



Universidade Federal de Uberlândia

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE *Escherichia coli* EM
ÁGUA UTILIZANDO AZUL DE METILENO E ROSA DE BENGALA**

RENATA OLIVEIRA SANTOS

UBERLÂNDIA – MG

2014



Universidade Federal de Uberlândia

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE *Escherichia coli* EM
ÁGUA UTILIZANDO AZUL DE METILENO E ROSA DE BENGALA**

RENATA OLIVEIRA SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

Orientação: Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira

Uberlândia – MG

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU – MG, Brasil

- S237e Santos, Renata Oliveira, 1987-
2013 Estudo da inativação fotodinâmica de *Escherichia coli* em água
utilizando azul de metileno e rosa de bengala / Renata Oliveira Santos. - 2013.
56 f. : il.
Orientador: Carlos Alberto de Oliveira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Química.
Inclui bibliografia.
1. Química - Teses. 2. Águas residuais - Tratamento - Teses. 3.
Escherichia coli - Teses. 4. Corantes - Teses. I. Oliveira, Carlos Alberto de. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU: 54



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 185/PPQUI.

DATA: 5/3/2014

DISCENTE: Renata Oliveira Santos

MATRÍCULA: 11212QMI016

TÍTULO DO TRABALHO: Estudo da inativação fotodinâmica de Escherichia coli em água utilizando azul de metileno e rosa de bengala.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Química Ambiental

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Avaliação da atividade fotossensibilizadores sobre o crescimento de culturas de microorganismos utilizando-se lipossomas aditivados como sistema de entrega de drogas – Edital MCT/CNPq nº 14/2010 – Universal.

Às quinze horas e trinta minutos do dia cinco de março do ano dois mil e quatorze, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Bloco 5I, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Vanessa Nunes Alves, da Universidade Federal de Goiás, Silvana Guilardi e Carlos Alberto de Oliveira, do Instituto de Química da UFU, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e A provou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será

Estudo da inativação fotodinâmica de Escherichia coli em água utilizando Azul de metileno e rosa de bengala

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 17 horas e 12 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Profª Dra. Vanessa Nunes Alves

Profª Dra. Silvana Guilardi

UFU

IQUFU

Orientador(a): Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira – IQUFU

*A minha querida vovó,
por seu amor e carinho.
Saudades!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder a graça da vida e por me iluminar sempre. A Jesus Cristo, nosso orientador supremo, que nunca nos deixa perder a fé. A Maria Santíssima, minha mãe amada, que diariamente me envolve com seu manto de amor e luz. Ao meu Anjo da Guarda por toda proteção e auxílio diários e a todos os espíritos de luz que nos auxiliam na nossa caminhada terrena.

Aos meus pais, Cairo e Ildení, que sempre me deram carinho, amor, educação, que me deram (e dão) sustentação para seguir o caminho da vida. Obrigada por me amarem tanto e por estarem sempre presentes.

A minha irmã, Marcela Catarina, meu porto seguro, minha melhor amiga, que mesmo distante geograficamente está sempre presente na minha vida.

A minha amada vovó, Maria de Lourdes, que esteve presente durante toda a minha vida, acompanhando parte do meu mestrado e que mesmo partindo para o plano espiritual recentemente, nos deixou grandes ensinamentos, amor e muitas saudades.

Ao meu namorado Lucas que torna meus dias mais felizes, por sua companhia, amor e carinho, além de sempre me incentivar e me auxiliar no trabalho laboratorial. Obrigada por não ter me deixado desistir, quando me faltava o chão. A sua mãe, Gislaine, por todo o carinho e orações que me dedica.

Aos meus queridos amigos que compreendem que os amo mesmo não podendo estar sempre presente, Camilla, Taís, Lara, Larissa, Carolina, Thiago, Ana Paula, Anelize, Juliana e Tamara.

Aos meus companheiros de Labiofot, Ana Caroline, Marina, Erick, Ludmilla e Natália, pela amizade e motivação.

Ao Bruno Garcês, pela imensa ajuda em desenrolar a triste situação da defesa desta dissertação.

Ao Vinícius Paiva e ao Ildo Borges, pela amizade e importante ajuda aos meus testes laboratoriais.

Ao DMAE (Departamento Municipal de Água e Esgoto) de Uberlândia por fornecer as amostras de efluente da Estação de Tratamento de Esgoto.

A querida secretária da pós-graduação, Mayta Mamede, pelo carinho, dedicação e por sempre ter boa vontade em nos ajudar.

Ao secretário do Instituto de Química, Mário, pelos pequenos grandes auxílios, sempre com bom humor e disposição.

Ao Laboratório de Microbiologia da UFU por nos fornecerem as cepas de *Escherichia coli*.

Aos diversos professores que tive desde a educação infantil até a pós-graduação. Sem seus ensinamentos, paciência e dedicação eu não teria conseguido chegar até aqui.

Ao CNPq pelo fomento à pesquisa e à CAPES pela bolsa concedida.

*"Senhor,
ensina-nos a orar sem esquecer o trabalho,
a dar sem olhar a quem,
a servir sem perguntar até quando,
a sofrer sem magoar seja a quem for,
a progredir sem perder a simplicidade,
a semear o bem sem pensar nos resultados,
a desculpar sem condições,
a marchar para a frente sem contar os obstáculos,
a ver sem malícia,
a escutar sem corromper os assuntos,
a falar sem ferir,
a compreender o próximo sem exigir entendimento,
a respeitar os semelhantes sem reclamar consideração,
a dar o melhor de nós, além da execução do próprio dever
sem cobrar taxas de reconhecimento.*

*Senhor,
fortalece em nós a paciência para com as dificuldades
dos outros, assim como precisamos da paciência dos outros
para com as nossas próprias dificuldades.
Ajuda-nos para que a ninguém façamos aquilo
que não desejamos para nós.
Auxilia-nos sobretudo a reconhecer que a nossa
felicidade mais alta será invariavelmente
aquela de cumprir os desígnios, onde e
como queiras, hoje, agora e sempre."*

(Emmanuel - Mensagem psicografada por Chico Xavier)

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1:</i> Estrutura química do Rosa de Bengala e do Azul de Metileno (ERGAIEG; SEUX, 2009).	16
<i>Figura 2:</i> Moringa oleífera Lam. a) Árvore b) Vagens c) Sementes d) Sementes sem casca e) Pó (PRITCHARD et al., 2010).....	20
<i>Figura 3 :</i> Estrutura química da quitosana (SILVA, SANTOS, FERREIRA, 2006)....	21
<i>Figura 4:</i> Fonte luminosa PHLS (Policromatic Halogen Light System).....	27
<i>Figura 5:</i> Diluições realizadas nas placas de 96 poços.....	28
<i>Figura 6:</i> Curvas de absorção dos fotossensitizadores.....	32
<i>Figura 7:</i> Emissão do aparelho PHLS	33
<i>Figura 8:</i> Testes de fotoinativação com suspensão bacteriana a) Com irradiação luminosa b) Sem irradiação luminosa.....	34
<i>Figura 9 :</i> Testes de fotoinativação com amostra de efluente a) Com irradiação luminosa b) Sem irradiação luminosa.....	34
<i>Figura 10:</i> Inativação bacteriana causada pelo agente químico hipoclorito de sódio; a) Em amostra de suspensão bacteriana b) em amostra de efluente	35
<i>Figura 11:</i> Após 24h de espera da coagulação de Rosa de Bengala. Béqueres com o fotossensitizador, amostra de esgoto e com os seguintes coagulantes: 1) Quitosana 2)Moringa oleífera 3) Sulfato de alumínio 4) Sem coagulante.....	40

Figura 12: Após 24h de espera da coagulação de Azul de Metileno. Béqueres com o fotossensibilizador, amostra de esgoto e com os seguintes coagulantes: 1) Quitosana 2)Moringa oleífera 3) Sulfato de alumínio 4) Sem coagulante.....41

Figura 13: Espectro de absorção das amostras 3 (sulfato de alumínio+efluente+fotossensibilizador) e 4 (amostra de efluente+fotossensibilizador sem coagulante).....43

Figura 14: Difratoograma de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ comercial e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ Sigma-Aldrich pureza 99%44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais doenças de veiculação hídrica.....	16
Tabela 2: Variação do tempo de irradiação luminosa e a temperatura média obtida na placa de 96 poços.....	36
Tabela 3: Redução da absorção do Fotossensitizador Rosa de Bengala ($4,88 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹) em suspensão bacteriana no comprimento de onda de 543nm.....	38
Tabela 4: Redução da absorção do Fotossensitizador Azul de Metileno ($4,88 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹) em suspensão bacteriana no comprimento de onda de 664nm.....	39
Tabela 5: Redução da absorção do Fotossensitizador Rosa de Bengala ($3,91 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹) em amostra de efluente de esgoto no comprimento de onda de 543nm.....	40
Tabela 6: Redução da absorção do Fotossensitizador Azul de Metileno ($3,91 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹) em amostra de efluente de esgoto no comprimento de onda de 664nm.....	42
Tabela 7: Valores de pH obtidos experimentalmente.....	45

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Inativação Fotodinâmica	15
1.2 Tratamento de águas e efluentes	16
2. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	22
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	24
3.1 METODOLOGIAS	25
3.1.1 Inativação de <i>Escherichia coli</i>	25
3.1.2 Coagulação	29
3.1.2.1 Estudo dos coagulantes	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Inativação de <i>Escherichia coli</i>	32
4.2 Coagulação	37
4.2.1 Estudo dos coagulantes	37
5. CONCLUSÃO	46
6. PROPOSTA DE TRABALHOS FUTUROS	48
7. REFERÊNCIAS	50
8. APÊNDICE	55

RESUMO

O presente trabalho visou desenvolver um procedimento para a desinfecção de águas através da inativação fotodinâmica de micro-organismos e posterior remoção dos fotossensibilizadores. A fotoinativação de *Escherichia coli* foi realizada utilizando sistema de irradiação luminosa PHLS (Policromatic Halogen Light System) e Azul de Metileno e Rosa de Bengala como fotossensibilizadores, corantes catiônico e aniônico, respectivamente. A separação de fases entre os fotossensibilizadores e a amostra analisada foi estudada através de coagulação, sendo utilizadas as sementes de *Moringa oleífera* trituradas, Quitosana em pó e Sulfato de alumínio comercial. Todos os experimentos foram realizados previamente em amostras de *E. coli* (ATCC: 25922) preparadas com turvação de aproximadamente 01 na escala de Mac Farland e posteriormente em amostra de efluente proveniente da Estação de Tratamento de Esgoto de Uberlândia - MG. Os resultados obtidos foram bastante expressivos tanto na fotoinativação, quanto na remoção dos fotossensibilizadores, sendo a *Moringa oleífera* o melhor coagulante utilizado, tendo conseguido remover da amostra de efluente 96,9% do Rosa de Bengala e 75,9% do Azul de Metileno, ambos em uma concentração de $3,91 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Palavras-chave: Inativação fotodinâmica. *Escherichia coli*. Remoção de corantes.

