado no critério de decisão com grau de confiança de 95% (Tabela A.6, WALPOLE & MYERS, 1989). Quanto maior o F_{ratio} em relação ao $F_{0,03}$, maior é a certeza de que as diferenças não são atribuídas ao acaso. Foi realizada, ainda, análise de regressão não linear para verificar se os testes de desinfecção apresentavam boa correlação com a lei de Chick.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DETERMINAÇÃO DE CLORO RESIDUAL NA AMOSTRA DE ESGOTO

Apresenta-se a seguir o resumo dos principais resultados da determinação de cloro residual através dos métodos DPD, do potencial de oxi-redução e da titulação amperométrica.

4.1.1. Resultados do método DPD

Os resultados relativos à determinação de cloro em amostras de esgotos, para tempos de contato próximos de zero, são apresentados no Quadro 4.1, a seguir.

Estes testes foram programados objetivando-se avaliar a interferência da turbidez na determinação do ponto final de titulação. Conforme pode-se observar, os resultados conseguidos para os testes em que a amostra de esgoto foi submetida a diluições maiores (turbidez menor) encontram-se muito próximos das dosagens de cloro aplicadas (testes 2, 5 e 9). Para os testes com diluições de 1:1 e 1:2 os teores de cloro encontrados foram significativamente menores que as dosagens aplicadas, provavelmente devido à interferência da turbidez no ponto de viragem. Para a diluição de

1:10, foram obtidos os melhores resultados e a diferença entre o teor de cloro residual esperado e o obtido foi, no máximo, de 6%.

Quadro 4.1. Resumo dos resultados de avaliação da dosagem de cloro através do método DPD

Teste	Dosagem de cloro aplicada (mg/l)	Diluição da amostra	Dosagem obtida (mg/l)
1	20,0	1:5	18,4
2	20,0	1:10	18,8
3	10,0	1:2	9,3
4	10,0	1:5	9,4
5	10,0	1:10	9,9
6	5,0	1:1	4,1
7	5,0	1:2	3,5
8	5,0	1:5	4,5
9	5,0	1:10	5,0

Para os testes onde as dosagens de cloro aplicadas foram menores (5,0 mg/l), a influência da turbidez foi mais significativa pois a coloração avermelhada, típica do início da titulação, mostrou-se mais fraca, dificultando a visualização do ponto de viragem.

4.1.2. Resultados do método do potencial de oxi-redução

4.1.2.1. Testes com amostras de água destilada

Face ao desconhecimento do funcionamento do analisador de oxi-redução para determinação de cloro livre em amostras de esgotos, procedeu-se, inicialmente, o teste do mesmo para amostras de água destilada. Os resultados da análise de cloro livre para tais testes são apresentados no Quadro 4.2, a seguir.

Quadro 4.2. Resultados de avaliação de cloro livre

(amostra: água destilada)

Dosagem de cloro aplicada (mg/l)	pH	ORP (mV)	Cloro residual	Cloro residual
			ORP (mg/l)	DPD (mg/l)
0,5	6,8	710	0,5	0,5
1,0	7,3	720	1,1	1,0
2,0	7,9	690	2,1	2,0
3,0	8,2	674	3,0	3,0
4,0	8,3	667	-	4,0
5,0	8,3	670	-	5,0

A análise dos resultados do Quadro 4.2 permite aferir uma boa correlação entre os valores de cloro livre determinados com o controlador pH-ORP e as dosagens de cloro aplicadas (ou determinadas através do método DPD).

As diferenças obtidas foram de 10%, no máximo. Apenas para as dosagens de cloro de 4,0 e 5,0 mg/l não foi possível a determinação de cloro livre através do ábaco (Fig. 3.3.), pois os valores de pH e ORP encontram-se fora da faixa de leitura.

4.1.2.2. Testes com amostras de esgoto

Como a calibração do controlador de pH-ORP conseguida para as amostras de água destilada não pode ser utilizada para amostras de esgotos, partiu-se então para a calibração do controlador pH-ORP utilizando-se uma amostra de esgotos. Foram adotados os mesmos procedimentos de calibração para amostras de águas de piscina, conforme explicitado no manual de operação do aparelho (WALLACE & TIERNAN, 1991). Durante a calibração, caso os valores de pH e ORP obtidos não estejam dentro da faixa de leitura do ábaco, ajustes no pH ou na dosagem de cloro devem ser efetuados.

Os resultados de cloro livre obtidos após a calibração do aparelho, em comparação com os teores de cloro residual livre obtidos através do método DPD, são apresentados na Figura 4.1.

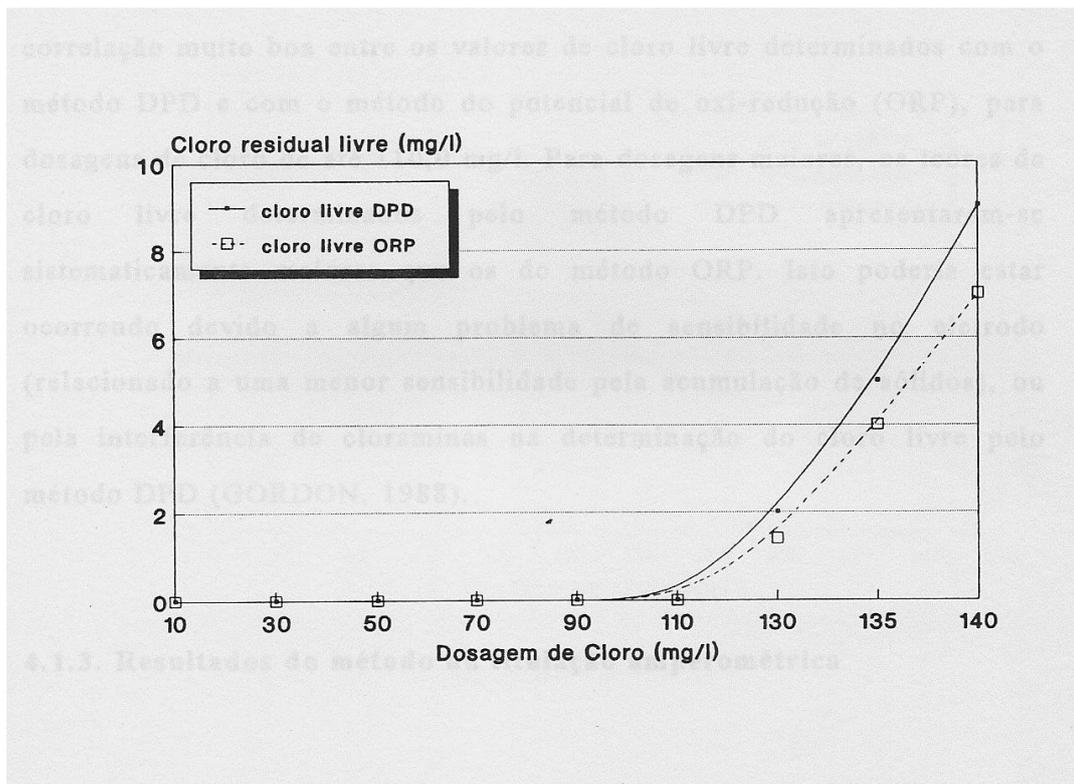


Figura 4.1. Correlação entre os métodos DPD e ORP - Cloro livre

Notas:

- 1- Todas as amostras foram diluídas na relação 1:10.
- 2- Os teores de cloro livre foram determinados após um tempo de contato de 30 minutos.

A representação gráfica dos resultados apresentados no Quadro I.1 (Anexo I) é mostrada na Figura 4.1.

Conforme pode-se aferir dos resultados apresentados, houve uma correlação muito boa entre os valores de cloro livre determinados com o método DPD e com o método do potencial de oxi-redução (ORP), para dosagens de cloro de até 110,0 mg/l. Para dosagens maiores, os teores de cloro livre determinados pelo método DPD apresentaram-se sistematicamente maiores

que os do método ORP. Isto poderia estar ocorrendo devido a algum problema de sensibilidade no eletrodo (relacionado a uma menor sensibilidade pela acumulação de sólidos), ou pela interferência de cloraminas na determinação do cloro livre pelo método DPD (GORDON, 1988).

4.1.3. Resultados do método da titulação amperométrica

Os testes realizados para o método ORP foram repetidos para o método da titulação amperométrica (Quadro 3.2). Os resultados obtidos são apresentados no Quadro I.1 (Anexo I) e sua apresentação gráfica é mostrada nas figuras 4.1. e 4.2.

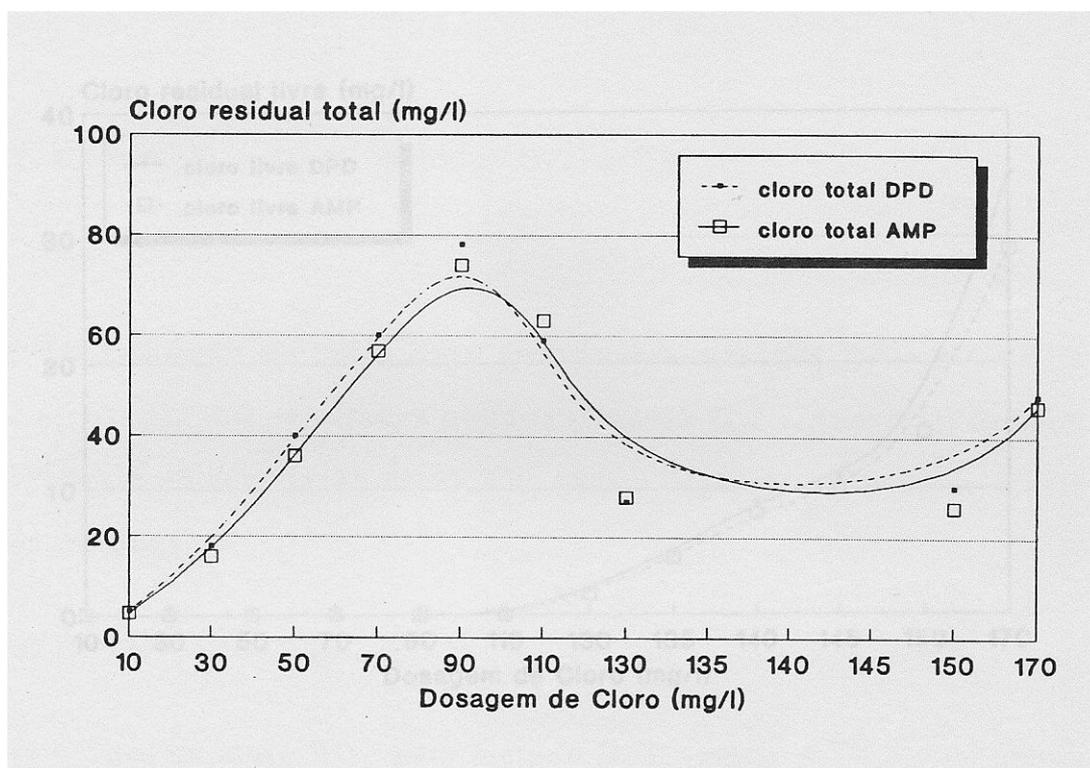


Figura 4.2. Correlação entre os métodos DPD e amperométrico - Cloro total

Os resultados obtidos na determinação de cloro residual total demonstram uma boa correlação entre os resultados do método DPD e da titulação amperométrica Quadro II.2 (Anexo II).

Foram realizados também, determinações de cloro residual livre utilizando-se o método da titulação amperométrica. A representação gráfica dos resultados obtidos no Quadro I.1 (Anexo I) é mostrada na Figura 4.3.

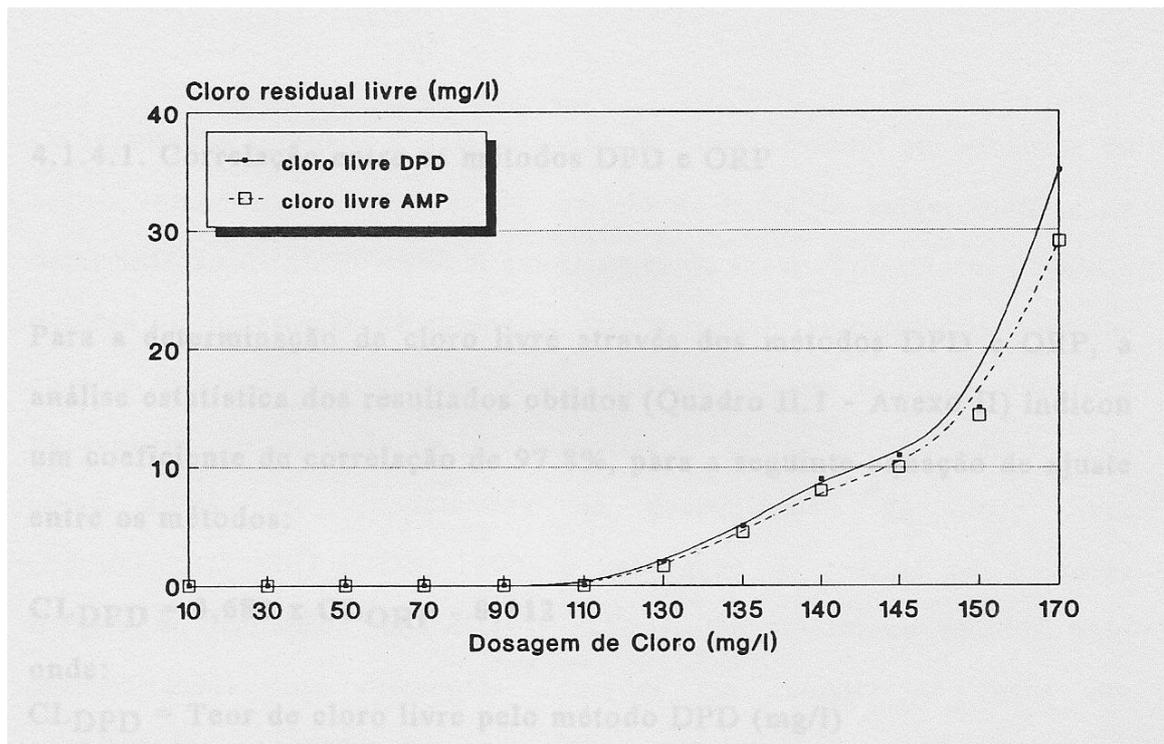


Figura 4.3. Correlação entre os métodos DPD e amperométrico - Cloro livre

Os resultados obtidos na análise de cloro residual livre, da mesma forma que as de cloro total, foram mais estáveis para o método da titulação amperométrica, apresentando pouca alteração em função do tempo da análise. Para o método DPD, entretanto a análise requer maiores cuidados, para se evitar a interferência de monocloraminas. Resultados semelhantes foram obtidos por outros pesquisadores (DERRIGAN, 1993; JENSEN & JOHNSON, 1990b).

4.1.4. Análise estatística das metodologias para determinação de cloro residual

4.1.4.1. Correlação entre os métodos DPD e ORP

Para a determinação de cloro livre através dos métodos DPD e ORP, a análise estatística dos resultados obtidos (Quadro II.1 - Anexo II) indicou um coeficiente de correlação de 97.8%, para a seguinte equação de ajuste entre os métodos:

$$CL_{DPD} = 0,681 \times CL_{ORP} - 0,112$$

onde:

CL_{DPD} = Teor de cloro livre pelo método DPD (mg/l)

CL_{ORP} = Teor de cloro livre pelo método ORP (mg/l)

4.1.4.2. Correlação entre os métodos DPD e titulação amperométrica

Para a determinação de cloro total, a análise estatística dos resultados obtidos (Quadro II.2 - Anexo II) indicou um coeficiente de correlação de 98.6%, para a seguinte equação de ajuste entre os métodos DPD e titulação amperométrica:

$$CT_{DPD} = CT_{TA} + 1,601$$

onde:

CT_{DPD} = Teor de cloro total através do método DPD (mg/l)

CT_{TA} = Teor de cloro livre através do método da titulação amperométrica.

4.2. DETERMINAÇÃO DE CLORO RESIDUAL EM AMOSTRAS DE FEZES

Os resultados relativos à determinação de cloro residual em amostras de esgoto indicaram a utilização do método de titulação amperométrica na determinação de cloro residual em amostra de fezes. Entretanto, devido à demora na importação de reagentes para o método amperométrico optou-se pela utilização do método DPD, tendo-se tomado todos os cuidados necessários à eliminação de interferências de cloraminas no método, tais como adição de tioacetamida na determinação de cloro livre (STANDARD METHODS, 1992) e realização de análise em menores tempos de titulação (DERRIGAN, 1993). Os resultados obtidos pelo método DPD para diferentes diluições em amostra de fezes são apresentados no Quadro 4.3.

Quadro 4.3 Resumo dos resultados da determinação da dosagem de cloro em amostra de fezes (método DPD)

Teste	Dosagem aplicada (mg/l)	Diluição	Dosagem obtida (mg/l)
1	600	1:100	598
2	600	1:50	540
3	600	1:10	532
4	400	1:100	399
5	400	1:50	380
6	400	1:10	370
7	200	1:100	199
8	200	1:50	175
9	200	1:10	114

Os testes foram realizados para tempos de contato próximos de zero, de forma a se avaliar a influência da turbidez no ponto de viragem. Os resultados obtidos, indicam que a diluição de 1:100 parece ser suficiente para eliminar a interferência no ponto de viragem. A amostra com diluição de 1:100 apresenta uma turbidez de 18 NTU, valor próximo ao encontrado para a amostra de esgoto diluída dez vezes. A elevada diluição da amostra diminui a precisão do método para teores de cloro inferiores a 2,0 mg/l pois o limite mínimo de detecção do método é de 18µg/l (STANDARD METHODS, 1992).

4.3. RESULTADOS DO "BREAKPOINT" EM AMOSTRA DE ESGOTO

A partir da determinação de cloro residual total e livre para diversas dosagens de cloro e tempo de contato de 30 minutos, foi obtida a curva do "breakpoint" para a amostra de esgotos. A dosagem de cloro obtida para o "breakpoint" foi de 140 mg/l. Esse valor é compatível com a relação molar citada por SNOYEINK & JENKINS (1980) para o "breakpoint". Esses autores consideram que no "breakpoint" a relação molar entre dosagens de cloro e concentração de amônia seria de 1,5:1 a 2,0:1. A amostra analisada apresenta uma concentração de amônia de 14,7 mg/l, logo a razão molar obtida é de 1,88. Esse valor pode sofrer alterações em função das características da amostra utilizada. Na figura 4.4 é apresentada a representação gráfica dos resultados obtidos para cloro residual total e livre respectivamente. Os resultados obtidos são apresentados no Quadro I.2. (Anexo I).

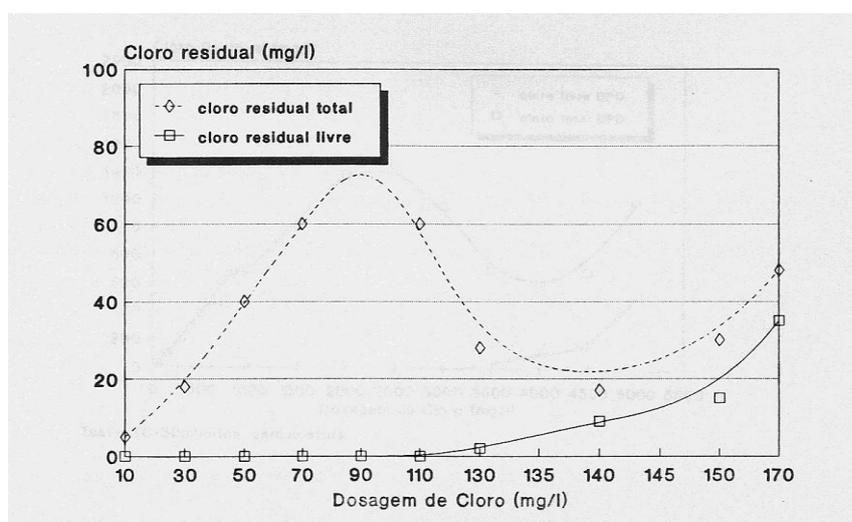


Figura 4.4. Curva do "breakpoint" em amostra de esgoto - Método DPD

4.4. RESULTADO DA DETERMINAÇÃO DO "BREAKPOINT" EM AMOSTRA DE FEZES

A determinação do "breakpoint" em amostra de fezes foi realizada utilizando-se maiores dosagens de cloro, por ser uma amostra com uma concentração mais elevada de nitrogênio amoniacal (300 mg/l) e DBO de 9.000 mg/l. Os testes foram realizados para um tempo de contato de 30 minutos. A dosagem de cloro obtida para o "breakpoint" foi de 4.000 mg/l. A razão molar entre as dosagens de cloro e a concentração de amônia para a amostra de fezes utilizada, foi de 2,63. O valor está próximo do valor citado por SNOYEINK & JENKINS (1980). A maior elevação no valor obtido pode ser explicada pela concentração de nitrogênio orgânico (60 mg/l) que também reage com o cloro, formando cloraminas orgânicas. A representação gráfica dos resultados obtidos no Quadro I.2 (Anexo I) é mostrada na Figura 4.5.

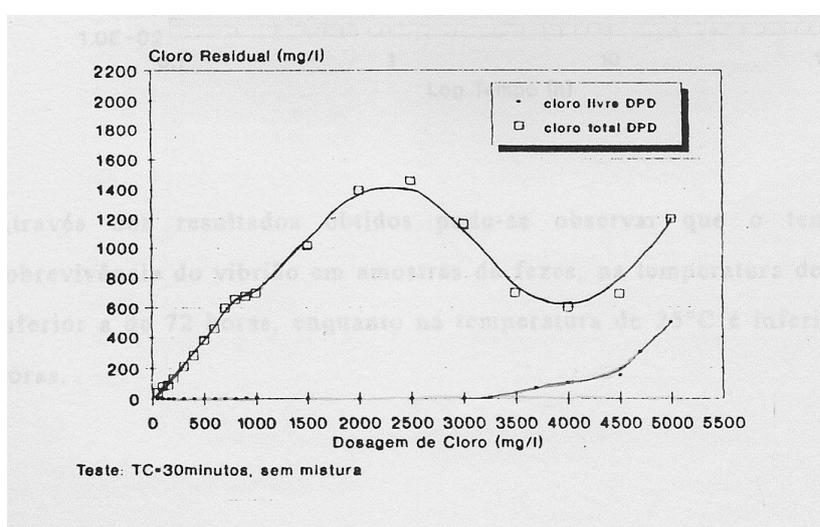


Figura 4.5. Curva do "breakpoint" em amostra de fezes - Método DPD

4.5. RESULTADOS DOS TESTES DE SOBREVIVÊNCIA DO VIBRIÃO

Após a inoculação de uma concentração conhecida de vibrião em amostra de fezes, foram feitas contagens do número de vibriões presentes na amostra em função do tempo. Os resultados são apresentados no Quadro I.3 (Anexo I) e sua representação gráfica na Figura 4.6.

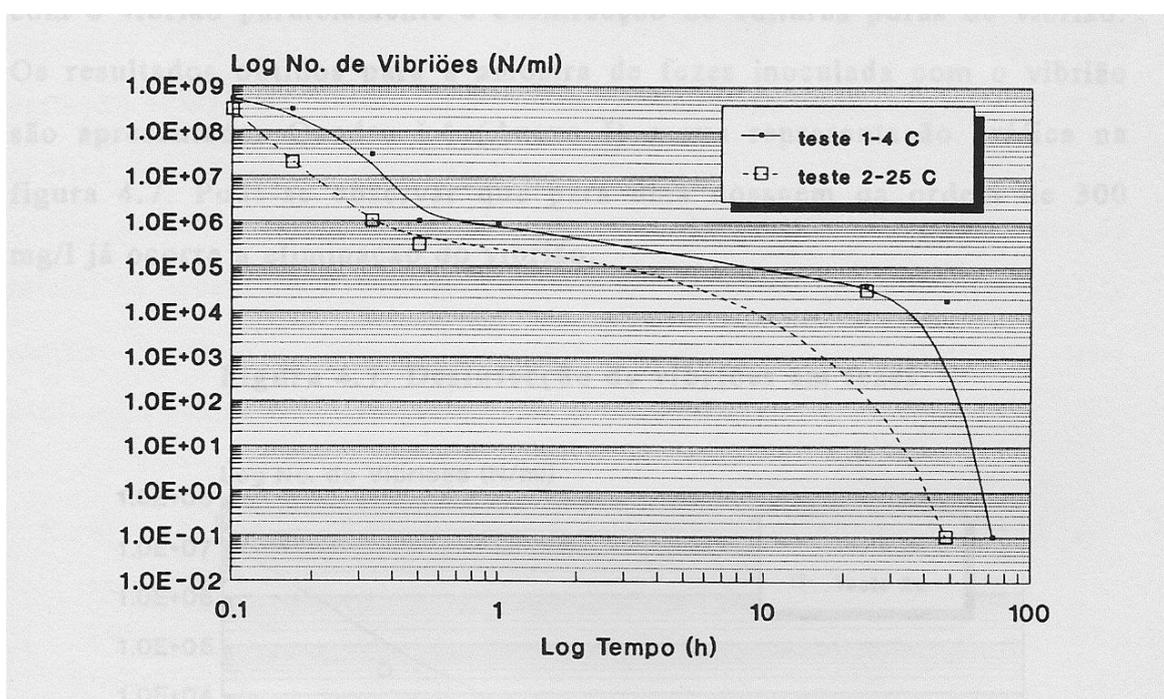


Figura 4.6. Sobrevivência de vibriões em função do tempo

Através dos resultados obtidos pode-se observar que o tempo de sobrevivência do vibrião em amostras de fezes, na temperatura de 4°C, é inferior a de 72 horas, enquanto na temperatura de 25°C é inferior a 48 horas.

4.6. TESTES DE DESINFECÇÃO

4.6.1. Desinfecção de vibriões em amostras de fezes

Foram realizados testes de desinfecção em amostra de fezes inoculada com o vibrião paralelamente à desinfecção de culturas puras de vibrião. Os resultados obtidos para a amostra de fezes inoculada com o vibrião são apresentadas Quadro I.4 (Anexo I) e sua representação gráfica na figura 4.7. Pode-se observar que para uma dosagem da ordem de 300 mg/l já ocorre a eliminação do vibrião.