ABSTRACT

This work aimed to develop a procedure for disinfecting water by photodynamic inactivation of microorganisms and subsequent removal of photosensitizers. The *Escherichia coli* photoinactivation was performed using PHLS (Policromatic Halogen Light System) light system irradiation, Methylene Blue and Rose Bengal as photosensitizers, cationic and anionic dyes, respectively. The phase separation between the photosensitizers and the analyzed sample was studied by coagulation, being used the crushed seeds of *Moringa oleifera*, Chitosan powder and commercial Aluminum Sulphate. All experiments were performed previously in samples of *E. coli* (ATCC 25922) prepared with a turbidity of about 01 on the Mac Farland scale and later in a sample of effluent from the Sewage Treatment Plant of Uberlândia - MG. The results were quite significant as much photoinactivation as the photosensitizers removal, being *Moringa oleifera* the best coagulant used, able to remove, from effluent sample, 96.9% Rose Bengal and 75.9% Methylene Blue, both at a concentration of $3,91 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Keywords: Photodynamic inactivation. *Escherichia coli*. Removal Dyes.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Inativação Fotodinâmica

A inativação fotodinâmica ou fotoinativação é o nome dado ao processo, proveniente da terapia fotodinâmica, que causa morte de micro-organismos utilizando luz em conjunto com um corante natural ou sintético, também chamado de fotossensitizador (PERUSSI, 2007). Na presença de oxigênio e de luz de comprimento de onda adequado, o fotossensitizador gera espécies reativas de oxigênio (EROs) que têm tempo de vida extremamente curto e alta reatividade, sendo esse processo chamado de fotossensitização (MACHADO, 2000). É desejável que os fotossensitizadores tenham baixa toxicidade na ausência de luz e elevada seletividade ao alvo de ataque desejado, assim apenas a área de incidência luminosa será afetada e somente os micro-organismos indesejáveis são atacados (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

O fotossensitizador pode se ligar às células microbianas por diferentes caminhos como interação eletrostática e difusão. É conhecido que bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis à inativação fotodinâmica do que as bactérias Gram-negativas, que possuem uma bicamada lipídica na sua membrana externa que dificulta a penetração de substâncias. As bactérias Gram-positivas têm uma facilidade maior em absorver os corantes, facilitando o processo de fotossensitização. Tanto bactérias Gram-positivas, quanto as Gram-negativas mostram-se mais sensíveis à fotossensitizadores catiônicos devido à maior interação eletrostática destes corantes com certas partes da superfície bacteriana (ERGAIEG; SEUX, 2009).

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa presente na flora intestinal de humanos e outros animais, é responsável por algumas doenças como a enterite, sendo seu monitoramento em águas imprescindível para avaliar a potabilidade da mesma ou não (MARGALL et al., 1997).

O azul de metileno é um fotossensitizador mono-catiônico, cuja síntese foi descrita em 1876, que apresenta absorção máxima em 664nm, baixa toxicidade e boa atividade fotodinâmica, além de ser bastante acessível financeiramente (PAULA et al., 2010). O rosa de bengala é um fotossensitizador di-aniônico, apresenta absorção máxima em 549 nm e é usado comumente em testes para detecção de

brucelose (PESSEGUEIRO; BARATA; CORREIA, 2003). A estrutura química destes fotossensibilizadores é apresentada na Figura 1.

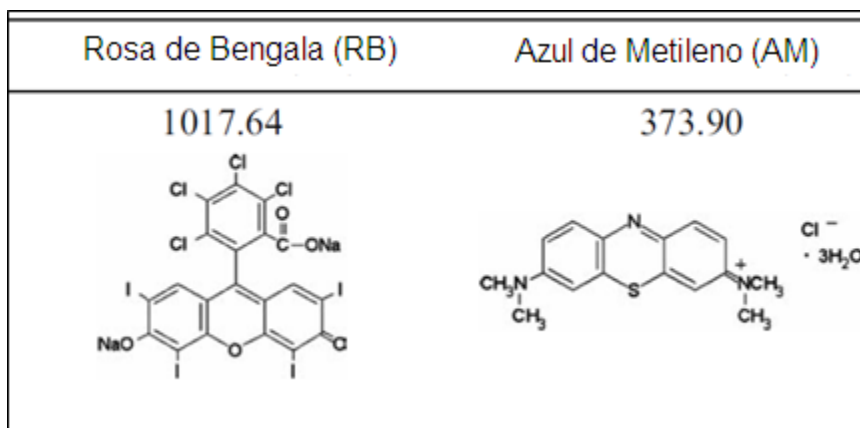


Figura 1: Estrutura química do Rosa de Bengala e do Azul de Metileno (ERGAIEG; SEUX, 2009).

1.2 Tratamento de águas e efluentes

A cada ano tem se tornado mais necessário o tratamento para reutilização de águas e descarte de efluentes. A presença de determinados micro-organismos nas águas podem causar doenças aos seres humanos ao consumirem a mesma, assim como também podem gerar um desequilíbrio no ecossistema aquático. A Tabela 1 mostra as principais doenças que o homem pode contrair por via hídrica.

Tabela 1: Principais doenças de veiculação hídrica (DANIEL et al., 2001).

Doença	Agente etiológico	Sintomas	Fontes de contaminação
Febres tifoide e paratifoide	<i>Salmonella typhi</i> <i>Salmonella paratyphi</i> A e B	Febre elevada, diarreia	Fezes humanas
Disenteria bacilar	<i>Shigella dysenteriae</i>	Diarreia	Fezes humanas
Disenteria amebiana	<i>Entamoeba histolytica</i>	Diarreia, abscessos no fígado e intestino delgado	Fezes humanas

(continua)

(continuação)

Doença	Agente etiológico	Sintomas	Fontes de contaminação
Criptosporidiose	<i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Cryptosporidium muris</i>	Diarreia, anorexia, dor intestinal, náusea, indigestão, flatulência	Fezes humanas e de animais
Cólera	<i>Vibrio cholerae</i>	Diarreia e desidratação	Fezes humanas e águas costeiras
Giardíase	<i>Giardia lamblia</i>	Diarreia, náusea, indigestão, flatulência	Fezes humanas e de animais
Hepatite A e B	Vírus da hepatite A e B	Febre, icterícia	Fezes humanas
Poliomielite*	Vírus da poliomielite	Paralisia	Fezes humanas
Gastroenterite	<i>Escherichia coli</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , Rotavírus e outros vírus entéricos	Diarreia	Fezes humanas

*Enfermidade erradicada no Brasil

Diariamente, toneladas de efluentes, tratados ou não, são descartados em rios e lagos. No Brasil apenas 37,5% do esgoto gerado passa por algum tipo de tratamento, muitas comunidades ribeirinhas utilizam da água destes rios no seu dia-a-dia (TRATA BRASIL, 2013). Desta forma, torna-se imprescindível a monitoração e eliminação de micro-organismos das águas e, principalmente, efluentes.

O tratamento convencional para eliminação de micro-organismos da água utiliza de compostos com cloro, tais como cloro gasoso, hipoclorito de sódio entre outros. O grande problema deste tipo de desinfecção é o número elevado de subprodutos gerados, como os trihalometanos (THMs), muitos desses subprodutos são comprovadamente prejudiciais à saúde humana, podendo causar desde irritação ocular, anemia, danos ao sistema nervoso central ou até alguns tipos de câncer (BATTERMAN; ZHANG; WANG, 2000) (USEPA, 2012). Várias pesquisas científicas demonstram os perigos que os subprodutos formados após a cloração de água podem gerar, sendo pesquisadas várias formas alternativas de desinfecção que não utilize compostos clorados. Algumas pesquisas focam na construção de sistemas de desinfecção que utilizem radiação ultravioleta (UV), luz solar, compostos naturais, entre outros (DANIEL, 2001).

A inativação fotodinâmica de águas é um procedimento pouco explorado no meio científico devido à dificuldade apresentada em remover os fotossensibilizadores utilizados no processo. Desta forma, prefere-se imobilizar os fotossensibilizadores em fase heterogênea facilitando sua remoção, um exemplo são as pesquisas utilizando fotossensibilizadores imobilizados em membranas de quitosana que têm se mostrado bastante promissoras (BONNETT et al., 2006) (PERUSSI, 2007).

Uma vez que os fotossensibilizadores nada mais são do que corantes que apresentam atividade fotodinâmica, é possível correlacionar pesquisas relativas à remoção de corantes industriais com aquelas que buscam solucionar o problema dos fotossensibilizadores utilizados em procedimentos de fotoinativação.

A remoção de corantes pode ser feita por diversas maneiras, no entanto a mais comum e mais estudada têm sido a coagulação química dos mesmos. Esta, inclusive, serve como parâmetro de referência da legislação brasileira, que não permite a presença de corantes, que não possam ser removidos por coagulação, sedimentação e filtração, em nenhum tipo de água (CONAMA, 2005).

A coagulação tem como finalidade principal a separação de materiais coloidais em suspensão e ou dissolvido, desta forma a cor proveniente dos corantes se encaixa em tal requisito. A coagulação é o processo pelo qual o agente coagulante age reduzindo as forças que impedem as partículas sólidas de se manterem unidas e é complementada pela floculação que faz com que estas partículas se aglomerem permitindo a formação de uma partícula maior possível de

ser removida. Para que a coagulação seja eficiente é necessário realizar agitação intensa para que ocorra interação entre o coagulante e a água (VAZ et al., 2010).

Os coagulantes mais utilizados são os sais de alumínio, que se mostram bastante eficientes em suspensões cujos valores de pH estejam entre 5,0 e 8,0, mas o grande problema é o descarte do lodo gerado, já que o alumínio é tóxico para diversos organismos (MATOS et al., 2007). Alguns de seus efeitos tóxicos são alterações enzimáticas, substituição de íons presentes no organismo humano, elevação da fluidez de membranas lipídicas, entre outros. Testes em animais demonstraram alterações cromossômicas, além de indícios de mutações no DNA e correlação com a doença de Alzheimer (COSTA, 2011).

Vários coagulantes de origem vegetal têm sido estudados, entre eles destacam-se a Quitosana e as sementes de *Moringa oleífera* Lam.