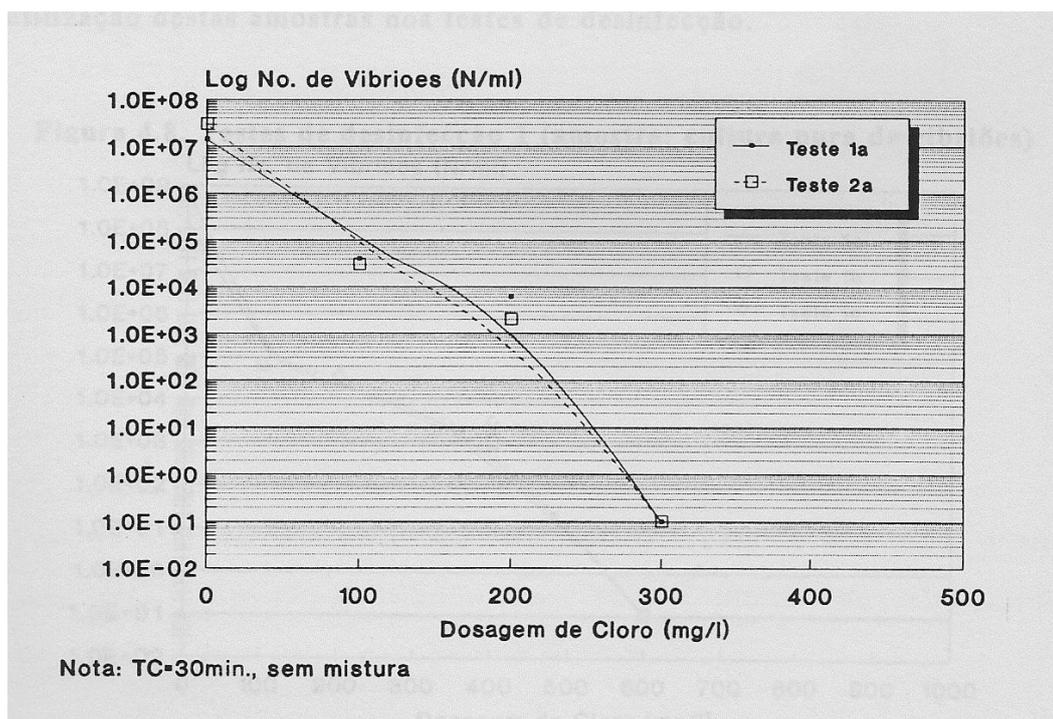


Figura 4.7. Desinfecção de vibriões em fezes

4.6.2. Desinfecção de vibriões em cultura pura

4.6.2.1. Resultados obtidos para tempo de contato de 30 minutos, sem mistura.

Para a desinfecção de culturas puras de vibrião foram realizados testes para tempos de contato de 15 e 30 minutos com e sem agitação das amostras. Os testes realizados para tempo de contato de 30 minutos, sem agitação (Quadro I.5 - Anexo I) são apresentados na Figura 4.8. Pela análise dos resultados obtidos pode-se concluir que para a dosagem da ordem de 600 mg/l ocorre total eliminação do vibrião para concentração inicial da ordem de 10^8 . A partir da constatação de que o vibrião resiste melhor à desinfecção em amostras de cultura pura, optou-se pela utilização destas amostras nos testes de desinfecção.

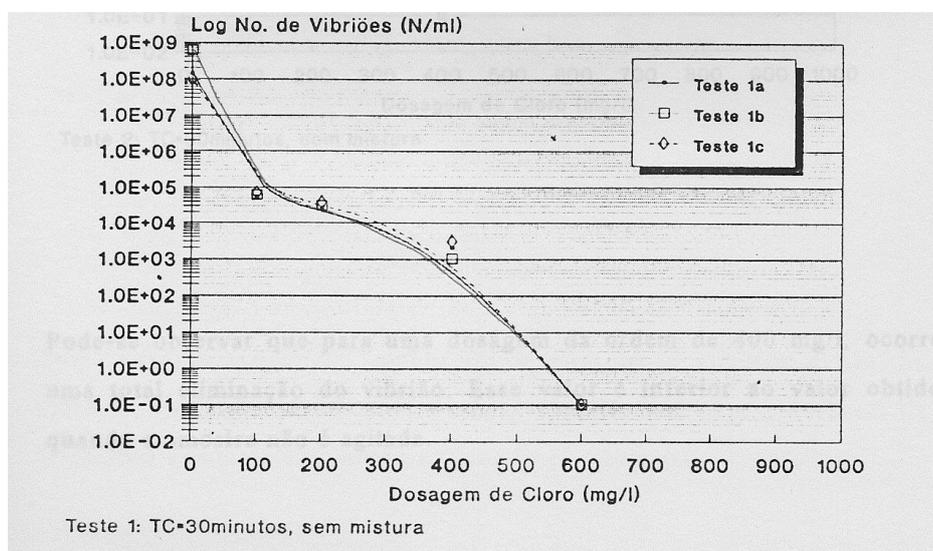


Figura 4.8. Testes de desinfecção 1 (amostra: cultura pura de vibriões)

4.6.2.2. Resultados obtidos pra tempo de contato de 30 minutos, com mistura

Foram realizados testes para tempo de contato de 30 minutos, com agitação. Para a agitação da amostra foi utilizado um gradiente de velocidade de 100 s^{-1} . A representação gráfica dos resultados apresentados no Quadro I.5 (Anexo I) é apresentada na Figura 4.9.

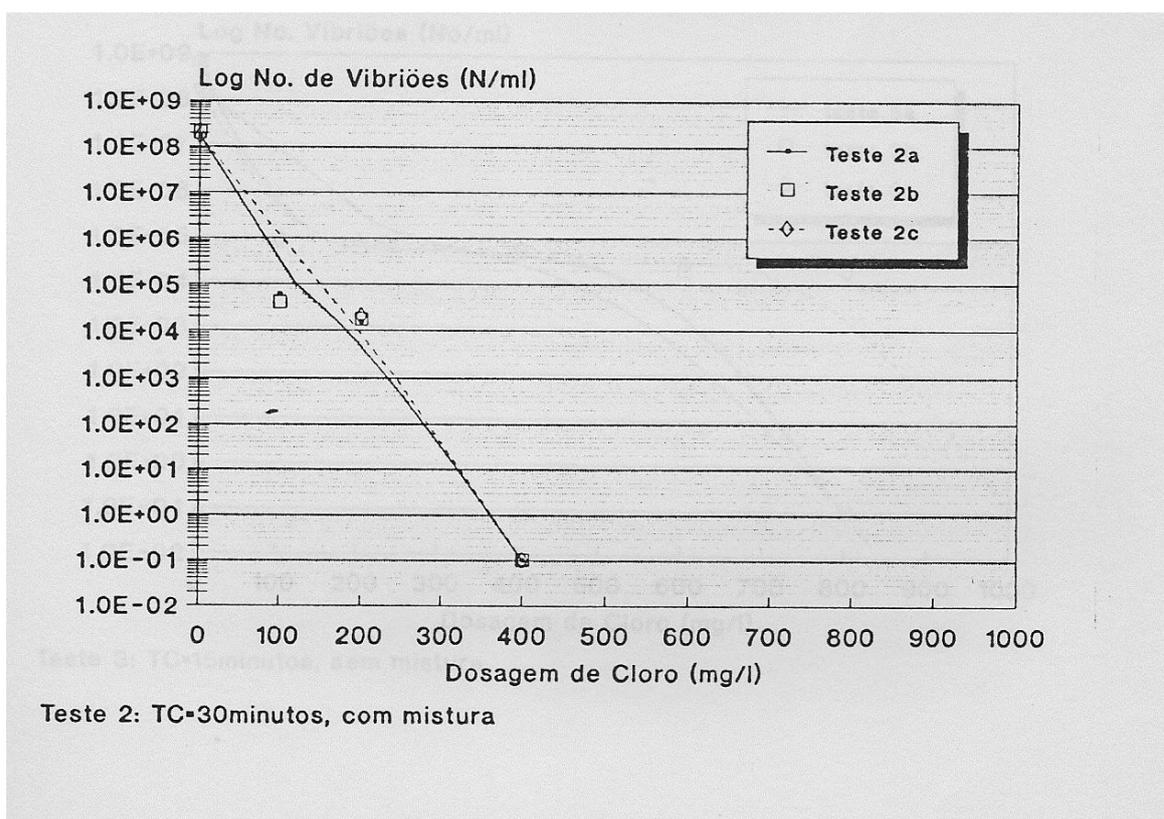


Figura 4.9. Teste de Desinfecção 2 (amostra: cultura pura de vibriões)

Pode-se observar que para uma dosagem da ordem de 400 mg/l, ocorre uma total eliminação do vibrião. Esse valor é inferior ao valor obtido quando a amostra não é agitada.

4.6.2.3. Resultados obtidos para tempo de contato de 15 minutos, sem mistura

Os resultados do teste para tempo de contato de 15 minutos, sem mistura são apresentados Quadro I.5 (Anexo I) e sua representação gráfica na Figura 4.10.

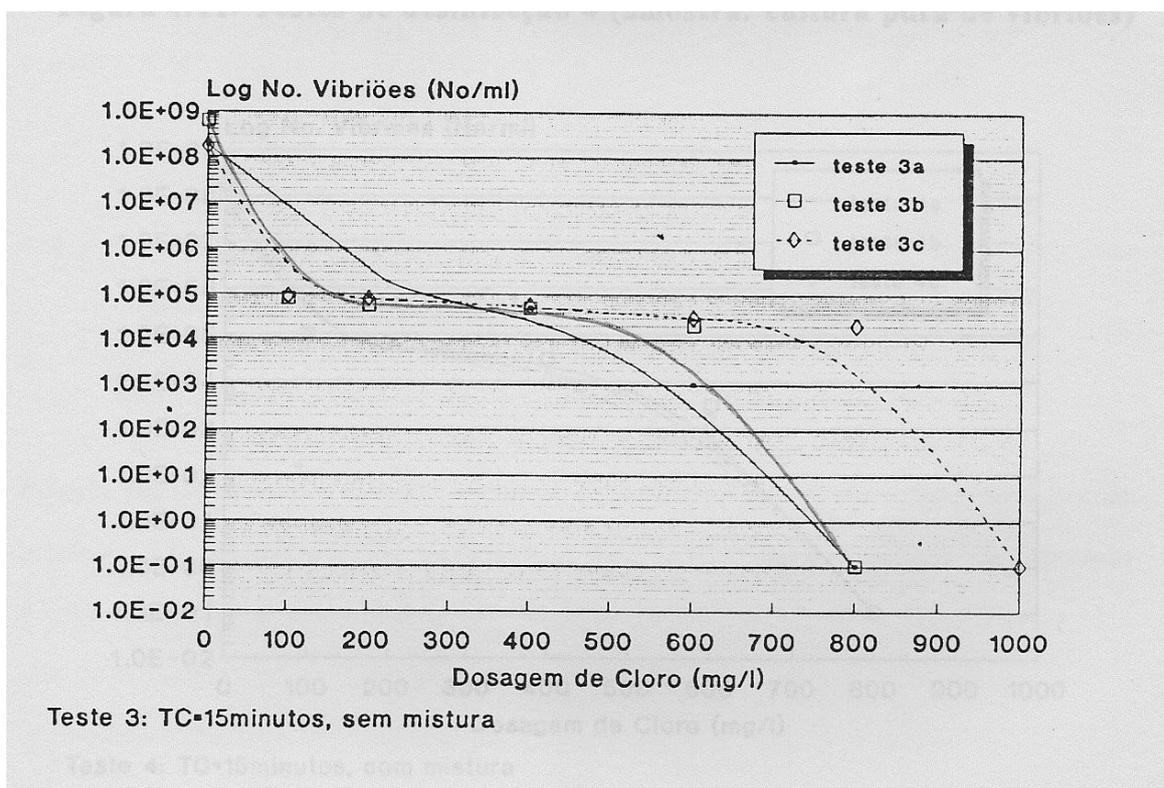


Figura 4.10. Testes de Desinfecção 3 (amostra: cultura pura de vibriões)

Nesse caso, o tempo de contato foi menor que o anterior e não foi utilizada a mistura da amostra, sendo necessária uma maior dosagem de cloro para completa eliminação do vibrião (1.000 mg/l).

4.6.2.4. Resultados obtidos para tempo de contato de 15 minutos, com mistura

Para tempos de contato de 15 minutos com mistura foi observada uma dosagem de cloro inferior ao teste sem mistura (900 mg/l), para completa eliminação do vibrião. Os resultados obtidos são apresentados no Quadro I.5 (Anexo I) e sua representação gráfica na Figura 4.11.

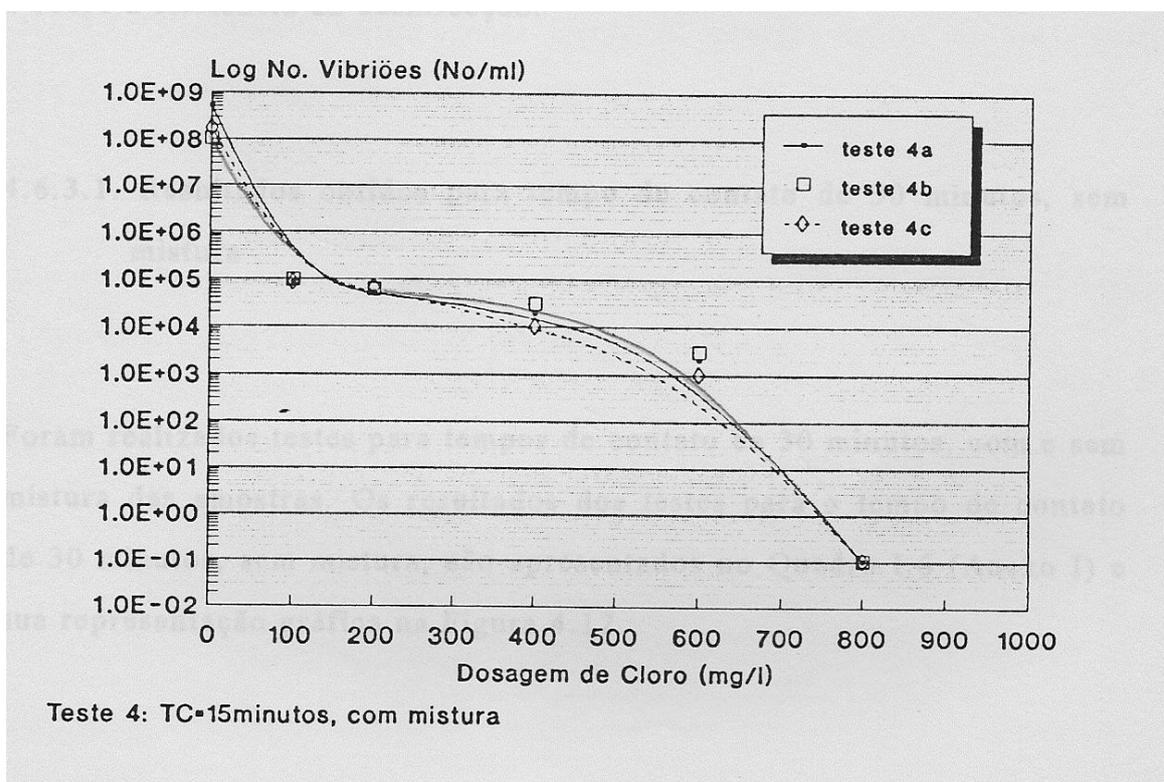


Figura 4.11. Testes de desinfecção 4 (amostra: cultura pura de vibriões)

4.6.3. Desinfecção de fezes

Como os testes de desinfecção de amostras de fezes inoculadas com vibriões não conduziram a bons resultados, devido ao fato dos coliformes serem melhores competidores, optou-se pela realização de testes de desinfecção em amostra de fezes, utilizando-se os coliformes fecais como parâmetros na avaliação da eficiência da desinfecção. Tais testes foram realizados para se saber a influência da matéria orgânica, dos sólidos suspensos e do nitrogênio orgânico e amoniacal sobre a demanda de cloro e sobre a eficiência da desinfecção.

4.6.3.1. Resultados obtidos para tempo de contato de 30 minutos, sem mistura

Foram realizados testes para tempos de contato de 30 minutos, com e sem mistura das amostras. Os resultados dos testes para o tempo de contato de 30 minutos, sem mistura, são apresentados no Quadro I.6 (Anexo I) e sua representação gráfica na Figura 4.12.

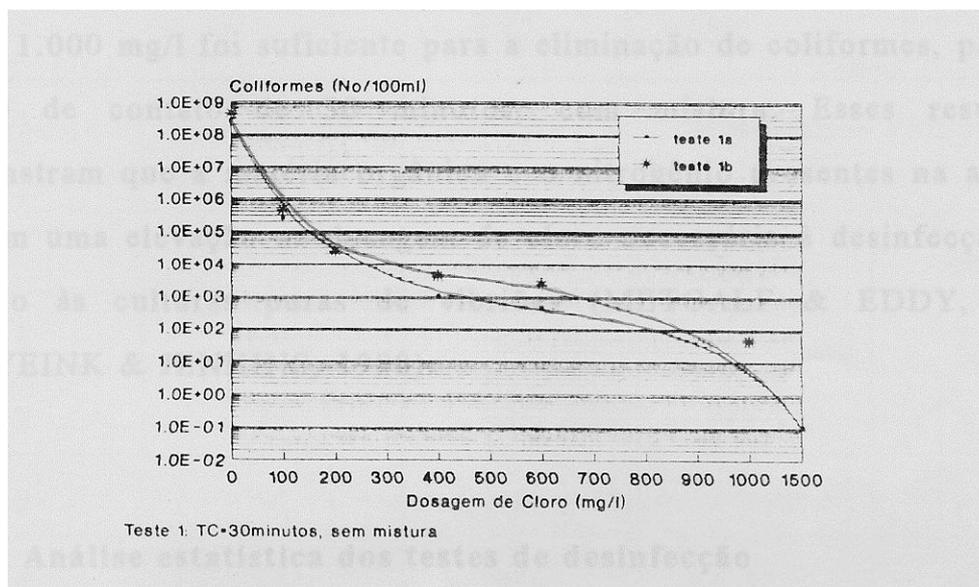


Figura 4.12. Testes de desinfecção 1 (amostra: fezes)

4.6.3.2. Resultados obtidos para tempo de contato de 30 minutos, com mistura

Os resultados do teste com mistura são apresentados no Quadro I.6 (Anexo I) e sua representação gráfica na Figura 4.13.

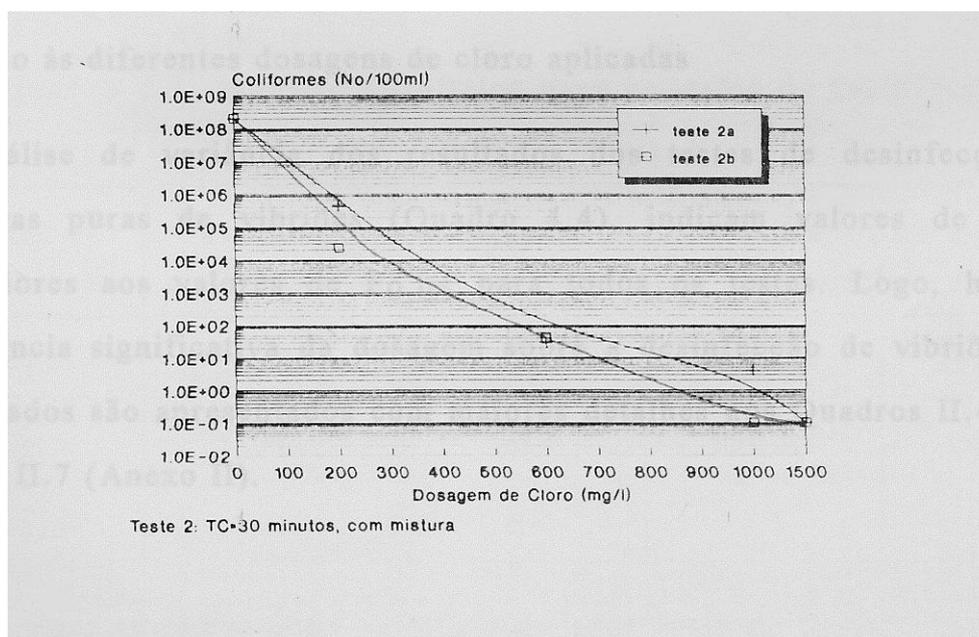


Figura 4.13. Testes de desinfecção 2 (amostra: fezes)

Para a amostra de fezes observou-se que uma dosagem de cloro da ordem de 1.000 mg/l foi suficiente para a eliminação de coliformes, para um tempo de contato de 30 minutos, com mistura. Esses resultados demonstram que a matéria orgânica e o nitrogênio presentes na amostra causam uma elevação na dosagem de cloro necessária à desinfecção, em relação às culturas puras de vibriões (METCALF & EDDY, 1979; SNOYEINK & JENKINS, 1980).

4.6.4. Análise estatística dos testes de desinfecção

a. Influência da dosagem na desinfecção

Foi observado que para um determinado tempo de contato e grau de mistura, ocorria uma maior eliminação do vibrião com o aumento da dosagem de cloro. Foi realizada uma análise de variância dos resultados para determinar a significância da diferença das contagens de vibriões em relação às diferentes dosagens de cloro aplicadas

A análise de variância dos resultados dos testes de desinfecção de culturas puras de vibriões (Quadro 4.4), indicam valores de F_{ratio} superiores aos valores de $F_{0,05}$ para todos os testes. Logo, há uma influência significativa da dosagem sobre a desinfecção de vibriões. Os resultados são apresentados com maiores detalhes nos Quadros II.4, II.5, II.6 e II.7 (Anexo II).

Quadro 4.4 - Análise estatística, para os testes de desinfecção (Culturas puras de vibriões)

Testes de desinfecção	Tempo de contato (min)	Agitação da amostra	Resultados da análise estatística	
			F _{ratio}	F _{0,05}
1	30	não	3.046	2.85
2	30	sim	298.32	2.63
3	15	não	4.598	2.92
4	15	não	4.330	2.85

Nota: Para as análises de variância de cada teste de desinfecção, foram utilizados os resultados das 3 análises efetuadas para cada dosagem.

A análise de variância para os testes de desinfecção de fezes indicam um valor de $F_{ratio} = 120,931$, para os testes sem mistura, e $F_{ratio} = 7,5$ (Quadros II.8 e II.9 - Anexo II). Os valores de F_{ratio} foram superiores aos valores de $F_{0,05}$. Logo, há uma influência significativa da dosagem sobre a sobrevivência de vibriões. No Quadro 4.5 é apresentado um resumo dos resultados obtidos.

Quadro 4.5 - Análise estatística para os testes de desinfecção (Amostra de fezes)

Testes de desinfecção	Tempo de contato (min)	Agitação da amostra	Resultados da análise estatística	
			F _{ratio}	F _{0,05}
1	30	não	120.93	3.87
2	30	sim	7.5	5.19

Nota: Para as análises de variância de cada teste de desinfecção foram utilizados os resultados de 2 análises efetuadas para cada dosagem.

b. Influência da mistura na desinfecção

Com relação à influência da mistura sobre a desinfecção de vibriões, embora a interpretação dos resultados apresentados nas Figuras 4.8 a 4.11 indique uma maior eficiência para os testes conduzidos com agitação das amostras, as análises estatísticas dos resultados não confirmam tal interpretação. Os resultados obtidos através da análise da variância (Quadro II.10 - Anexo II) indicam um F_{ratio} de 0,286 em relação a um $F_{0,05}$ de 4,0, indicando que a eficiência da desinfecção de vibriões não foi afetada de maneira significativa pela mistura.

Em relação à influência da mistura no processo de desinfecção de fezes a análise estatística dos resultados não confirma a influência da mistura na eficiência da desinfecção uma vez que a análise de variância efetuada forneceu um F_{ratio} de 0,476 em relação a um $F_{0,05}$ de 4,30 (Quadro II.11 - Anexo II)

O fato da mistura não ter influenciado de maneira significativa a eficiência da desinfecção pode ser explicado pela utilização de um baixo gradiente de velocidade (100 s^{-1}). LONGLEY (1993) recomenda um gradiente de velocidade de 500 a 1000 s^{-1} para se conseguir um teor de 23,3 coliformes por 100 ml e recomenda a utilização de testes em escala piloto para verificação do gradiente de velocidade ideal. METCALF & EDDY (1979) sugerem que quanto maior a turbulência maior seria a eficiência do processo, entretanto argumenta que não se sabe qual seria o nível ótimo de turbulência.

c. Influência do tempo de contato na desinfecção

Foi avaliada, também, a influência do tempo de contato sobre a sobrevivência do vibrião. Procurou-se avaliar se a sobrevivência do vibrião para o tempo de contato de 30 minutos era significativamente menor do que a 15 minutos. Foi obtido um F_{ratio} de 0,066 em relação a um $F_{0,05}$ de 4,0 (Quadro II.12 - Anexo II). Logo, a influência do tempo de contato na sobrevivência do vibrião não é significativa.

4.6.5. Correlação dos testes de desinfecção com a Lei de Chick

Os resultados obtidos para a desinfecção de vibriões e coliformes foram analisados através de regressão não linear, para verificar se era possível correlacionar os valores de dosagem e sobrevivência de microrganismos com a Lei de Chick, de acordo com a seguinte expressão:

$$N = N_0 \cdot \exp^{(-K' \cdot C^n \cdot t)}$$

onde:

N = concentração de microrganismos no tempo t ($N^\circ / 100 \text{ ml}$)

N_0 = concentração inicial de microrganismos ($N^\circ / 100 \text{ ml}$)

C = concentração do desinfetante (mg/l)

n = coeficiente de diluição

t = tempo de contato (d)

No presente estudo, considerou-se o coeficiente de diluição (n) igual a unidade e o tempo de contato (t) implícito na constante K'.

a. Correlação entre a desinfecção de vibriões e a Lei de Chick

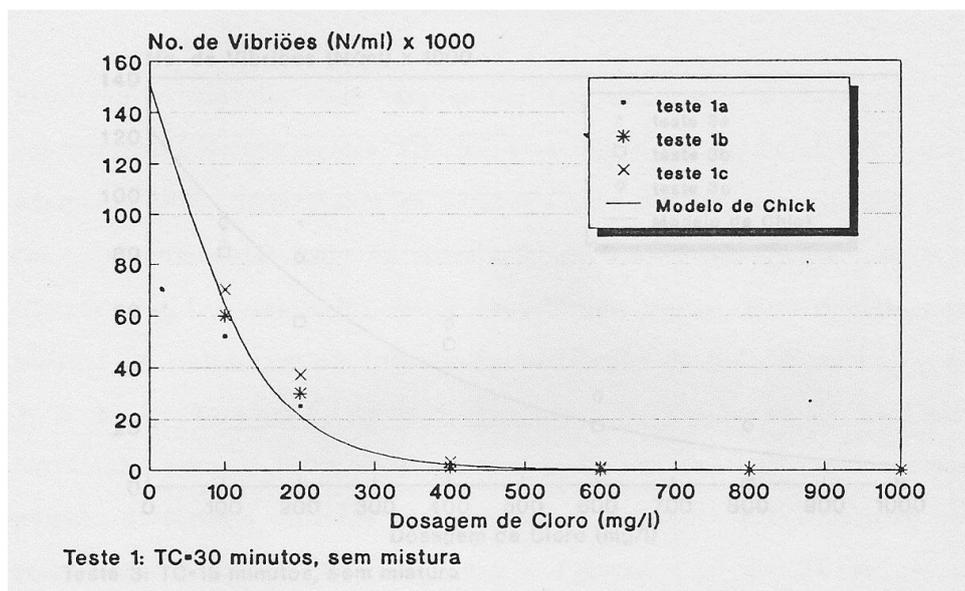
As análises de regressão não linear efetuadas para os testes de desinfecção de vibriões indicaram que os resultados obtidos foram descritos adequadamente pelo modelo de Chick. Os coeficientes de correlação encontrados variaram de 0,88 a 0,97 e os valores dos fatores de variância (F_{ratio}) foram todos superiores a $F_{0,05}$. Apresenta-se, no Quadro 4.6, o resumo dos resultados das análises estatísticas efetuadas. Maiores detalhes são apresentados nos Quadros II.13 a II.16 (Anexo II).

Nas Figuras 4.14 a 4.17 são apresentadas a representação gráfica das curvas de ajuste obtidas.