A *Moringa oleífera* Lam (Figura 2) é uma planta tropical, da família *Moringaceae*, têm mais de quatorze espécies identificadas, pode chegar a 10 metros de altura, uma árvore da planta pode produzir cerca de 2000 sementes por ano (PRITCHARD et al., 2010). Originária do norte da Índia, no Brasil, os primeiros registros são da década de 1950 no Nordeste do país. Vários estudos mostram que as suas sementes possuem propriedades coagulantes, não são tóxicas para os seres humanos e nem para os demais animais. (NDABIGENGESERE; NARASIAH, 1998)

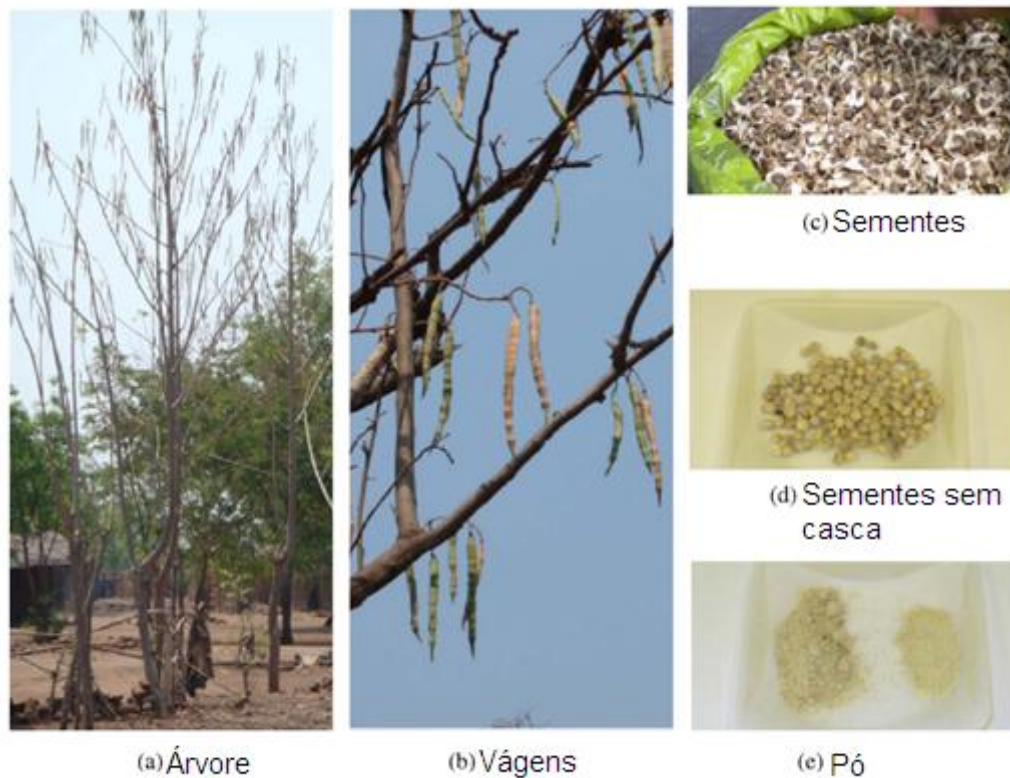


Figura 2: *Moringa oleífera* Lam. a) Árvore b) Vagens c) Sementes d) Sementes sem casca e) Pó (PRITCHARD et al., 2010)

Todas as partes da planta podem ser aproveitadas, seus usos são variados desde a alimentação, fornecendo vitaminas A e C, como na produção de óleos, cerca viva e, popularmente, como remédio natural para infecções cutâneas (RANGEL, 1999).

As propriedades coagulantes da *Moringa oleífera* são atribuídas à presença de proteínas catiônicas solúveis presentes nas sementes. (NDABIGENGESERE; NARASIAH; TALBOT, 1995). Em 1995, uma proteína flocculante desta planta foi isolada por Gassenschmidt e colaboradores. As macromoléculas da proteína, quando colocadas na água, se ionizam e provocam a desestabilização das partículas de impurezas, provocando a sua coagulação (ESNARRIAGA, 2010).

A quitosana é um polissacarídeo, encontrado em alguns fungos, que pode ser obtido através da acetilação da quitina. É um polímero natural, cuja estrutura é apresentada na Figura 3, atóxico e biodegradável. É usada em indústrias alimentícias, cosmética, farmacêutica, biomédica, têxteis entre outras (DIAS et al., 2013) (SILVA, SANTOS, FERREIRA, 2006).

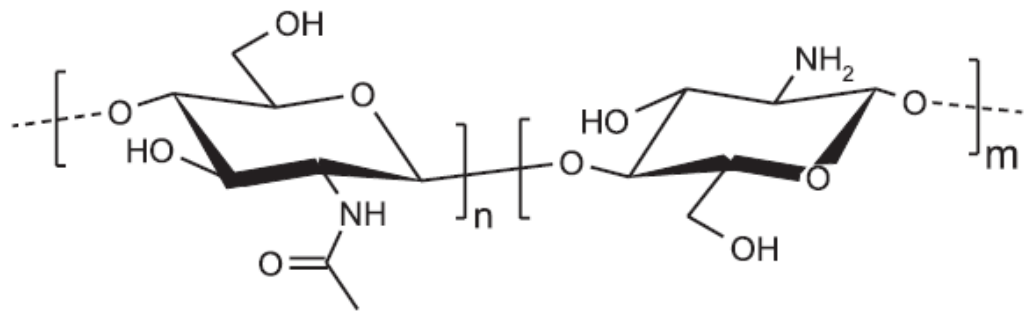


Figura 3 : Estrutura química da quitosana (SILVA, SANTOS, FERREIRA, 2006)

Vários trabalhos de remoção de corantes têm mostrado que a quitosana em pó tem propriedades coagulantes bastante evidentes mesmo em baixas concentrações (VAZ et al., 2010) (VALVERDE et al., 2013).

2. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

A inativação fotodinâmica de micro-organismos é um procedimento bastante eficiente que tem sido amplamente estudado no meio científico. Grande parte dos estudos realizados tem como foco principal o tratamento tópico de doenças, como por exemplo, alguns tipos de micose.

O uso desse método na desinfecção de águas tem sido pouco estudado devido à grande dificuldade de remover os fotossensibilizadores usados. Desta forma, o objetivo principal deste trabalho foi obter a fotoinativação eficiente de *Escherichia coli*, uma bactéria Gram-negativa que apresenta certa tolerância à inativação fotodinâmica, supondo-se, assim, que caso a inativação seja eficiente para este modelo celular será também para outros micro-organismos, bem como remover os fotossensibilizadores utilizados.

Foram determinados os seguintes objetivos específicos para o presente trabalho:

- Realizar procedimentos de fotoinativação de *Escherichia coli*;
- Confrontar a eficiência do método desenvolvido com procedimentos convencionais de desinfecção, como a cloração;
- Avaliar estratégias adequadas para a remoção ou degradação do fotossensibilizador residual;
- Estudar o efeito de diferentes coagulantes para remoção do fotossensibilizador;
- Estudar o tempo de espera e as alterações da eficiência da coagulação;
- Realizar testes em amostra real.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1 METODOLOGIAS

Todas as metodologias citadas foram realizadas no Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, sendo grande parte delas feitas no Laboratório de Bioquímica e Fotobiologia (Labiofot). Todos os testes foram realizados previamente em suspensão bacteriana preparada no laboratório e posteriormente em amostra de efluente de esgoto cedida pelo DMAE – Uberlândia (Departamento Municipal de Água e Esgoto).

3.1.1 Inativação de *Escherichia coli*

Realizou-se testes de fotoinativação de *Escherichia coli* (ATCC: 25922), fornecida de pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Uberlândia.

3.1.1.1 Suspensão bacteriana de *Escherichia coli*

Retirou-se uma pequena quantidade de *Escherichia coli* cultivada em ágar EMB (Ágar Eosina Azul de Metileno – HIMEDIA) para preparação da suspensão bacteriana em soro fisiológico estéril (solução estéril de 0,9% de NaCl) com turvação de aproximadamente 01 na escala de Mac Farland.

3.1.1.2 Preparação dos fotossensibilizadores

Soluções dos fotossensibilizadores, Azul de Metileno (Vetec) e Rosa de Bengala (Vetec), foram preparadas na concentração de 5×10^{-5} mol L⁻¹. Essa concentração foi usada por Paula et al.(2010), mostrando a eficiência da inativação fotodinâmica do azul de metileno.

3.1.1.3 Determinação das curvas de absorção dos fotossensibilizadores

As curvas de absorção dos fotossensibilizadores foram obtidas no Laboratório de Filmes Poliméricos (Lafip) do IQ-UFU utilizando-se o espectrofotômetro UV-1650PC da marca Shimadzu.

3.1.1.4 Determinação do espectro de emissão do aparelho utilizado

O espectro de emissão luminosa utilizado nos testes de inativação foi obtido no Laboratório de Fotoquímica do IQ-UFU utilizando-se o espectrômetro de fibra óptica SD2000 da Ocean Optics, acoplado com corretor de cossenos no detector.

3.1.1.5 Testes de fotoinativação

Para realizar as microdiluições seriadas em placas de 96 poços, utilizou-se uma micro-pipeta automática (10-100 μ L) para adicionar a cada poço 50 μ L da substância a ser testada (ou sua diluição em soro fisiológico estéril), seguida de 50 μ L da suspensão bacteriana.

Esta metodologia também foi desenvolvida durante este trabalho, respeitando as normas vigentes da ANVISA e proporcionando melhor eficácia de processo e menor índice de contaminação possível (FERRARO et al.,2003).

No poço 1 das linhas A, B, C, D, E e F da placa de 96 poços foi adicionado o fotossensibilizador a ser testado sem diluí-lo, a partir da coluna 2 fez-se uma diluição seriada, utilizando-se soro fisiológico estéril, dividindo-se a concentração da substância a ser testada pela metade a cada coluna.

Nas linhas A, B e C foram realizados testes com Azul de metileno e nas linhas D, E e F foram realizados testes com Rosa de Bengala.

A linha H da placa foi destinada para realização de controles para o experimento. Nos poços das colunas 1, 2 e 3 foram adicionados, separadamente, 50 μ L da diluição da suspensão bacteriana. Nos poços 4, 5 e 6 foram adicionados 50 μ L do soro fisiológico estéril. E nos poços 7, 8 e 9 foram adicionados 100 μ L o caldo de crescimento bacteriano isoladamente. Estes testes foram feitos a fim de se verificar

que não houvesse nenhum tipo de contaminação das soluções utilizadas. Todos os testes foram realizados em triplicata. Não se utilizou a linha G, mantendo-a, apenas, como separador entre os poços utilizados na fotoinativação e os controles usados.