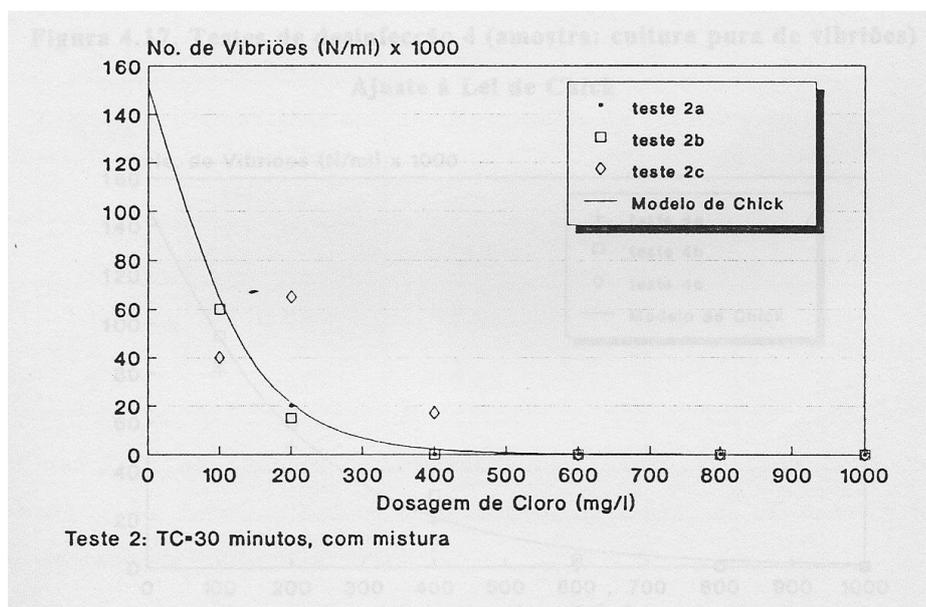
Quadro 4.6 - Análise de Regressão não Linear - Lei de Chick (Culturas puras de vibriões)

Testes de desinfecção	Constante de velocidade (K') (d^{-1})	Resultados da análise estatística		
		R^2	F_{ratio}	$F_{0.05}$
1	0.008	0.97	359.4	3.63
2	0.011	0.95	196.9	3.68
3	0.003	0.88	124.4	3.68
4	0.005	0.97	451.5	3.63

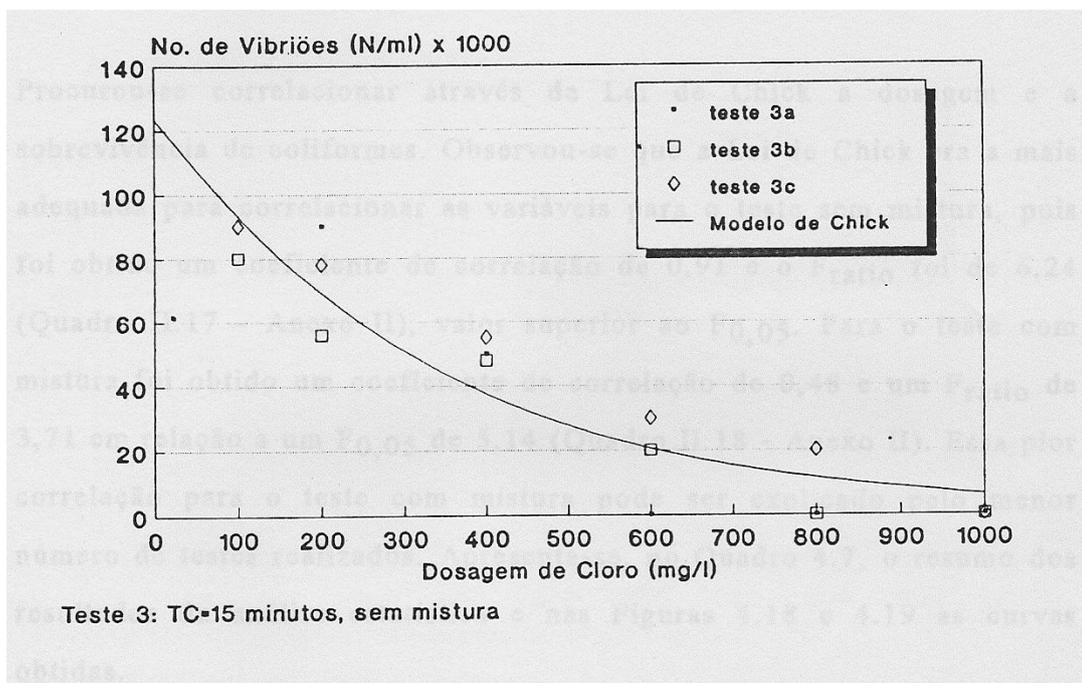
Nota: Para as análises de regressão não linear de cada teste de desinfecção, foram utilizados os resultados das 3 análises efetuadas para cada dosagem.



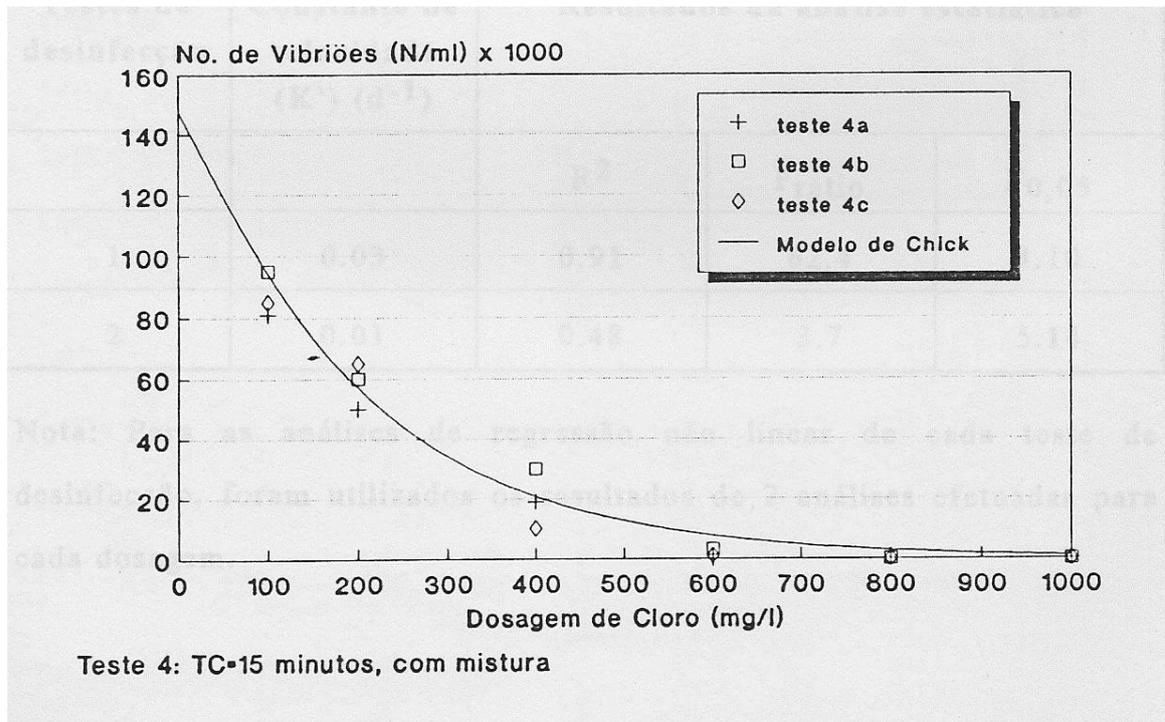
**Figura 4.14. Testes de desinfecção 1 (amostra: cultura pura de vibriões) -
Ajuste à Lei de Chick**



**Figura 4.15. Testes de desinfecção 2 (amostra: cultura pura de vibriões) -
Ajuste à Lei de Chick**



**Figura 4.16. Testes de desinfecção 3 (amostra: cultura pura de vibriões) -
Ajuste à Lei de Chick**



**Figura 4.17. Testes de desinfecção 4 (amostra: cultura pura de vibriões) -
Ajuste à Lei de Chick**

b. Correlação entre a desinfecção de coliformes e a Lei de Chick

Procurou-se correlacionar através da Lei de Chick a dosagem e a sobrevivência de coliformes. Observou-se que a Lei de Chick era a mais adequada para correlacionar as variáveis para o teste sem mistura, pois foi obtido um coeficiente de correlação de 0,91 e o F_{ratio} foi de 6,24 (Quadro II.17 - Anexo II), valor superior ao $F_{0,05}$. Para o teste com mistura foi obtido um coeficiente de correlação de 0,48 e um F_{ratio} de 3,71 em relação a um $F_{0,05}$ de 5,14 (Quadro II.18 - Anexo II). Essa pior correlação para o teste com mistura pode ser explicado pelo menor número de testes realizados. Apresenta-se, no Quadro 4.7, o resumo dos resultados da análise estatística e nas Figuras 4.18 e 4.19 as curvas obtidas.

Quadro 4.7. Análise de regressão não linear - Lei de Chick (amostra de fezes)

Testes de desinfecção	Constante de velocidade (K') (d ⁻¹)	Resultados da análise estatística		
		R ²	F _{ratio}	F _{0,05}
1	0.03	0.91	62.4	4.10
2	0.01	0.48	3.7	5.14

Nota: Para as análises de regressão não linear de cada teste de desinfecção, foram utilizados os resultados de 2 análises efetuadas para cada dosagem.

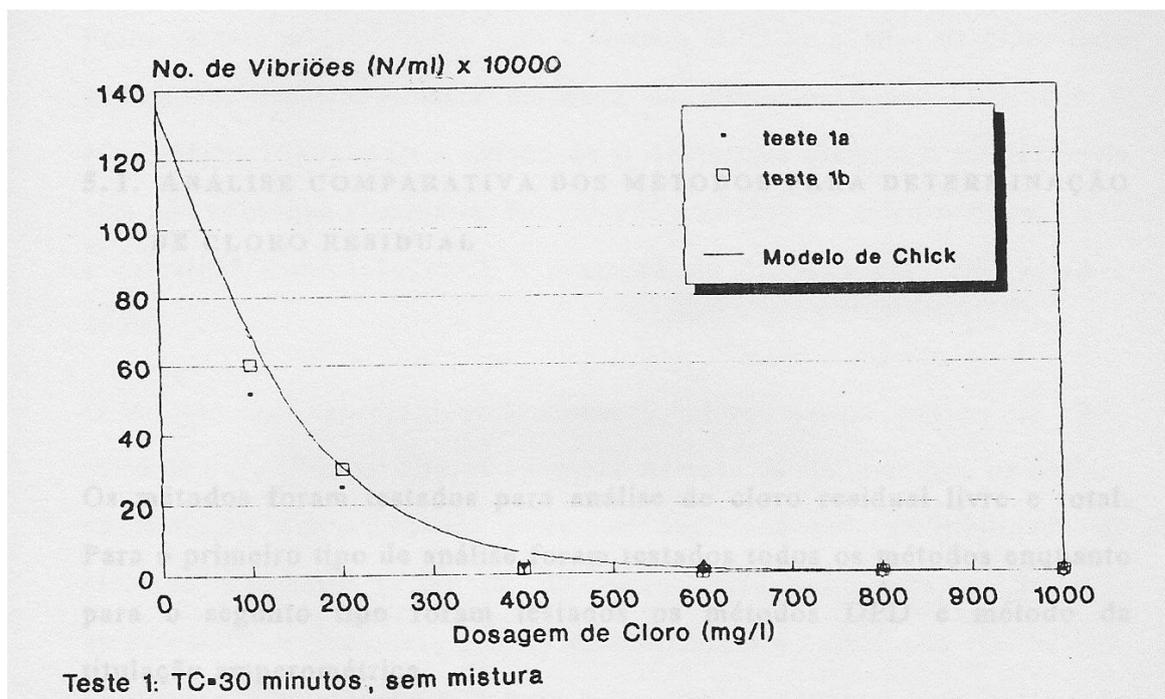


Figura 4.18. Testes de desinfecção 1 (amostra: fezes)

Ajuste à Lei de Chick

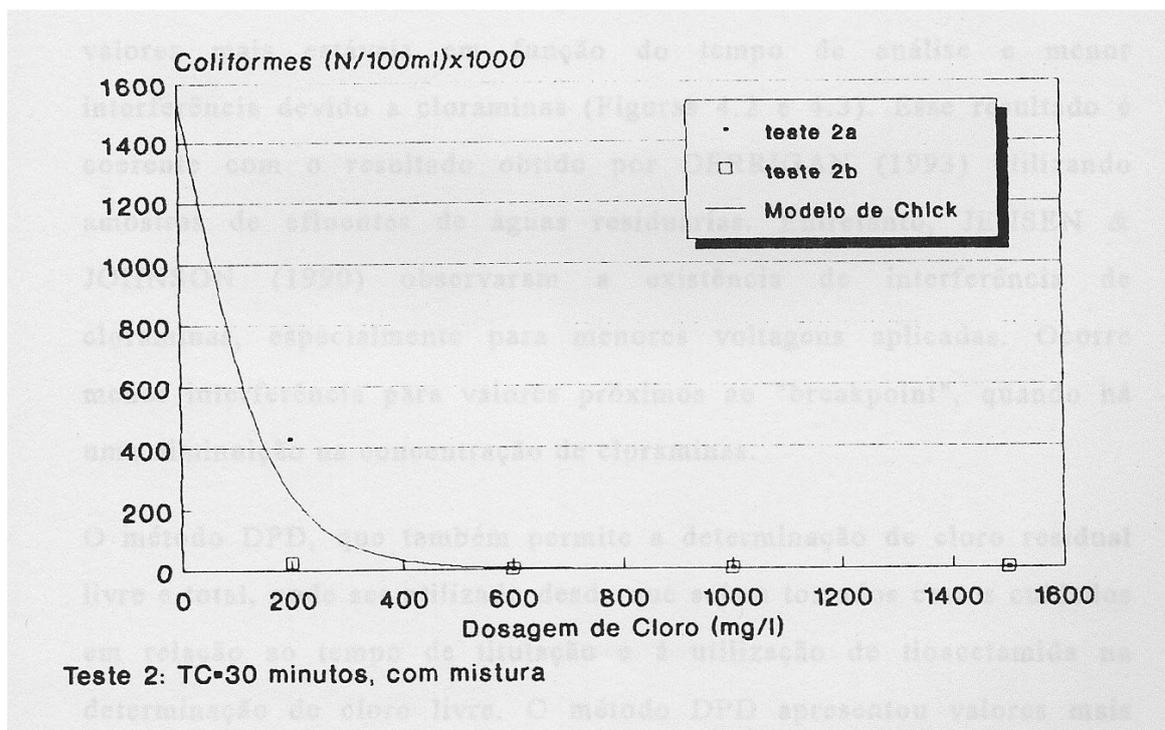


Figura 4.19. Testes de desinfecção 2 (amostra: fezes)

Ajuste à Lei de Chick

5. DISCUSSÕES

5.1. ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE CLORO RESIDUAL

Os métodos foram testados para análise de cloro residual livre e total. Para o primeiro tipo de análise foram testados todos os métodos enquanto para o segundo tipo foram testados os métodos DPD e método da titulação amperométrica.

Para a determinação de cloro residual livre e total pode-se observar que o método da titulação amperométrica seria o mais indicado, apresentando valores mais estáveis em função do tempo de análise e menor interferência devido a cloraminas (Figuras 4.2 e 4.3). Esse resultado é coerente com o resultado obtido por DERRIGAN (1993) utilizando amostras de efluentes de águas residuárias. Entretanto, JENSEN & JOHNSON (1990) observaram a existência de interferência de cloraminas, especialmente para menores voltagens aplicadas. Ocorre menor interferência para valores próximos ao "breakpoint", quando há uma diminuição na concentração de cloraminas.

O método DPD, que também permite a determinação de cloro residual livre e total, pode ser utilizado desde que sejam tomados certos cuidados em relação ao tempo de titulação e à utilização de tioacetamida na determinação de cloro livre. O método DPD apresentou valores mais

elevados que os demais métodos, tanto para a análise de cloro residual livre quanto para a análise de cloro residual total (Figura 4.1, 4.2, 4.3). Esses valores mais elevados para o método DPD na análise de cloro livre podem ser explicados pela presença de monocloraminas (JENSEN & JOHNSON, 1989), pois a adição de tioacetamida diminui a interferência mas não consegue eliminá-la. Em relação à análise de cloro residual total, a principal explicação seria a presença de dicloraminas (DERRIGAN, 1993).

O método ORP apresentou os menores valores para a análise de cloro residual livre (Figura 4.1). A obtenção de valores menores que os obtidos na titulação amperométrica pode ser explicada pela possibilidade do eletrodo fornecer a leitura de cloro livre, enquanto a titulação amperométrica forneceria a soma de cloro livre e combinado (GORDON, 1988). O método ORP é o método mais simples, rápido e econômico (não há gastos com reagentes).

5.2. ANÁLISE DOS TESTES DE SOBREVIVÊNCIA DE VIBRIÕES

Os valores obtidos nos testes de sobrevivência de vibriões (Figura 4.6) são próximos aos valores obtidos por CHENG (1963) que, na temperatura de 29-31°C, observou uma sobrevivência de 2 a 4 dias para o vibrião em amostras infectadas artificialmente. A sobrevivência do vibrião é função da temperatura e características da amostra. Para amostras mais líquidas o tempo de sobrevivência é maior.

SHODA (1934) avaliou a sobrevivência do *Vibrio cholerae* - biotipo clássico, na temperatura de 4°C, para fezes naturalmente infectadas e obteve tempos de 1 a 5 dias. Para fezes infectadas artificialmente, na temperatura ambiente, foi obtido um valor de 0,5 a 2 dias, enquanto a 37°C a sobrevivência foi de 6 horas.

A maioria dos trabalhos realizados sobre a sobrevivência do vibrião se refere ao biotipo clássico, apenas CHENG (1963) realizou pesquisas sobre o biotipo "El Tor" e os resultados obtidos não revelam grande diferença entre o tempo de sobrevivência do vibrião em fezes naturalmente infectadas (1 a 4 dias) e fezes artificialmente infectadas.

5.3. ANÁLISE GLOBAL DOS TESTES DE DESINFECÇÃO

Comparando-se os resultados dos testes de desinfecção de vibriões em cultura pura e amostra de fezes pôde-se observar que necessidade de adicionar mais desinfetantes para a amostra de cultura pura. Esse resultado poderia ser explicado pelo fato do vibrião em cultura pura estar no ambiente ideal para a sua sobrevivência ou seja em água peptonada alcalina (BRASIL, 1990; FEACHEM et al., 1983). Além disso, sabe-se que o vibrião é um mau competidor (BRASIL, 1990) e um organismo menos resistente aos processos de tratamento de esgotos (FEACHEM et al., 19983), logo a presença de coliforme, juntamente com a ação do desinfetante poderia favorecer a eliminação mais rápida do vibrião em amostra de fezes, apesar da presença de matéria orgânica e sólidos em suspensão na amostra.

Para a amostra de fezes, observou-se a necessidade de uma dosagem mais elevada de cloro para desinfecção da amostra, considerando-se tempo de contato de 30 minutos, sem mistura. Esses resultados demonstram que a matéria orgânica e o nitrogênio presentes na amostra causam uma elevação na dosagem de cloro necessária à desinfecção (METCALF & EDDY, 1979; SNOYEINK & JENKINS, 1980).

5.3.1. Cloro residual e eficiência da desinfecção

Os resultados obtidos na desinfecção de fezes demonstraram que a eliminação de coliformes fecais na amostra ocorreu para uma dosagem de cloro inferior à necessária para aparecimento de cloro livre. Ou seja, o cloro residual combinado exerceu um poder desinfetante suficiente para a eliminação dos coliformes fecais, mesmo em dosagens inferiores à do "breakpoint".

O poder desinfetante do cloro residual combinado foi demonstrado por METCALF & EDDY (1979), que apresenta uma correlação para a sobrevivência bacteriana ($N_t N_0$) com os valores de cloro residual total e o tempo de residência, para desinfecção de efluente com tratamento primário, segundo a seguinte equação

$$\frac{N_t}{N_0} = (1 + 0,23C_t t)^{-3}$$

onde:

t = tempo de contato (min)

N_t = nº de organismos no tempo " t "

N_0 = nº de organismos no tempo " t_0 "

C_t = cloro residual total no tempo " t " (mg/s)

WOLFE (1984) considera que a utilização de cloraminas inorgânicas como desinfetante requereria uma concentração mais elevada ou tempos de contato maiores que os necessários para desinfecção com cloro livre. No

presente trabalho, a concentração extremamente elevada de cloro residual total explicaria a ocorrência de desinfecção antes do "breakpoint".

Nas figuras 5.1 e 5.2 são comparados os valores de cloro residual total e livre e o número de coliformes em função da dosagem de cloro.

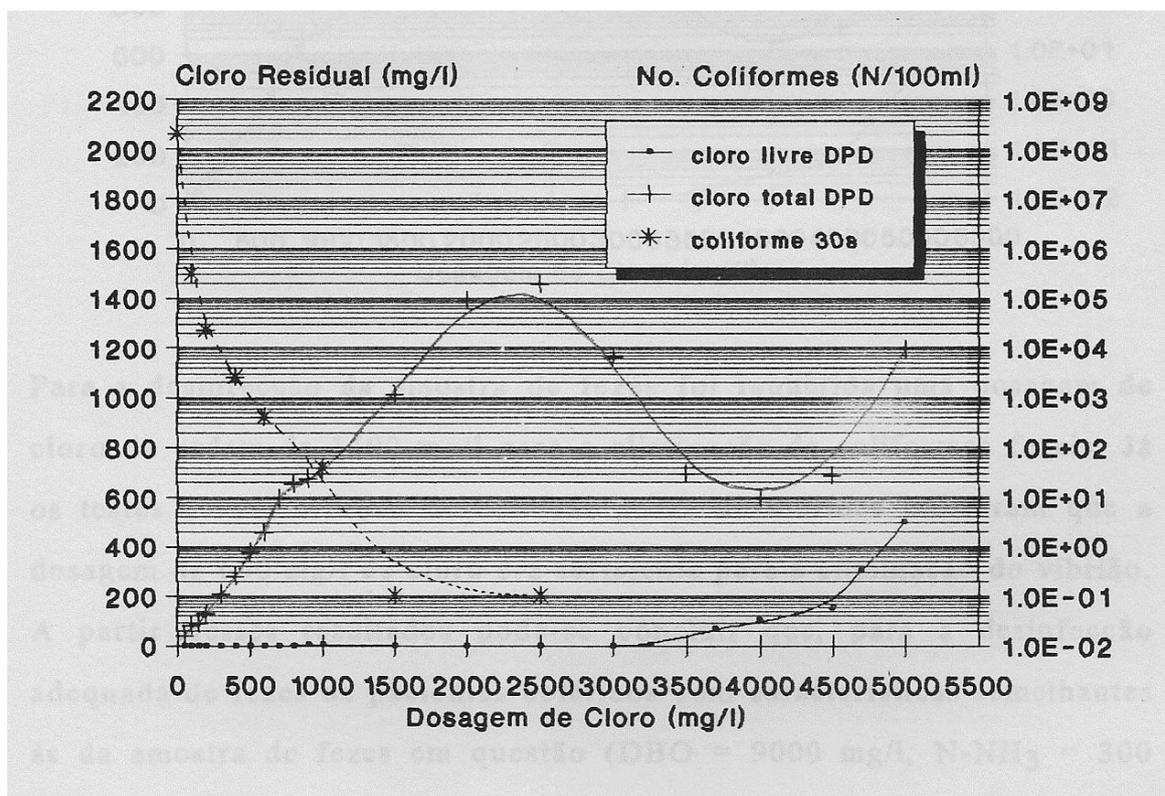


Figura 5.1 - Curva do breakpoint e sobrevivência de coliformes (fezes) para TC = 30 min, sem mistura.

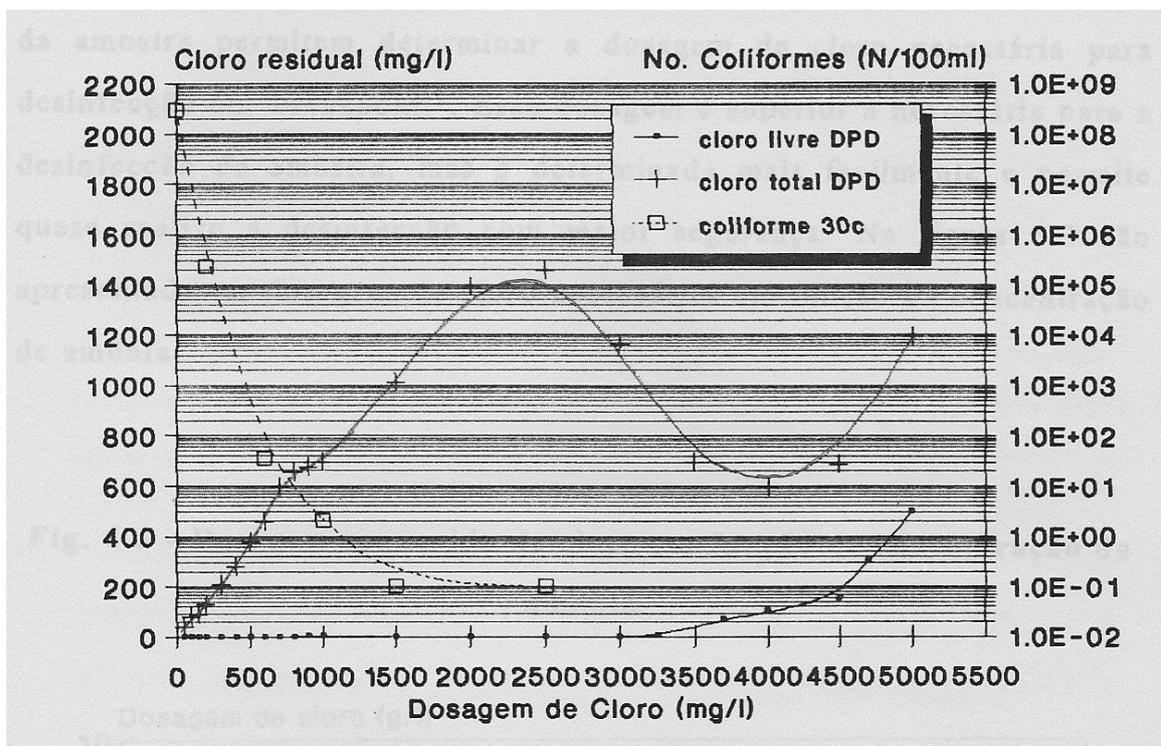


Figura 5.2 - Curva do "breakpoint" e sobrevivência de coliformes (fezes) para TC = 30 min, com mistura.

Para a desinfecção da amostra de fezes foi requerida uma dosagem de cloro da ordem de 1500 mg/l para a eliminação de coliformes fecais. Já os testes de desinfecção de culturas puras de vibriões indicaram que a dosagem de 600 mg/l de cloro era suficiente para a eliminação do vibrião. A partir desses resultados pode-se concluir que, para a desinfecção adequada de fezes de pacientes coléricos com características semelhantes às da amostra de fezes em questão ($DBO = 9000 \text{ mg/l}$, $N-NH_3 = 300 \text{ mg/l}$), uma dosagem de cloro da ordem de 1500 mg/l e um tempo de contato de 30 minutos são suficientes.

Para amostras com características diferentes da estudada, seria necessário a realização de testes de desinfecção que permitissem a determinação da dosagem de cloro para a desinfecção das mesmas. Isso seria trabalhoso e demandaria muito tempo.