Os testes foram realizados em duas placas com composição idênticas. Ambas, permaneceram na estufa à 37 °C por 20 minutos para que houvesse uma interação entre o fotossensibilizador e a suspensão bacteriana. Após este período, uma placa foi irradiada durante 20 minutos por uma fonte luminosa produzida em nosso laboratório, nomeada de PHLS (Policromatic Halogen Light System), que utiliza uma lâmpada halógena proveniente de retroprojetores acoplada em uma caixa metálica que fornece alimentação elétrica em conjunto a uma cuba de refrigeração retangular de vidro oca que permite o fluxo contínuo de água visando a refrigeração próximo à amostra (Figura 4). A outra placa permaneceu em recipiente escuro para que se pudesse comparar se a inativação das bactérias ocorreu pela citotoxicidade do fotossensibilizador ou pela interação fotossensibilizador-luz.

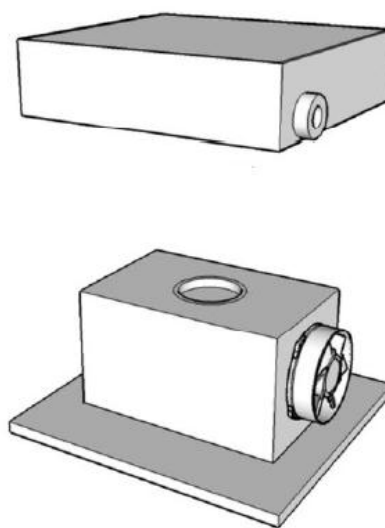


Figura 4: Fonte luminosa PHLS (Policromatic Halogen Light System)

Após este período, foram adicionados em cada poço 100 µL do caldo Rapid Hicoliformes Broth (HIMEDIA) também estéril e então as placas foram transferidas para estufa à 37 °C onde foram mantidas por 24 horas. Este caldo tem a característica de apresentar cor amarela quando não há o crescimento de bactérias Gram-negativas e cor azul, com fluorescência na presença de luz ultravioleta, quando há crescimento destes micro-organismos.

3.1.1.6 Testes de inativação utilizando hipoclorito de sódio

Como o hipoclorito de sódio é um agente antimicrobiano altamente eficaz, realizou-se este teste para fins comparativos de eficiência da inativação fotodinâmica.

Assim como os testes de fotoinativação, o método da microdiluição seriada citado anteriormente também foi utilizado.

Nos poços 1, 2 e 3 da linha A da placa de 96 poços (figura 5) foi adicionado o hipoclorito de sódio 4-6% (Vetec) sem diluí-lo, a partir da linha B fez-se uma diluição seriada, utilizando-se soro fisiológico estéril, dividindo-se a concentração da substância a ser testada pela metade a cada coluna. Ao final da linha H continuou a diluição para as colunas 4, 5 e 6 da linha A, repetindo o mesmo procedimento para as colunas 7, 8 e 9.

As colunas 10, 11 e 12 serviram de controle, sendo adicionada da linha A apenas a suspensão bacteriana, na linha B apenas a solução de soro fisiológico estéril e para a linha C apenas o caldo de crescimento bacteriano.

Foram adicionados em cada poço 100 μ L o caldo de crescimento bacteriano e então as placas foram transferidas para estufa à 37 °C onde foram mantidas por 24 horas.

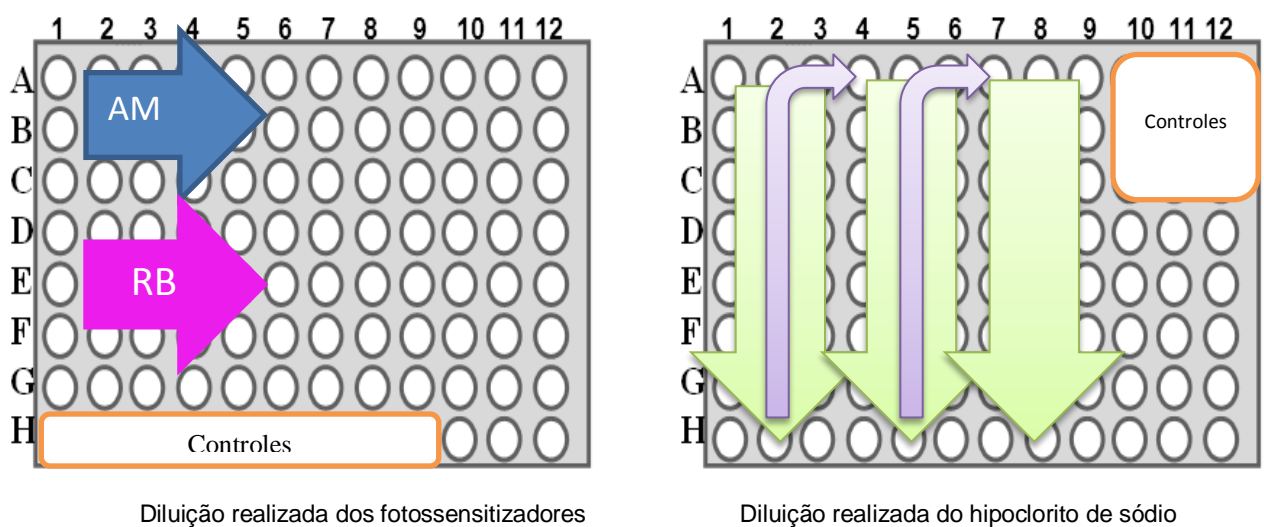


Figura 5: Diluições realizadas nas placas de 96 poços

3.1.1.7 Variação da temperatura gerada pelo PHLS

O aumento da temperatura foi realizado utilizando os mesmos parâmetros do teste de fotoinativação. Um termômetro de mercúrio foi inserido dentro dos poços com 100 µL de água, antes e a cada 5 minutos em um total de 30 minutos.

3.1.2 Coagulação

3.1.2.1 Estudo dos coagulantes

Os testes de coagulação foram realizados adicionando-se o coagulante a ser testado em solução do corante com a concentração previamente determinada através dos testes de inibição bacteriana. Utilizou-se um agitador mecânico Fisatom 713D por 3 min em velocidade de rotação de 90-100 rpm (VALVERDE et al., 2013).

A absorção dos corantes foi medida antes da adição do coagulante, após 2h de espera e após 24h do término da agitação. Todos os béqueres ficaram em penumbra à temperatura ambiente.

Foram utilizados como coagulantes as sementes sem casca e trituradas de *Moringa oleifera*, Quitosana em pó comercial (Polymar) e sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) comercial. Os testes com a suspensão de *E. coli* foram realizados variando-se a concentração do coagulante para determinar a melhor concentração de cada coagulante para remoção de cada fotossensibilizador estudado (VAZ et al., 2010). Após esta determinação, efetuou-se o mesmo procedimento com a amostra de efluente tratada com o fotossensibilizador. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.1.2.2 Difração de Raios X (DRX)

Realizou-se a difratometria para fins comparativos da cristalinidade do sulfato de alumínio comercial com o sulfato de alumínio Sigma-Aldrich de pureza 99%. Este procedimento foi realizado uma vez que o sulfato de alumínio comercial tem um custo extremamente baixo, sendo preferível utilizá-lo. Assim, para garantir que suas

propriedades cristalinas eram compatíveis com o sulfato de alumínio mais puro, obteve-se o difratograma comparativo.

O difratograma de raios X do sulfato de alumínio foi obtido a temperatura ambiente, com intervalo de 2θ de 5 a 85°, velocidade de varredura de 2°/min e resolução de 0,02°. O equipamento utilizado foi um difratômetro Shimadzu LabX XRD-6000, operando a uma potência de 40 kV com 30 mA de corrente e radiação proveniente de Cu $K\alpha$ (1,5406 Å). As amostras realizadas por esta técnica foram previamente secas a 50°C durante 12 horas em uma estufa. Essas medidas foram realizadas no Laboratório Multiusuários do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia.

3.1.2.4 pH

O pH das amostras foi medido com pHmetro da marca Bel engineering W38 calibrado com temperatura de 24 °C. Todas as medidas foram realizadas após a conclusão dos testes realizados.

Não houve correção de pH em nenhum experimento realizado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Inativação de *Escherichia coli*

4.1.1 Determinação das curvas de absorção dos fotossensibilizadores

As curvas de absorção dos fotossensibilizadores, ilustradas na Figura 6, nos mostram que a solução de Rosa de Bengala preparada experimentalmente tem absorção máxima em 543 nm, já a solução de Azul de Metileno tem absorção máxima em 664 nm.

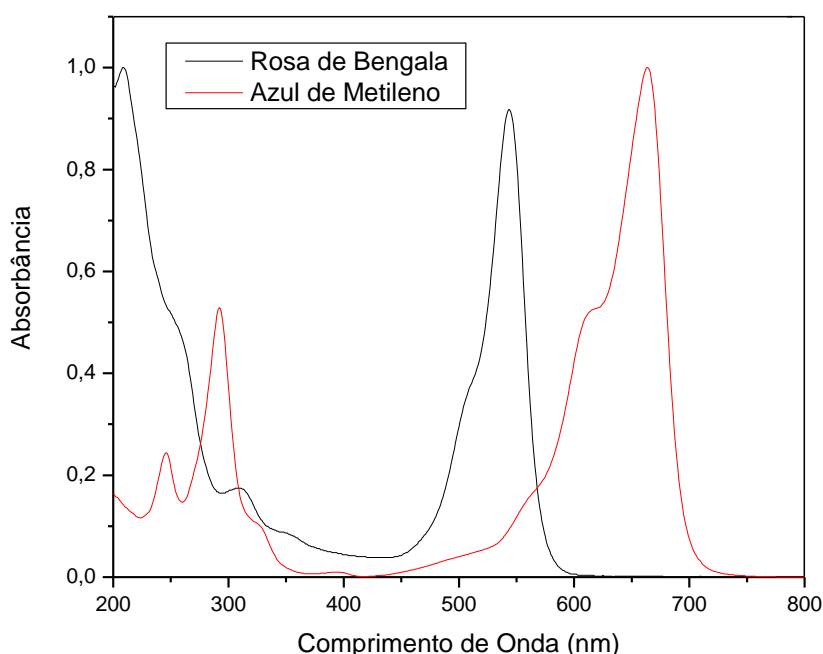


Figura 6: Curvas de absorção dos fotossensibilizadores

Desta forma, esses foram os comprimentos de onda adotados para as determinações espectrofotométricas dos corantes utilizados.

4.1.2 Determinação do espectro de emissão do aparelho PHLS

A Figura 7 ilustra a emissão do aparelho PHLS utilizado nos testes de inativação, e evidencia que há uma grande janela de emissão (aproximadamente

entre 500 e 700 nm) o que torna o aparelho viável para testes com fotossensibilizadores com diferentes picos de absorção.

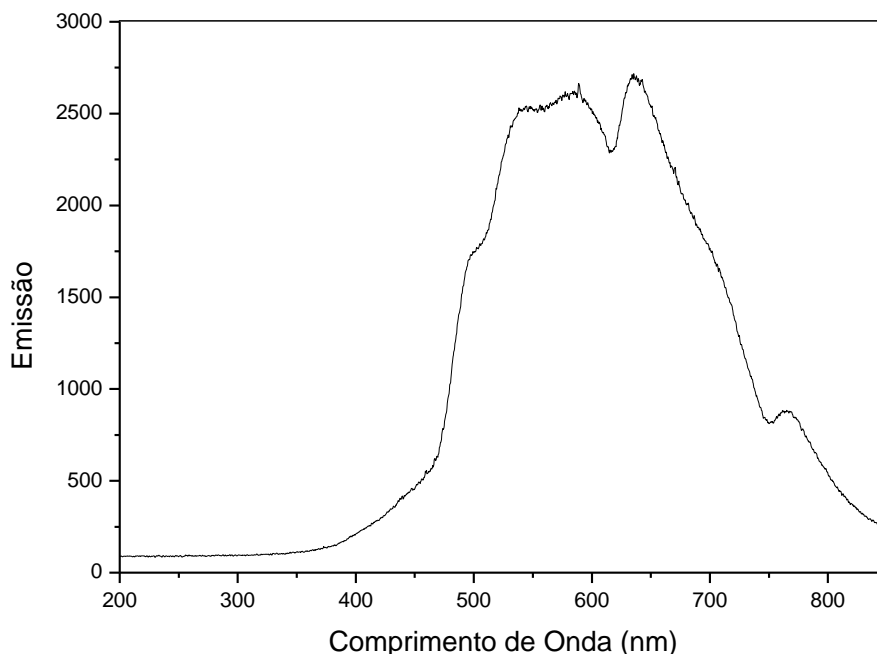


Figura 7: Emissão do aparelho PHLS

Esta janela de emissão permite a utilização deste equipamento em testes utilizando o Azul de Metileno e o Rosa de Bengala como fotossensibilizadores.

4.1.3 Testes de fotoinativação

Os testes de fotoinativação nos forneceram os resultados apresentados nas Figuras abaixo. O caldo de crescimento bacteriano tornou-se azul fluorescente na presença de luz ultravioleta, evidenciando o crescimento microbiano. As Figuras 8a e 8b mostram resultados realizados com a suspensão bacteriana preparada no laboratório. As Figuras 9a e 9b mostram os resultados obtidos com a amostra de efluente.

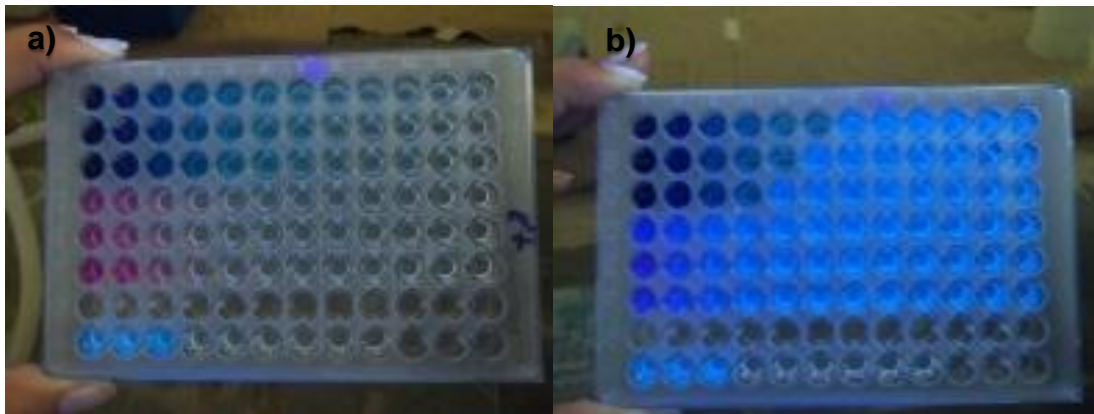


Figura 8: Testes de fotoinativação com suspensão bacteriana a) Com irradiação luminosa
b) Sem irradiação luminosa

As Figuras 8a e 8b permitem a conclusão de que o Rosa de Bengala se mostrou bastante eficiente para a inativação de *Escherichia coli*, uma vez que na presença de irradiação luminosa houve inibição de todas as diluições testadas e sem a irradiação luminosa houve crescimento bacteriano em todos os poços. Assim, é evidente que o Rosa de Bengala é menos citotóxico do que o Azul de Metileno, que em mesma concentração também inibiu totalmente as diluições irradiadas com luz, mas que sem a presença de luz houve morte bacteriana até a concentração $6,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, o que evidencia que este fotossensibilizador tem certo potencial citotóxico para a bactéria testada.

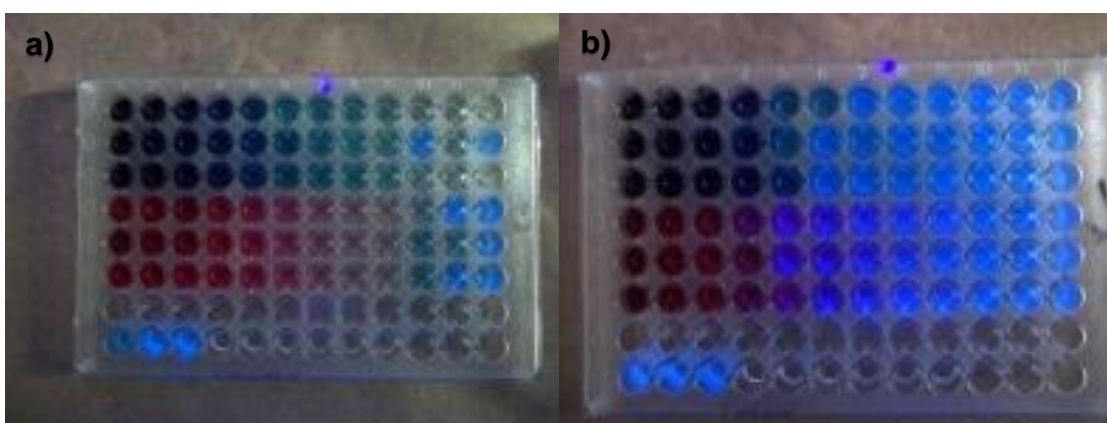


Figura 9 : Testes de fotoinativação com amostra de efluente a) Com irradiação luminosa
b) Sem irradiação luminosa

Experimentos de contagens de unidades formadoras de colônias (UFCs) foram realizados, utilizando-se de várias diluições da amostra de efluente e em todas

elas houve crescimento de incontáveis UFCs, caracterizando-se assim que a quantidade de bactérias presente na amostra de efluente é bem maior do que a testada anteriormente. As figuras 9a e 9b confirmam este fato, já que mesmo na presença de luz certa quantidade de bactéria sobreviveu ao efeito fotodinâmico. Apesar desta grande quantidade de bactéria presente no efluente, o Rosa de Bengala se mostrou um fotossensibilizador melhor do que o Azul de Metileno, este último manteve-se mais citotóxico, mas houve uma leve citotoxicidade apresentada pelo Rosa de Bengala que na amostra laboratorial não foi observada. Talvez isso tenha ocorrido devido a alguma interação do fotossensibilizador com substâncias presentes na amostra, formando outras substâncias que causam a morte bacteriana, justificando assim o aumento da citotoxicidade.

4.1.4 Testes de inativação utilizando hipoclorito de sódio

A fim de se comparar a eficiência do método proposto foram realizados testes utilizando hipoclorito de sódio.

As Figuras 10a e 10b nos dão o resultado da inativação da suspensão de *Escherichia coli* e da amostra de efluente, respectivamente, utilizando hipoclorito de sódio.

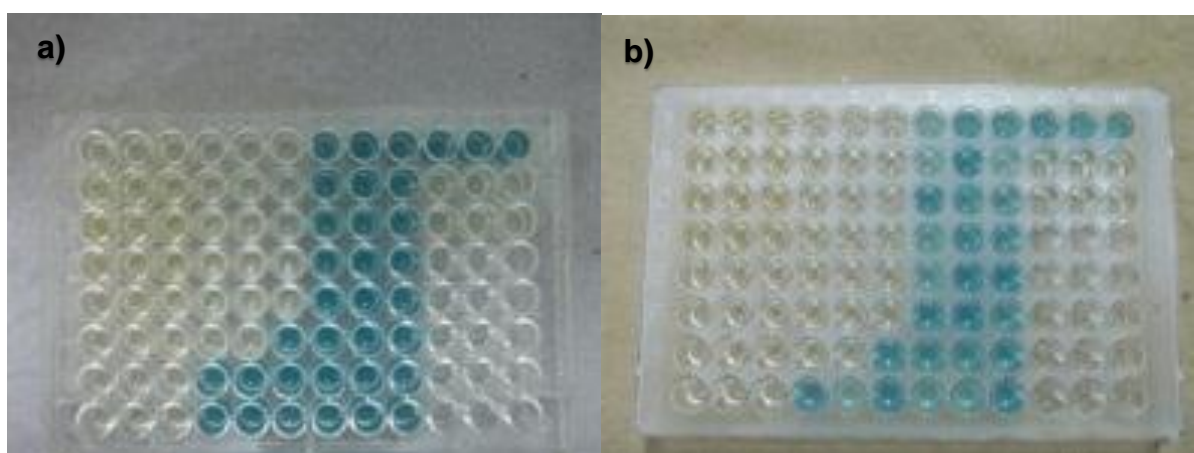


Figura 10: Inativação bacteriana causada pelo agente químico hipoclorito de sódio; a) Em amostra de suspensão bacteriana b) em amostra de efluente

É possível observar que a concentração de hipoclorito que inibe o crescimento bacteriano é bastante semelhante em ambas placas, porém a amostra de efluente apresentou um resultado mais eficaz do que a suspensão de *E. coli*.

Para a amostra de suspensão bacteriana houve inativação até a concentração de 0,00049-0,00073% de hipoclorito de sódio, já a amostra de efluente precisou de uma quantidade ainda menor para que ocorresse a inativação (0,00025-0,00037%).

Supõe-se que este efeito seja causado devido à presença de compostos com cloro que podem estar presentes na composição do efluente, uma vez que é bastante comum o uso de hipoclorito de sódio na nossa comunidade para limpeza e desinfecção de materiais domésticos.