Entretanto, a utilização da razão molar, entre concentração de cloro e amônia, obtidas para o "breakpoint" (2, 63) e da concentração de amônia da amostra permitem determinar a dosagem de cloro necessária para desinfecção do "breakpoint". Essa dosagem é superior à necessária para a desinfecção da amostra, mas é determinada mais facilmente e permite que se realize a desinfecção com maior segurança. Na figura 5.3 são apresentadas as dosagens de cloro necessárias em função da concentração de amônia.

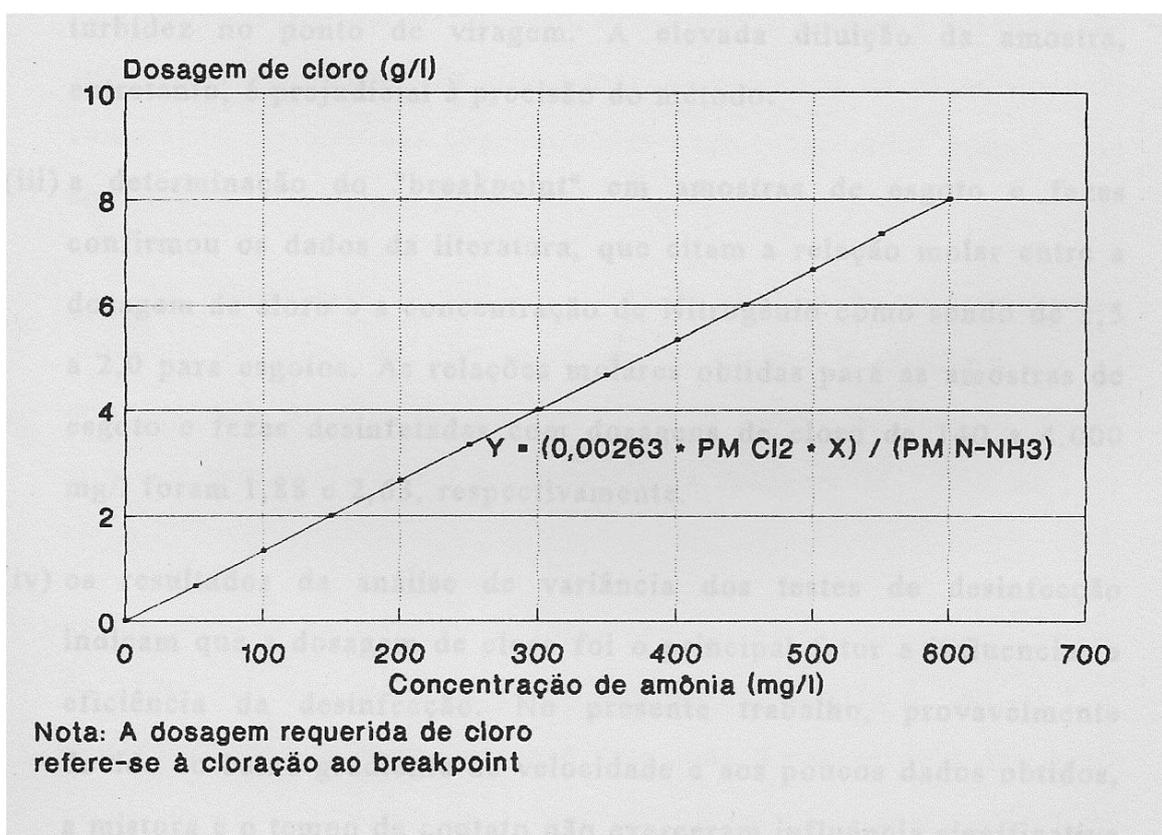


Figura 5.3 - Dosagem requerida de cloro em função da concentração de amônia

6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

- (i) para avaliação de cloro livre e cloro total em amostra de esgoto, o método da titulação amperométrica demonstrou ser o mais indicado, apresentando valores mais estáveis em função do tempo e estando menos sujeito à interferência, na diluição de 1:10. Entretanto, apresentou uma boa correlação com o método DPD (98,6% para cloro total e 99,6% para cloro livre) e com o método ORP
- (ii) a utilização do método DPD em amostra de fezes foi satisfatória para diluição de 1:100, que era suficiente para eliminar a interferência da turbidez no ponto de viragem. A elevada diluição da amostra, entretanto, é prejudicial à precisão do método.
- (iii) a determinação do "breakpoint" em amostras de esgoto e fezes confirmou os dados da literatura, que citam a relação molar entre a dosagem de cloro e a concentração de Nitrogênio como sendo de 1,5 a 2,0 para esgotos. As relações molares obtidas para as amostras de esgoto e fezes desinfetadas com dosagens de cloro de 140 a 4.000 mg/l foram 1,88 e 2,63, respectivamente.
- (iv) os resultados da análise de variância dos testes de desinfecção indicam que a dosagem de cloro foi o principal fator a influenciar a eficiência da desinfecção. No presente trabalho, provavelmente devido ao baixo gradiente de velocidade e aos poucos dados obtidos, a mistura e o tempo de contato não exerceram influência significativa na sobrevivência de coliformes e vibriões.

- (v) os resultados dos testes de desinfecção que relacionaram o decaimento de coliformes e vibriões em função da dosagem de cloro ajustaram-se adequadamente à Lei de CHICK, com coeficientes de correlação variando de 0,88 a 0,97. Em apenas um teste o coeficiente de correlação foi baixo, possivelmente devido aos poucos resultados disponíveis.
- (vi) os testes de sobrevivência do vibrião nas temperaturas de 4 e 25°C confirmaram sua maior sobrevivência para baixas temperaturas. Os resultados obtidos indicam que a 4°C o tempo de sobrevivência é de 48 horas e a 25°C é de 24 horas.
- (vii) a desinfecção de coliformes em amostra de fezes ocorreu para uma dosagem inferior à do "breakpoint". Embora a presença de cloro livre seja um indicador da desinfecção, não é necessário uma dosagem tão alta para a eliminação de coliformes. A presença de cloro residual combinado em elevadas concentrações exerce um poder desinfetante equivalente ao do cloro livre.
- (viii) na desinfecção de culturas puras de vibrião foi necessária uma dosagem de cloro de 600 mg/l em um tempo de contato de 30 minutos, sem mistura da amostra. Para o tempo de contato de 15 minutos, sem mistura, foi necessária uma dosagem de 1.000 mg/l de cloro.
- (ix) na desinfecção da amostra de fezes com concentração de coliformes de 2×10^8 por 100 ml, $DBO_5 = 9.000$ mg/l e $N-NH_3 = 300$ mg/l, a eliminação de coliformes ocorreu para uma dosagem de 1.500 mg/l de cloro, em um tempo de contato de 30 minutos, sem mistura da amostra.
- (x) para a desinfecção adequada de fezes de pacientes coléricos com características semelhantes às da amostra de fezes em questão ($DBO =$

9.000 mg/l, N-NH₃ = 300 mg/l) uma dosagem de cloro da ordem de 1.500 mg/l e um tempo de contato de 30 minutos são suficientes.

Para amostras com características diferentes da estudada, seria necessário a realização de testes de desinfecção que permitissem a determinação da dosagem de cloro necessária para a desinfecção do mesmo. Isso seria trabalhoso e demandaria muito tempo. Entretanto, a utilização da razão molar obtida para a cloração ao "breakpoint" (2,63) e da concentração de amônia da amostra permite a determinação da dosagem de cloro necessária para o "breakpoint". Essa dosagem é superior à necessária para a desinfecção da amostra, mas é determinada mais facilmente e permite que se desinfete a amostra com uma maior margem de segurança;

Recomendações:

Face aos resultados obtidos no presente trabalho, recomenda-se:

- (i) a realização de testes de desinfecção adicionais, utilizando-se gradiente de velocidade superiores a 100 s⁻¹ e diferentes tempos de contato, objetivando-se confirmar a influência dessas variáveis no processo de desinfecção;
- (ii) a realização de testes de desinfecção em fezes de pacientes coléricos, para confirmação dos resultados obtidos em fezes de pacientes com diarreia.
- (iii) a realização de pesquisas para avaliação da concentração máxima de amônia em fezes de pacientes coléricos. Tais pesquisas possibilitarão a estabelecimento de acordo com a relação molar cloro:amônia estabelecida para o "breakpoint".

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS SERVIÇOS MUNICIPAIS DE ÁGUA E ESGOTO - ASSEMAE - Cólera: Uma Doença que vem pelas Águas, Brasília, 1993, 22p.
- AZURIN, J.C. et al. A long-term carrier of cholera: Cholera Dolores. **Bulletin of the World Health Organization**, 37, p.745-749, 1967
- AZURIN, J.C. and RIVERO, M. Field evaluation of environmental sanitation measures against cholera. **Bulletin of the World Health Organization**, 51, p.19-26, 1974.
- BART, K.J.; KHAN, M.; MOSLEY, W.H. Isolation of "*Vibrio cholerae*" from night soil during epidemics of classical and "El Tor" cholera in East Pakistan. **Bulletin of the World Health Organization**, 43, p.421-429, 1970.
- BASTOS, R.K.X. Avaliação de Qualidade Microbiológica das Águas Residuárias com Vista a sua Utilização na Agricultura - Organismos Indicadores de Contaminação. In: **Anais do Seminário Internacional de Desinfecção de Águas de Abastecimento e Residuárias em Países em Desenvolvimento**, 1993. Belo Horizonte: ABES, 1993, p.171-184.,
- BIER, O. Técnicas Bacteriológicas. In: **Bacteriologia e Imunologia**, São Paulo: Melhoramentos, 1976. Cap. 48, p.771-852.
- BRASIL. Ministério da Saúde - BRASIL Comissão Nacional de Prevenção da Cólera. Divisão de Saúde de Portos, Aeroportos e Fronteiras - Transporte Rodoviário, 1990.
- BRASIL. Ministério da Saúde - BRASIL Comissão Nacional de Prevenção da Cólera. Saneamento na Prevenção da Cólera, 1991.
- BRISCOE, J. The hole of water supply in improving health in poor countries (With special reference to Bangladesh). **American Journal of Clinical Nutrition**, 31, p.2100-2113, 1978.
- BUTTERFIELD, C.T. et al. Influence of pH and Temperature on the Survival of Coliforms and Enteric Pathogens When Exposed to Free Chlorine. **U.S. Pub. Health Rep.** 58:1837-1866, 1943 apud ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY-EPA. Municipal Wastewater Disinfection. EPA 6521-86921, Cincinnati, 1986.

- CAMPOS, J.R. Uma Abordagem sobre a Desinfecção de Esgotos no Brasil. In: **Anais do Seminário Internacional de Desinfecção de Águas de Abastecimento e Residuárias em Países em Desenvolvimento**, 1993, Belo Horizonte: ABES, 1993, p.135-170.
- CASH, R.A. et al. Response of men to infection with "*Vibrio cholerae*" 01. Clinical, serologic and bacteriologic responses to a known inoculum. **Journal of Infections Diseases**, 129, p.45-52, 1974.
- CERF, O. Tailing of Survival Curves of Bacterial Spores. **Journal of Applied Bacteriology**. 42, 1, 1977.
- CHENG, C.T. Survival of "El Tor" outside the human body. Nagasaki Igahkai Zassi, 38, 0.870-876, 1963 apud FEACHEM, R.G. et al. "*Vibrio cholerae*" and Cólera. In: **Sanitation and Disease: Health Aspects of Excreta and Wastewater Management**, London: John Wiley & Sons, 1983, Cap. 17, p. 297-325.
- COOPER, W.J.; ROSCHER, N.M.; SLIFKER, R.A. Determining free available chlorine by DPD - colorimetric, DPD - steadifac (colorimetric) and FACTS procedures. **J.A.W.W.A.**, 74, 7, p.362-368, 1982.
- CYJETANOVIC, B. Sanitation versus immunization in control of enteric and diarrhoeal diseases. **Progress in Water Technology**, 11, p.81-87, 1979.
- DANIEL, L.A. & CAMPOS, J.R. Metodologia Simplificada para Determinação de Parâmetros Cinéticos de Desinfecção com Radiação Ultravioleta. In: **Anais do Seminário Internacional de Desinfecção de Águas de Abastecimento e Residuárias em Países em Desenvolvimento**, 1993. Belo Horizonte: ABES, 1993, p.229-237.
- DERRIGAN, J.; LIN, L.Y. & JENSEN, N. Comparison of free and total chlorine measurement methods in municipal wastewaters. **Water Environment Research**, 3, 65, p.205-212, 1993.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY-EPA. Municipal Wastewater Disinfection. EPA 6521-86921, Cincinnati, 1986.
- ESPOSITO, M.P. The inactivation of Viruses in Water by Dichloramine. Cincinnati: University of Cincinnati, Ohio, 1974. Master's Thesis. University of Cincinnati, 1974 apud WOLFE, R.L.; VARD, N.R.; OLSON, B.H. Inorganic Chloramines as drinking Water Disinfectants: a Review. **Reseach and Technology**, 76, 5, p.74-88, 1984.
- FAIR, G.M. et al. The behavior of chlorine as a water disinfectant. **J.A.W.W.A.**, 40, 1051, 1948.