4.1.5 Variação da temperatura gerada pelo PHLS

Testes sobre a variação da temperatura foram realizados para que houvesse total garantia de que a morte bacteriana fosse decorrente da inativação fotodinâmica e não de um aumento inadequado de temperatura. Os dados obtidos são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Variação do tempo de irradiação luminosa e a temperatura média obtida na placa de 96 poços.

<i>Tempo de irradiação (min)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>
0	19
5	19,5
10	20
15	21
20	22
25	22
30	22

Conforme os dados da tabela acima, podemos concluir que a variação de temperatura é mínima não causando a morte bacteriana, já que segundo a literatura a *Escherichia coli* tem como temperatura ótima de crescimento entre 35 e 40°C (CARNEIRO, 2008).

4.2 Coagulação

4.2.1 Estudo dos coagulantes

O estudo dos coagulantes foi realizado tomando-se como referência as melhores concentrações de coagulantes utilizadas por VAZ, et al.(2010). As concentrações inicialmente testadas foram 200 mg L⁻¹ para *Moringa oleífera*, 40 mg L⁻¹ para o Sulfato de alumínio e 5 mg L⁻¹ para a Quitosana em pó.

Variou-se as concentrações de coagulantes testadas a fim de se encontrar a melhor interação coagulante-fotossensibilizador. A média dos resultados dos testes de coagulação com a suspensão de *E.coli* nos forneceram os dados ilustrados nas Tabelas 3 e 4.

As porcentagens de absorção reduzidas, apresentadas nos dados dos testes realizados, foram obtidas através da diferença de valores da leitura espectrofotométrica inicial, antes da adição de coagulante, e da leitura espectrofotométrica final, após o tempo de espera.

Tabela 3: Redução da absorção do Fotossensibilizador Rosa de Bengala ($4,88 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) em suspensão bacteriana no comprimento de onda de 543nm

Coagulante -concentração testada	Porcentagem de absorção reduzida após 2h	Porcentagem de absorção reduzida após 24h
<i>Moringa oleífera</i> 100 mg L ⁻¹	48,5 ± 2,1	79,2 ± 3,0
<i>Moringa oleífera</i> 200 mg L ⁻¹	42,8 ± 2,8	85,8 ± 2,3
<i>Moringa oleífera</i> 400 mg L ⁻¹	33,8 ± 1,9	94,3 ± 3,7
<i>Moringa oleífera</i> 500 mg L ⁻¹	38,7 ± 1,8	87,8 ± 2,1
<i>Moringa oleífera</i> 600 mg L ⁻¹	28,8 ± 2,2	90,0 ± 2,9
Sulfato de Alumínio 40 mg L ⁻¹	18,6 ± 5,1	22,2 ± 2,4
Sulfato de Alumínio 400 mg L ⁻¹	34,8 ± 3,4	38,3 ± 2,6
Quitosana 5 mg L ⁻¹	3,0 ± 0,5	7,6 ± 1,7
Quitosana 50 mg L ⁻¹	10,3 ± 1,1	43 ± 5,8
Quitosana 200 mg L ⁻¹	20,7 ± 2,4	48,5 ± 4,5
Quitosana 400 mg L ⁻¹	16,9 ± 1,7	59,1 ± 2,1

Em todos os testes realizados a *Moringa oleífera* apresentou grandes índices de redução da absorção, provavelmente devido à presença da proteína aglutinante.

Devido aos resultados apresentados, utilizou-se a *Moringa oleífera* como coagulante principal para determinar a concentração a ser usada nos testes com efluente de esgoto. Assim, determinou-se que a melhor concentração a ser utilizada seria 400 mg L⁻¹ de coagulante, já que é possível observar que em concentrações maiores a eficiência de remoção foi diminuída. E pode ser atribuída ao excesso de coagulante que provavelmente devido ao grande contato coagulante-coagulante impediu que houvesse interação total fotossensibilizador-coagulante, mesmo sob agitação intensa.

Tabela 4: Redução da absorção do Fotossensitizer Azul de Metileno ($4,88 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) em suspensão bacteriana no comprimento de onda de 664nm.

Coagulante -concentração testada	Porcentagem de absorção reduzida após 2h	Porcentagem de absorção reduzida após 24h
<i>Moringa oleífera</i> 400 mg L ⁻¹	4,6 ± 0,5	8,2 ± 0,9
<i>Moringa oleífera</i> 500 mg L ⁻¹	6,9 ± 0,8	8,6 ± 0,3
Sulfato de Alumínio 40 mg L ⁻¹	1,0 ± 0,6	0,1 ± 0,5
Sulfato de Alumínio 400 mg L ⁻¹	0,0 ± 0,1	0,0 ± 0,4
Quitosana 5 mg L ⁻¹	5,3 ± 0,4	5,5 ± 0,6
Quitosana 400 mg L ⁻¹	12,5 ± 0,5	14,4 ± 0,1

As concentrações testadas com o Azul de Metileno foram determinadas de acordo com os melhores resultados obtidos com o Rosa de Bengala, uma vez que o trabalho compara a eficiência e remoção de tais fotossensitizadores. Realizou-se alguns testes com outras concentrações para efeito de comparação.

Conforme apresentado na Tabela 4, o melhor coagulante para remoção do Azul de Metileno foi a Quitosana na concentração de 400 mg L⁻¹, reduzindo 14,4% da absorção máxima. Porém este valor ainda foi bastante inferior ao obtido com o Rosa de Bengala, já que, nas mesmas condições, a Quitosana reduziu 59,1% da absorção máxima após 24 horas.

A possível explicação da maior interação entre Rosa de Bengala e os coagulantes deve-se ao fato deste ser um fotossensitizer de carga negativa o que aumenta a interação entre suas moléculas e as moléculas presentes na moringa oleífera, que segundo a literatura é composta principalmente de proteínas carregadas positivamente (PATERNIANI; MANTOVANI; SANT'ANNA, 2009).

Nos testes de fotoinativação da suspensão de *E. coli* preparada em laboratório, obteve-se a Concentração Mínima Inibitória (CMI) de $4,88 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de fotossensitizadores usados. Esta concentração foi, então, usada no preparo das soluções para os testes iniciais de coagulação.

Como os testes de inativação fotodinâmica da amostra de efluente resultaram em uma CMI oito vezes maior do que a CMI da suspensão bacteriana,

$3,91 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, para os testes de coagulação com efluente usou-se a concentração de 3200 mg L^{-1} , também oito vezes maior do que a utilizada anteriormente, para todos os coagulantes. A coagulação do Rosa de Bengala foi altamente eficaz, principalmente utilizando a *Moringa oleífera*, como a Figura 11 evidencia.

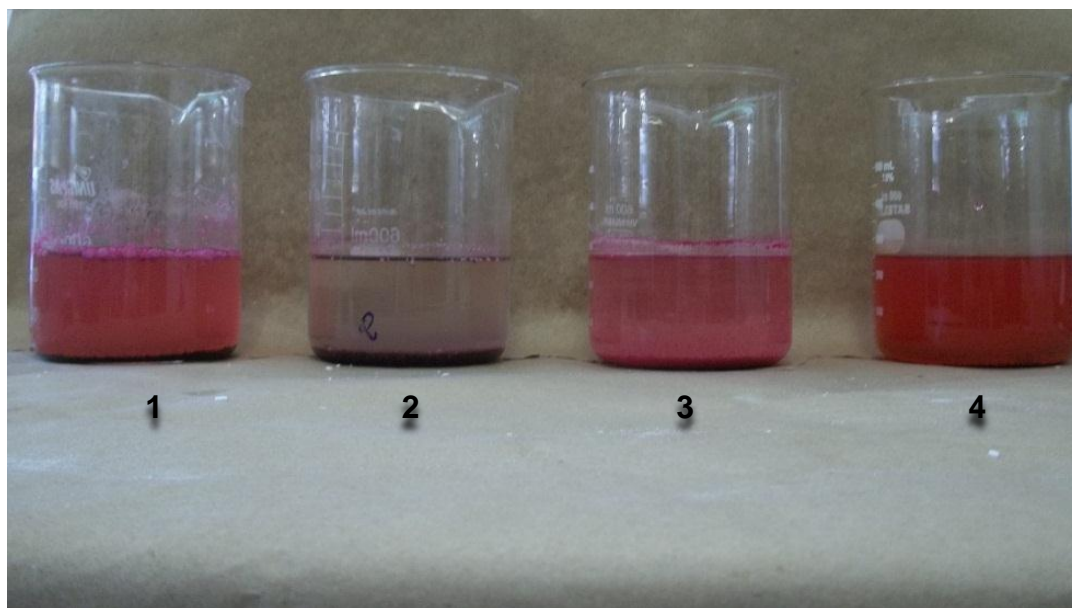


Figura 11: Após 24h de espera da coagulação de Rosa de Bengala. Béqueres com o fotossensibilizador, amostra de esgoto e com os seguintes coagulantes: 1) Quitosana 2) *Moringa oleífera* 3) Sulfato de alumínio 4) Sem coagulante.

Os resultados foram comprovados espectroscopicamente, fornecendo assim os dados apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Redução da absorção do Fotossensibilizador Rosa de Bengala ($3,91 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em amostra de efluente de esgoto no comprimento de onda de 543nm

Coagulante -concentração testada		Porcentagem de absorção reduzida após 2h	Porcentagem de absorção reduzida após 24h
1	Quitosana 3200 mg L^{-1}	$84,7 \pm 3,6$	$86,9 \pm 4,2$
2	<i>Moringa oleífera</i> 3200 mg L^{-1}	$92,2 \pm 2,8$	$96,9 \pm 3,1$
3	Sulfato de Alumínio 3200 mg L^{-1}	$83,0 \pm 5,0$	$96,1 \pm 2,8$
4	Sem coagulante	$0,0 \pm 0,1$	$0,0 \pm 0,1$

A Tabela 5 mostra que todos os coagulantes apresentaram alta eficiência na remoção do Rosa de Bengala, tanto no período de 2h como no período de 24h, sendo a *Moringa oleífera* a mais eficiente após 24 horas. Embora visualmente não tenha sido observada uma coagulação tão eficiente por meio dos outros dois coagulantes, os resultados espectroscópicos foram bastante expressivos. A propriedade da *Moringa oleífera* relatada em tantos trabalhos, de diminuir a turbidez da amostra, deve ter contribuído para a melhor visualização do resultado de coagulação.

O Azul de Metileno por ser um fotossensibilizador catiônico, possuindo assim a mesma carga iônica da *Moringa oleífera*, teve sua remoção menos eficiente do que o Rosa de Bengala. A Figura 12 foi obtida após 24h de pausa da coagulação.