- FEACHEM, R.G. et al. *Vibrio cholerae* and Cólera. In: Sanitation and Disease: Health Aspects of Excreta and Wastewater Management, London: John Wiley & Sons, 1983. Cap 17, p.297-325.
- GASI, T.M.T.; VIEIRA, S.M.M.; PACHECO, C.E.M. Resultados preliminares de cloração de efluente de Digestor Anaeróbico de Fluxo Ascendente Tratando Esgotos Domésticos. In: **Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, 14, 1987. São Paulo: ABES; 1987, p.276-290.
- GELLIO, D.S. *Vibrio cholerae* em alimentos. Aspectos Gerais. **Institute Adolf Lutz**. 1993, 20p.
- GOEHRING, E.G. Ammonia-chlorine Treatment at Beaver Falls end New Brighton, Pa. **J.A.W.W.A.**, 23, 9, p.1372-1379, 1931.
- GORDON, G. et al. The chemistry of chlorine dioxide. **Progress in Inorganic Chemistry**, 15, 201, 1972.
- GORDON, G. et al. Methods of measuring disinfectant residuals. **J.A.W.W.A.**, 80, 9, p.94-108, 1988.
- GRIFFIN, A.E. & CHAMBERLIN, N.S. Exploring the Effects of Heavy Doses of Chlorine in Sewage. **Sewage Works Journal**, 17, p.730-742, 1945.
- HORNICK, R.B. et al. The Broad Street pump revisited: response of volunteers to ingested cholera vibrios. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, 47, p.1881-1891, 1971.
- HUNT, M.D. et al. Seroepidemiology of Cholera in Gulf Coastal Texas. **Applied and Environmental Microbiology**, 54, 7, p.1673-1677, 1988.
- INTERNATIONAL CENTRE DIARRHOEAL DISEASES RESEACH CHOLERA WORKING GROUP. Large epidemic of cholera - like disease in Bangladesh caused by *Vibrio cholerae*. **Lancet**, v. 342, p. 387-390, 1993.
- JENSEN, J.N. & JOHNSON, J.D. Specificity of the DPD and amperometric titration Methods of free availabel chlorine: a review. **J.A.W.W.A.**, 81, 12, p.59-64, 1989.
- JENSEN, J.N. & JOHNSON, J.D. Interferences by monochloramine and organic chloramines in free available chlorine methods: 1. amperometric titration. **Environmental Science & Technology**, 24, 7, p.981-985, 1990a.
- JENSEN, J.N. & JOHNSON, J.D. Interferences by monochloramine and organic chloramines in free available chlorine methods: 2. N,N -

- Diethyl-p-phenylenediamine. **Environmental Science & Technology**, 24, 7, p.985-990, 1990b.
- KELLERMAN, K.E. et al. The Disinfection of Sewage Effluents for the Protection of Public Water Supplies. **U.S.Dep.Agr.Bur.Plant.Ind., Bulletin**, 115, 1907 apud ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Municipal Wastewater Disinfection, EPA 6251-86021, Cincinnati, OH, 1986.
- KELLY, S.M. & SANDERSON, W.W. The effects of chlorine in water on enteric viruses 2. The effects of combined chlorine on poliomyelitis and coxsackie viruses. **American Journal Public Health**, 55, 1, p.14-18, 1960.
- KELLY, S.M. & STROH, E.M.D. Temporal Relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in Patients and the Environment. **Journal of Clinical Microbiology**, 26, 9, p.754-1756, 1988.
- KHAN, M. & SHAHIKULLAH, M. Cholera due to the "El Tor" biotype equals the classical biotype in severity and attack rates. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 83, p.35-39, 1980.
- KUMAR, K. et al. Atom Transfer Redox Kinetics: General - Acid - Assisted Oxidation of Iodide by Chloramine and Hypochlorite. **Inorganic Chemistry**, 25, p.4344-4349, 1986.
- LEE, N.E. et al. Ultraviolet Irradiation of Municipal Wastewater: Evaluation of effects on Organic Constituents. **Environ. Inst.**, 7, p.403-407, 1982.
- LONGLEY, K.E. Turbulence Factors in Chlorine Disinfection of Wastewater. **Water Research**, 12, p.813-820, 1978.
- LONGLEY, K.E. Disinfection of Wastewater. In: **Anais do Seminário Internacional de Desinfecção de Águas de Abastecimento e Residuárias em Países em Desenvolvimento**, 1993. Belo Horizonte: ABES, 1993, p.119-134.
- MENDONÇA, S.R. Lagoas de Estabilização e Aeradas Mecanicamente: Novos Conceitos. João Pessoa: CAGEPA, 1990.
- MHALU, F.S.; MMARI, P.W. & ISUMBA, J. Rapid emergence of "El Tor" *Vibrio cholerae* resistant to antimicrobial agents during first six months of fourth cholera epidemic in Tanzania. **Lancet**, 1, p.345-347, 1979.
- METCALF & EDDY. Wastewater Engineering, 2^a ed. McGraw Hill, New York, NY, 1979.

- MILLER, G.M. et al. An Assessment of Ozone and Chlorine Dioxide for Treatment of Municipal Water Supplies. EPA 600/8-78-018, NTIS N° PB-288196, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, 1978.
- MITCHAM, R.P.; SHELLEY, M.W.; WHEADON, C.M. Free Chlorine Versus Ammonia - Chlorine: Disinfection, Trihalomethane Formation and Zooplankton Removal. **J.A.W.W.A.**, 75, 4, p.196-199, 1983.
- MORRIS, J.C. The Acid Ionization Constant of HOCl from 5°C to 35°C. **Journal Physical Chemistry**, 70, 1966.
- NAIR, G.B. et al. Ecology of *Vibrio cholerae* in the Freshwater Environs of Calcutta, India. **Microbial Ecology**, 15, 2, p.203-215, 1988a.
- NAIR, G.B. et al. Toxin Profiles of *Vibrio cholerae* Non-01 from Environmental Sources in Calcutta, India. **Applied and Environmental Microbiology**, 54, 12, p.3180-3182, 1988b.
- AZEVEDO NETTO, J.M.A. et al. Técnica de Abastecimento de Água - volume 2 - Tratamento de Água, 3ª ed. São Paulo: CETESB/ASCETESNB, 1987.
- NOACK, M.G. & DOERR, R.L. Chlorine Dioxide, Chlorous Acid and Chlorites. In: **ENCYCLOPEDIA of Chemical Technology**. HF Mark et al. 1979. p.621-632.
- OLIVIERI, R.F. & RIBEIRO S. Ozônio na Desinfecção em Sistemas de Tratamento de Água. In: **Anais do Seminário Internacional de Desinfecção de Águas de Abastecimento e Residuárias em Países em Desenvolvimento**, 1993. Belo Horizonte: ABES, 1993, p.263-274.
- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. La Situación del Cólera en las Américas. **Boletín Epidemiológico**, 12, 1, 1991.
- PALIN, A.T. Analytical Note: a new DPD steadifac Method for Specific determination of free available chlorine in the presence of high monochloramine. **J.A.W.W.A.**, 72, 9, p.74-81, 1984.
- PELLETIER, P.A.; MOULIN, G.C.; STOTTMEIER, K.D. Mycobacteria in public water supplies: comparative resistance to chlorine. **Microbiological Sciences**, 5, 5, 1988.
- PHELPS, E.B. Disinfection of Sewage and Sewage Filter Effluents With a Chapter on the Putrescibility and Stability of Sewage Effluents. **V.S.Geol.Surv.Water Supply Paper**, 229, 1909.
- PONTES, P.P. & CHERNICHARO, C.A.L. Determinação de Cloro Residual em Amostras com Elevada Turbidez e Alta Concentração de Matéria Orgânica. In: **Anais do Seminário Internacional sobre Desinfecção de**

- Águas de Abastecimento e Residuárias em Países em Desenvolvimento**, 1993. Belo Horizonte; ABES, 1993, p.275-310.
- QUALLS, R.G. et al. The role of suspended particles in ultraviolet disinfection. **J.W.P.C.F.**, 55, p.1280-1285, 1983.
- RAM, N.M. & MALLEY Jr., J.P. Chlorine residual monitoring in the presence of N-organic compounds. **J.A.W.W.A.**, 76, 9, p.74-81, 1984.
- REIFF, F.M. Iodination for Disinfection of Small Community Water Systems. In: **Anais do Seminário Internacional de Desinfecção de Águas de Abastecimento e Residuárias em Países em Desenvolvimento**, 1993. Belo Horizonte: ABES, 1993, p.75-96.
- RIDEAL, S. On the Sterilization of Effluents. Jour. Royal Sant. Inst. London. 31, 2, 33, 1905 apud WOLFE, R.L.; WARD, N.R.; OLSON, B.H. Inorganic Chloramines as Drinking Water Disinfectants: A Review. **Research and Technology**. 75, 5, p.74-88, 1984.
- RUDD, T. & HOPKINSON, L.M. Comparison of Disinfection Techniques for Sewage and Sewage Effluents. **J.I.W.E.M.**, 3, p.612-618, 1989.
- SÃO PAULO, Secretaria do Estado de Saúde - SES/SP. Centro de Vigilância Sanitária. Prevenção da Cólera - Vigilância Sanitária em Serviços de Saúde - Manual de Procedimentos, 1991.
- SEPP, E. Optimization of Chlorine Disinfection Efficiency. **Journal of the Environmental Engineering Division**. p.107-114, 1981.
- SHODA, T. et al. The viability of Cholera Vibrio in the human excreta. **Journal of the Public Health Association of Japan**, 10, p. 1-9, 1934 apud FEACHEM, R.G. et al. *Vibrio cholerae* and Cólera. In: **Sanitation and Disease: Health Aspects of Excreta and Wastewater Management**, London: John Wiley & Sons, 1983. Cap. 17, p. 297-325.
- SMITH, H.L.; FRETER, R. & SWEENEY, F.J. Enumeration of Cholera Vibrios in Fecal Samples. **Journal of Infectious Diseases**, 109, p.31-34, 1961.
- SNOYEINK, V.L. & JENKINS, D. Oxidation - Reduction Reactions. In: ___ Water Chemistry. 3^a ed. New York: John Wiley & Sons, 1980, Cap. 7, p.386-399.
- SINGLETON, F.L. et al. Effects of temperature and Salinity on "*Vibrio cholerae*" growth. **Applied Environmental Microbiology**. 44, p.1047-1058, 1982.
- SOMMER, A. & MOSLEY, W.H. Ineffectiveness of Cholera Vaccination as an epidemic control measures. *Lancet*, 1, p.1232-1235, 1973. apud FEACHEM, R.G. et al. *Sanitation and Disease: Health Aspects of*

- Excreta and Wastewater Management, London: John Wiley & Sons, 1983, Cap. 17, p.297-325.
- STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 18^a ed. Washington, D.C., 1992.
- STOVER, E.L. & JARNIS, R.N. Engineering and Economic Aspects of Wastewater Disinfection With Ozone under Stringent Bacteriological Standards. **Ozone Science Eng.**, 2, p.159-170, 1980.
- STRUPLER, N. The extent of monochloramine interference in the DPD colorimetric method for free chlorine in water. **J. Inst. Water. Engrs & Scientists**, 39, 2, p.134, 1985.
- SUNG, R.D. Effects of Organic Constituents in Wastewater on the Chlorination Process. Davis: California. University of California, 1974. Ph.D. Thesis. Department of Civil Engineering University of California, 1974 apud METCALF & EDDY. Wastewater Engineering, 2^a ed. McGraw Hill, New York, NY, 1979.
- THREFALL, E.J.; ROWE, B.; HOQ, I. Plasmid - encoded multiple antibiotic resistance in *Vibrio cholerae* "El Tor" from Bangladesh. **Lancet**, 1, p.1247-1248, 1980.
- TOWNER et al. Resistance to antimicrobial agents of *Vibrio cholerae* "El Tor" stains isolated during the fourth cholera epidemic in the United Republic of Tanzania. **Bulletin of the World Health Organization**, 58, p.747-751, 1980.
- TRABULSI, L.R. Vibrio. In: ___ Microbiologia. 2^a ed. São Paulo: Livraria Atheneu, 1991. Cap. 30, p.165-166.
- TRASK, J.O.; MELNICK, J.L.; WENNER, H.A. Chlorination of Human, Monkey - Adapted and Mouse Strains of Poliomyetitis Virus. **American Journal Hygiene**. 41, p.20-27, 1945.
- VENOSA, A.D. Current state-of-the-art of wastewater disinfection. **Journal of Water Pollution Control Federation**. 55, 5, p.457-466, 1983.
- VOGT, C. & REGLI, S. Controlling Trihalomethanes While Attaining Disinfection. **J.A.W.W.A.**, 73, 1, p.33-37, 1981.
- WALLACE & TIERNAN. Introduction book for W & T equipment. 46 series pulsemate controllers. Book no WAAA 460200. Issue B. ECN 20927, 1991.

- WALPOLE R.E. & MYERS, R.H. Probability and Statistics for Engineers and Scientists, 4th ed. Macmillan Publishing Company, New York, NY, 1989.
- WEBER, G.R. et al. Effect of Ammonia on the Germicidal Efficiency of Chlorine in Neutral Solutions. **J.A.W.W.A.**, 32, p.1904-1912, 1940.
- WEIL, J. & MORRIS, J.C. Kinetics studies on the Chloramines. 1 - The Rates of Formation of Monochloramines, N-Chlormethylamine and N-Chlordimethylamine. **Journal of Amer. Chem. Soc.**, 71, p.1664-1669, 1949.
- WEST, P.A. & LEE, J.V. Ecology of Vibrio Species including *Vibrio cholerae* in natural waters of Kent, England. **J. Appl. Bacteriol**, 52, p.435-448, 1982.
- WHITBY, G.E. et al. U.V. disinfection of secondary effluent. **J.W.P.C.F.**, 56, p.844-849, 1984.
- WHITE, G.C. Handbook of Chlorination, 2^a ed. New York: Van Nostrand Reinhold Co., 1980.
- WIGLEY, C.G. Disinfection of Sewage. **Municipal Journal Public Works**, 47, 292-293, 1919 apud ENVIRONMENTAL PROTECTIONS AGENCY. Municipal Wastewater Disinfection. EPA 6251-86021, Cincinnati, OH, 1986.
- WOLFE, R.L.; WARD, N.R.; OLSON, B.H. Inorganic Chloramines as Drinking Water Disinfectants: A review. **Research and Technology**. 76, 5, 1984.