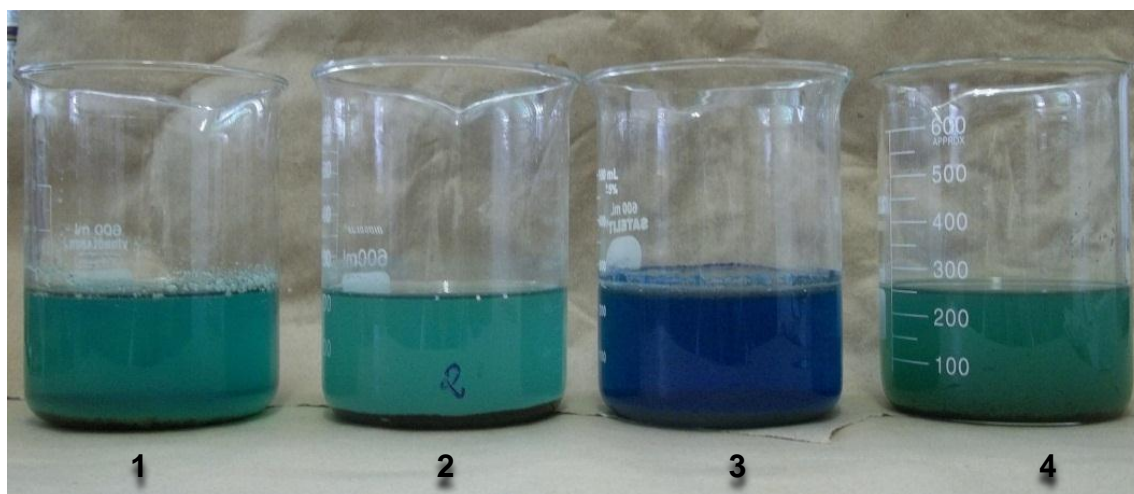


Figura 12: Após 24h de espera da coagulação de Azul de Metileno. Béqueres com o fotossensibilizador, amostra de esgoto e com os seguintes coagulantes: 1) Quitosana 2) *Moringa oleífera* 3) Sulfato de alumínio 4) Sem coagulante

Visualmente, observamos uma grande diferença entre os béqueres contendo *Moringa oleífera* e quitosana em comparação com o sulfato de alumínio, este último por sua vez apresentou coloração bastante discrepante dos demais em todos os béqueres da triplicata.

Quantitativamente, obtivemos os resultados contidos na Tabela 6.

Tabela 6: Redução da absorção do Fotossensibilizador Azul de Metileno ($3,91 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) em amostra de efluente de esgoto no comprimento de onda de 664nm

Coagulante -concentração testada		Porcentagem de absorção reduzida após 2h	Porcentagem de absorção reduzida após 24h
1	Quitosana 3200 mg L ⁻¹	77,8 ± 5,4	73,7 ± 3,4
2	Moringa oleífera 3200 mg L ⁻¹	70,7 ± 3,8	75,9 ± 4,7
3	Sulfato de Alumínio 3200 mg L ⁻¹	60,2 ± 4,6	10,5 ± 1,9
4	Sem coagulante	38,5 ± 2,1	41,6 ± 3,4

Analisando os dados da tabela 6 percebemos que o Azul de Metileno por si só já foi coagulado com a amostra de efluente, pois provavelmente a composição química do efluente interage com o fotossensibilizador diminuindo sua absorção.

Os testes realizados após 2 horas de pausa evidenciaram que a Quitosana se mostrou mais eficiente na coagulação do Azul de Metileno, já após 24h a *Moringa oleífera* continuou sendo mais eficaz. Uma peculiaridade foi a alteração ocorrida com o Sulfato de Alumínio, que após 2h apresentava uma redução de 60,1% e após 24h houve uma reverção, reduzindo apenas 10,5% da absorção máxima inicial. Com estes últimos resultados, supomos que a coagulação de Azul de Metileno com Sulfato de Alumínio não é estável, sendo revertida após um tempo de espera.

O béquer com sulfato de alumínio apresentou uma coloração diferente dos demais, foi suposto que o azul de metileno tivesse interagido com os íons Al³⁺ formando um complexo de cor azul intensa. Para verificar esta hipótese, realizamos a medida do espectro de varredura das amostras 3 e 4 (com sulfato de alumínio e sem coagulante, respectivamente). O espectro de absorção das amostras 3 e 4 (Figura 13) nos mostram que ambas têm características bastante semelhantes, o que demonstra serem o mesmo composto, excluindo a hipótese da formação de um complexo.

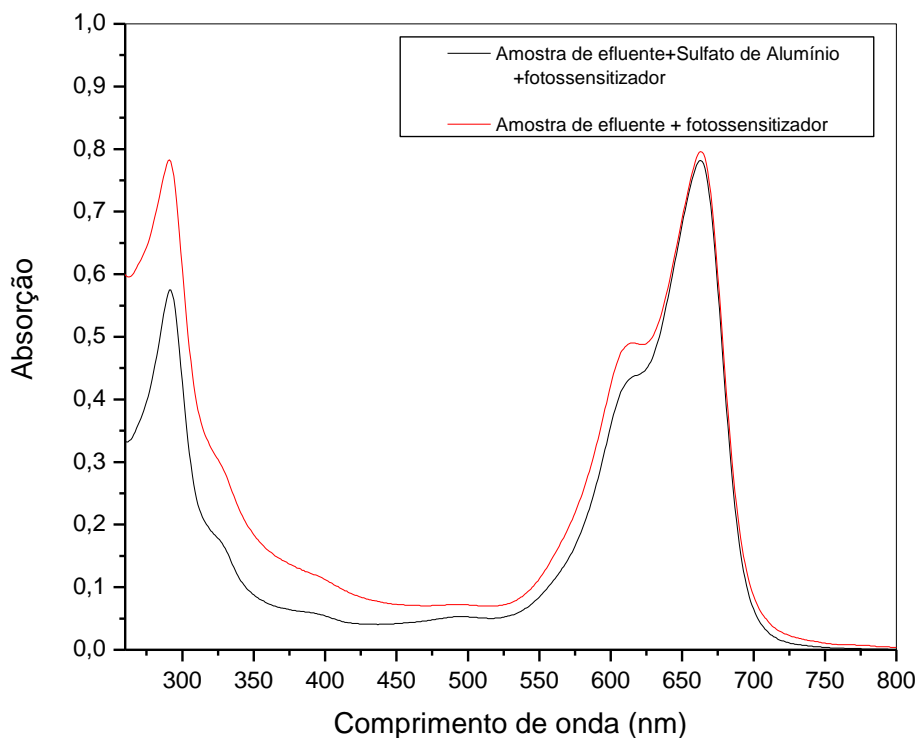


Figura 13: Espectro de absorção das amostras 3 (sulfato de alumínio+efluente+fotossensibilizador) e 4 (amostra de efluente+fotossensibilizador sem coagulante)

É possível concluir que, assim como com os resultados utilizando Rosa de Bengala, a *Moringa oleifera* também foi o coagulante mais eficiente na remoção do Azul de Metileno, demonstrando que as sementes trituradas da planta apresentam forte potencial para remoção de fotossensibilizadores.

4.2.2 Difração de Raios X (DRX)

Foi obtido o difratograma (Figura 14) do Sulfato de alumínio comercial para verificar se sua cristalinidade era condizente com o sulfato de alumínio Sigma-Aldrich de pureza 99%.

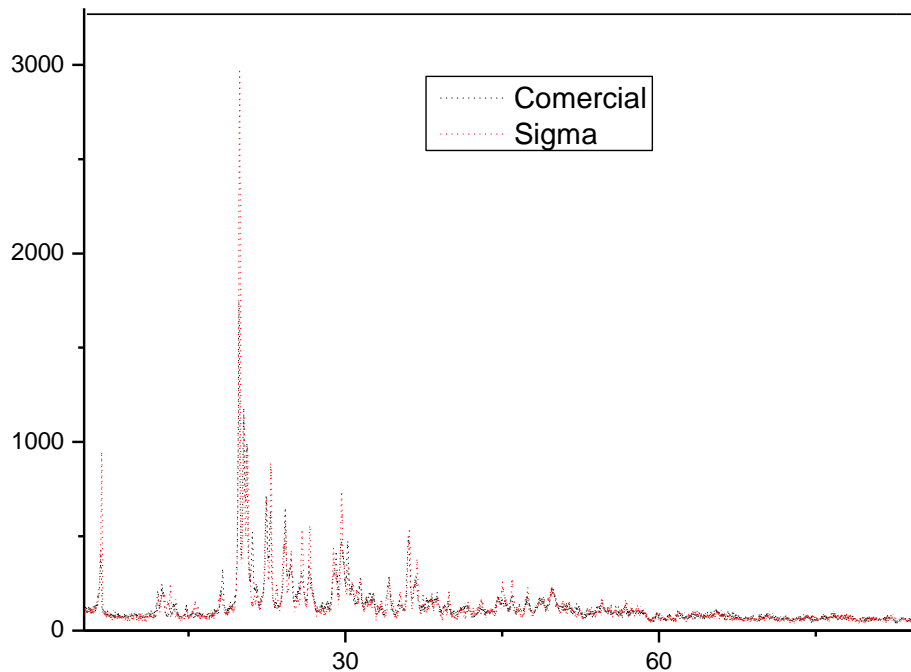


Figura 14: Difratograma de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ comercial e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ Sigma-Aldrich pureza 99%

Observa-se que os picos são muito similares, sendo possível concluir que a característica cristalina de ambos os sulfatos de alumínio testados é semelhante.

Optou-se em utilizar o sulfato de alumínio comercial devido ao seu baixíssimo custo e comprovação de similaridade cristalina através deste experimento.

4.2.3 pH

Não foi realizada nenhum tipo de correção de pH das amostras, para se avaliar o efeito real de cada coagulante, bem como o efeito do fotossensibilizador sobre a amostra. A Tabela 7 ilustra os valores de pH obtidos experimentalmente.

Tabela 7: Valores de pH obtidos experimentalmente

<i>Amostra</i>	<i>pH</i>
Rosa de Bengala + Quitosana + Amostra de efluente de esgoto	8,18
Rosa de Bengala + Moringa oleífera + Amostra de efluente de esgoto	6,65
Rosa de Bengala + Sulfato de Alumínio + Amostra de efluente de esgoto	4,00
Rosa de Bengala + Amostra de efluente de esgoto	7,14
Rosa de Bengala	5,95
Azul de Metileno + Quitosana + Amostra de efluente de esgoto	7,82
Azul de Metileno + Moringa oleífera + Amostra de efluente de esgoto	6,52
Azul de Metileno + Sulfato de Alumínio + Amostra de efluente de esgoto	3,86
Azul de Metileno + Amostra de efluente de esgoto	7,64
Amostra de efluente de esgoto	7,14
Azul de Metileno	5,61

Os valores de pH evidenciam que os fotossensibilizadores apresentam pH ácido e a amostra de efluente apresenta valores próximos ao neutro. Observa-se também, que o sulfato de alumínio aumenta a acidez das amostras analisadas.

Possivelmente a correção do pH aumentaria a eficácia da coagulação, essa propriedade pode ser alvo de estudos futuros, já que, neste trabalho, não houve tempo hábil para a realização deste procedimento.

5. CONCLUSÃO

O trabalho realizado possibilitou concluir que o Rosa de Bengala e o Azul de Metileno se mostraram bastante eficientes na inativação de *Escherichia coli* em amostra laboratorial e também em amostra de efluente de tratamento de esgoto. Desta forma, é possível supor que este é um modelo que pode ser utilizado em estações de tratamento de esgoto para remoção de micro-organismos de seus efluentes que, após tratamento, serão descartados em rios.

A remoção dos fotossensibilizadores foi eficiente com todos os coagulantes testados, sendo a *Moringa oleífera* o coagulante mais eficiente, tendo removido, após 24h, 96,9% e 75,9% de Rosa de Bengala e Azul de Metileno, respectivamente.

A fotoinativação surge como uma alternativa aos danos causados pelos subprodutos de cloro, porém ainda é necessário que haja um aprofundamento em seus estudos para garantir que também não causará prejuízos à saúde humana e à natureza.

Dessa forma, os objetivos gerais e específicos deste trabalho foram alcançados, sendo possível conciliar uma fotoinativação eficiente com a separação de fases do fotossensibilizador usado.

6. PROPOSTA DE TRABALHOS FUTUROS

Para que haja um melhoramento deste trabalho, propomos o teste em reator fotoquímico tipo CPC (*Compound Parabolic Concentrator*), um sistema que possui superfícies que refletem a luz solar para um tubo cilíndrico por onde passa o efluente a ser tratado. Assim será possível analisar a eficiência da luz solar neste tipo de fotoinativação utilizando um sistema já estudado, economicamente viável e de fácil aplicação nas estações de tratamento de esgoto (DUARTE et al., 2005).

A avaliação de diferentes fotossensibilizadores naturais e sintéticos, bem como testes com diferentes micro-organismos também é necessária para se confirmar a total aplicabilidade do método estudado para a desinfecção de águas, sejam elas de efluentes ou não.

O estudo do pH adequado para melhorar a eficácia do processo de coagulação química, além da utilização de outras partes da *Moringa oleífera* da planta para avaliar sua atuação como coagulante de fotossensibilizadores.

7. REFERÊNCIAS

BATTERMAN, S., ZHANG, L., WANG, S., Quenching of Chlorination Disinfection By-product Formation in Drinking Water By Hydrogen Peroxide. **Water Research**. v. 34, n. 5, p. 1652-1658, 2000.

BONNETT, R., KRYSTEVA, M. A., LALOV, I. G., ARTARSKY, S. V. Water disinfection using photosensitizers immobilized on chitosan. **Water Research**. v. 40, p. 1269-1275, 2006.

CARNEIRO, L. C. Avaliação de *Escherichia coli* em manipuladores de alimentos da cidade de Morrinhos-GO. **Vita et Sanitas**, v. 2, n. 02, 2008

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA. Resolução N° 357, de 17 de março de 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em 22 jan. 2014.

COSTA, P. M. **Avaliação do efeito tóxico de Sulfato de alumínio e Sulfato de cobre em bioensaio de contaminação subcrônica via trófica no bioindicador *Rhamdia quelen* (Siluriforme)**, 2011. 117 f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

DANIEL, L. A., BRANDÃO, C. C. S., GUIMARÃES, J. R., LIBÂNIO, M., DE LUCA, S. J. Processos de Desinfecção e Desinfetantes Alternativos na Produção de Água Potável. 1ª edição. São Carlos – SP. Rima editora, 2001.

DIAS, K. B., SILVA, D. P., FERREIRA, L. A., FIDELIS, R. R., COSTA, J. L., SILVA, A. L. L., SCHEIDT, G. N. Chitin and chitosan: Characteristics, uses and production current perspectives **Journal of Biotechnology an Biodiversity**, v. 4, n. 3, p.184-191, 2013

DUARTE, E. T. F. M., XAVIER, T. P., SOUZA, D. R., MIRANDA, J. A., MACHADO, A. E. H. Construção e Estudos de Performance de um Reator Fotoquímico Tipo CPC (“Compound Parabolic Concentrator”) **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 921-926, 2005.

ERGAIEG, K., SEUX, R., A comparative study of the photoinactivation os bacteria by *meso*-substituted cationic porphyrin, rose Bengal and methylene blue. **Desalination**, v. 246. p. 353-362, 2009.

ESNARRIAGA, E. S. **Influência de sementes trituradas de *Moringa oleífera* no tratamento de efluente bruto de fossa séptica biogestora**. 2010. 39 f. Trabalho de conclusão de curso – Curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* em Química, Universidade Federal de Lavras, Corumbá, 2010.

FERRARO, M. J., WIJKER, M. A., CRAIG, W. A., DUDLEY, M. N., ELIOPOULOS, G. M., HECHT, D. W., HINDLER, J., RELLER, L. B., SHELDON, A. T., SWENSON, J. M., TENOVER, F. C., TESTA, R. T., WEINSTEIN, M. P. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico; Sexta Edição, **ANVISA**, v. 23, n. 2, 2003.

MACHADO, A. E. H., Terapia fotodinâmica: Princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, 2000.

MARGALL, N., DOMÍNGUEZ, A., PRATS, G., SALLERAS, L. *Escherichia coli* Enterohemerrágica. **Revista Española de Salud Pública**, v. 71, n. 5, p. 437-443, 1997.

MATOS, A. T., CABANELLAS, C. F. G., CECON, P. R., BRASIL, M. S., MUDADO, C. S. Efeito da concentração de coagulantes e do pH da solução na turbidez da água, em recirculação, utilizada no processamento dos frutos do cafeeiro. **Engenharia Agrícola**, v. 27, n. 2, p. 544-551, Jaboticabal, 2007.

NDABIGENGESERE, A., NARASIAH, K., S. Quality of Water Treated By Coagulation using *Moringa oleífera*. **Water Research**, v. 32, n. 3, p. 781-791, 1998.

NDABIGENGESERE, A., NARASIAH, K., S., TALBOT, B. G. Active agentes and mechanism of coagulation of turbid Waters using *Moringa oleifera*. **Water Research**, v. 29, n. 2, p. 703-710, 1995.

PATERNIANI, J. E. S., MANTOVANI, M. C., SANT'ANNA, M. R. Uso de sementes de *Moringa oleífera* para tratamento de águas superficiais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n. 6, p. 765-771, 2009.

PAULA, L. F., SANTOS, R. O., MENEZES, H. D., BRITTO, J. R., VIEIRA JR., J. B., GONTIJO FILHO, P. P., OLIVEIRA, C. A. A Comparative Study of Irradiation Systems for Photoinactivation of Microorganisms. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 4, p. 694-700, 2010.

PERUSSI, J. R., Inativação fotodinâmica de Microorganismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, 2007.

PESSEGUEIRO, P., BARATA, C., CORREIA, J. Brucelose – uma revisão sistematizada. **Medicina Interna**, v. 10, n. 2, p. 91-100, 2003.

PRITCHARD, M., CRAVEN, T., MKANDAWIRE, T., EDMONDSON, A. S., O'NEILL, J. G., A comparison between *Moringa oleífera* and chemical coagulants in the purification of drinking water – An alternative sustainable solution for developing countries. **Physics and Chemistry of the Earth**. V. 35, p. 798-805. 2010.

RANGEL, M. S. A. *Moringa oleífera*: uma planta de uso múltiplo. Aracaju –SE. Embrapa, 1999.

SILVA, H. S. R. C., SANTOS, K. S. C. R., FERREIRA, E. I., Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

SIMPLICIO, F. I., MAIONCHI, F., HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 801-807, 2002.

TRATA BRASIL. Situação do Saneamento no Brasil. Disponível em : <www.tratabrasil.org.br/situacao-do-saneamento-no-brasil>. Acesso em: 26 jun. 2013.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Drinking Water Contaminants. Disponível em: <water.epa.gov/drink/contaminants> Acesso em 30 abr. 2012.

VALVERDE, K. C., MORAES, L. C. K, BONGIOVANI, M. C., CAMACHO, F. P., BERGAMASCO, R. Coagulation diagram using the *Moringa oleifera* Lam and the aluminium sulphate, aiming the removal of color and turbidity of water. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 5, n. 3, p. 485-489, 2013.

VAZ, L. G. L., KLEN, M. R. F., VEIT, M. T., SILVA, E. A., BARBIERO, T. A., BERGAMASCO, R. Avaliação da Eficiência de Diferentes Agentes Coagulantes na Remoção de Cor e Turbidez em Efluente de Galvanoplastia. **Eclética Química**, v. 35, n. 4, 2010

8. APÊNDICE

O presente trabalho gerou a submissão de um artigo original à Revista Química Nova.

- De: sbqedit@sbq.org.br

Para: renata.osantos@yahoo.com.br

REF.: 014/14

Ilmo(a).Sr(a).
Prof(a). Santos, Renata
UFU
Uberlandia, Minas Gerais

Prezado(a) Prof(a). Santos, Renata,

Comunicamos a V.Sa. que seu manuscrito "ESTUDO DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE Escherichia coli EM ÁGUA UTILIZANDO AZUL DE METILENO E ROSA DE BENGALA" [REF.: 14/14] foi considerado para publicação em Química Nova, tendo recebido o seguinte parecer:

1. () O artigo foi aceito para publicação.
2. (x) O artigo poderá ser publicado, desde que atenda as sugestões do(s) assessor(es) em anexo e se enquadre nas normas da revista - ver em <http://quimicanova.sbq.org.br> - PRAZO MÁXIMO DE RETORNO - 30 DIAS
3. () O artigo poderá ser reconsiderado para publicação desde que devidamente reformulado e se enquadre nas normas da revista - ver em <http://quimicanova.sbq.org.br> - PRAZO MÁXIMO DE RETORNO - 30 DIAS
4. () Recusado.

(...)

Atenciosamente,

Marcelo R. Rossi
SBQ - assistente editorial
Caixa Postal: 26037
05513-970 São Paulo - SP

Tel.: +55.11.30322299
Fax.: +55.11.38143602
web: <http://quimicanova.sbq.org.br>
e-mail : sbqedit@sbq.org.br