

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

DOUGLAS BAMBIRRA DA SILVA

**OZONIOTERAPIA NA DESINFECÇÃO DE ÁGUAS
PLUVIAIS**

Belo horizonte
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

DOUGLAS BAMBIRRA DA SILVA

**OZONIOTERAPIA NA DESINFECÇÃO DE ÁGUAS
PLUVIAIS**

Monografia apresentada no Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de Especialista em Microbiologia Aplicada.

Aluno: Douglas Bambirra da Silva
Orientadora: Vera Lúcia dos Santos

Belo horizonte
2018

RESUMO

A escassez de água potável é um grande problema em muitos países em desenvolvimento, principalmente no Brasil, que vem sofrendo com essa falta de água nos últimos anos, devido ao uso irracional dos recursos hídricos. Uma das alternativas para minimizar esta problemática seria o aproveitamento de águas pluviais, baseado em sua coleta e armazenamento durante o período de chuva para uso posterior. As águas pluviais têm um grande potencial de uso como lavagem de automóveis, calçadas, áreas externas, utilização na lavagem de equipamentos industriais, dentre outros. Mas este tipo de água pode conter vários contaminantes orgânicos, como microrganismos patogênicos, adquiridos durante o contato primário com telhados e coberturas residenciais e/ou industriais antes de serem coletadas. Por esta razão, tem-se a necessidade de desenvolver novas tecnologias para a desinfecção da água de forma mais ambientalmente favorável, pois os biocidas convencionais à base de cloro geram subprodutos tóxicos potencialmente prejudiciais à saúde humana, como por exemplo os trihalometanos. Assim, a Ozonioterapia constitui uma alternativa sustentável para a desinfecção de águas pluviais. Esta tecnologia consiste na injeção do gás ozônio no volume de água a ser desinfetado onde o O_3 irá atuar como agente oxidante sem gerar subprodutos nem poluentes secundários. O elevado poder oxidante do O_3 resulta em uma alta eficiência na desinfecção, sendo superior ao cloro e inativando uma grande variedade de microrganismos patogênicos. Assim o presente trabalho buscou discutir e apresentar o potencial de uso de águas pluviais coletadas para atender as necessidades humanas e os benefícios associados, bem como a utilização da ozonioterapia para a desinfecção desta fonte de água doce. Foi discutido também o modo de ação do ozônio sobre os microrganismos, sua eficiência em comparação aos biocidas à base de cloro, além da viabilidade econômica da ozonioterapia como método de desinfecção.

Palavras chave: Ozonioterapia, Águas pluviais, Desinfecção, ozônio.

ABSTRACT

The shortage of drinking water is a major problem in many developing countries, especially in Brazil, which has been suffering from this lack of water in recent years due to the irrational use of water resources and the low rainfall. One of the alternatives to minimize this problem would be the use of rainwater, based on its collection and storage during the rainy season for later use. Rainwater has a great potential for use as car wash, sidewalks, external areas, use in the washing of industrial equipment, among others. But this type of water may contain several organic contaminants, such as pathogenic microorganisms, acquired during primary contact with residential and / or industrial roofs prior to collection. For this reason, there is a need to develop new technologies for more environmentally friendly disinfection of water, since conventional chlorine-based biocides generate toxic by-products potentially harmful to human health, such as trihalomethanes. Thus, Ozonotherapy is a sustainable alternative for the disinfection of rainwater. This technology consists of injecting the ozone gas into the volume of water to be disinfected where O₃ will act as an oxidizing agent without generating by-products or secondary pollutants. The high oxidizing power of O₃ results in a high efficiency in disinfection, being superior to chlorine and inactivating a great variety of pathogenic microorganisms. Thus, the present work aimed to discuss and present the potential of using rainwater collected for human consumption and associated benefits, as well as the use of Ozonotherapy for the disinfection of this freshwater source. Ozone action on microorganisms, their efficiency compared to chlorine-based biocides, and the economic viability of Ozonotherapy as a disinfection method were also discussed.

Key word: Ozonotherapy, Rainwater, Disinfection, Ozone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processo comercial de produção de Ozônio, por efeito corona	27
Figura 2: Modelo adaptado para desinfecção de efluente pluvial com gerador de ozônio produzido no local.	28
Figura 3: (1) Célula bacteriana intacta, (2) parede bacteriana sendo atacada pelo ozônio, (3) início da oxidação da parede celular, (4, 5 e 6) processo gradativo de ruptura da parede celular, levando a morte em poucos minutos.	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Potencial de oxidação de oxidantes fortes	25
Tabela 2: Principais propriedades físico-químicas do Ozônio	26
Tabela 3: Eficácia da aplicação do ozônio na redução da população bacteriana, sob diversas condições.	30
Tabela 4: Comparação das características dos processos de cloração e ozonização.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β – Beta

μm – Micrômetro

Cl – Cloro

DAEC - *E. coli* aderida difundidamente

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DQO – Demanda Química de Oxigênio

EAEC – *E. coli* enteroagregante

EHEC – *E. coli* Enterohemorrágica

EIEC – *E. coli* enteroinvasiva

EPEC – *E. coli* enteropatogênica

ETEC – *E. coli* Enterotoxinogênica

g – Gramas

KJ – Kilo Joule

Km^2 – Quilômetros quadrado

log – Logaritmo

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mol – Unidade molecular ou quantidade de matéria microscópica

MS – Ministério da Saúde

mV – Milivolts

NBR – Norma Brasileira Regulamentadora

nm – nanômetros

O_2 – Oxigênio

O_3 – Ozônio

OTUs – Unidade Operacional Taxonômica

pH – Potencial hidrogeniônico

RNA – Ácido ribonucleico

rRNA – Ácido ribonucleico ribossômico

UFC – Unidade Formadora de Colônias

UV – Ultrassom

UV – Ultravioleta

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO GERAL	11
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	11
METODOLOGIA DE PESQUISA	11
REVISÃO DE LITERATURA.....	11
4.1 TIPOS DE EFLUENTES	11
4.2 MICRORGANISMOS PRESENTES EM ÁGUA DOCE	13
4.2.1 Indicadores.....	13
4.2.2 Microrganismos patogênicos presentes em água doce	14
4.3 DESINFECÇÃO DE ÁGUAS.....	20
4.3.1 Métodos de desinfecção física	21
4.3.1.1 Radiação ultravioleta	21
4.3.1.2 Ultrassom.....	22
4.3.2 Métodos de desinfecção química.....	23
4.3.2.1 Cloro	23
4.3.2.2 Ozônio.....	24
4.4 OZONIOTERAPIA NA DESINFECÇÃO DE ÁGUAS PLUVIAIS	25
4.4.1 Vantagens e desvantagens do ozônio	31
4.5 VIABILIDADE ECONÔMICA	32
4.6 BENEFÍCIOS DA UTILIZAÇÃO DE ÁGUAS PLUVIAIS	33
4.6.1 Benefícios ambientais	33
4.6.2 Benefícios econômicos	34
4.6.3 Benefícios sociais	34
CONSIDERAÇÕES FINAIS	34

INTRODUÇÃO

A água é de longe a substância mais abundante na terra, cobrindo cerca de 77% da superfície, assim distribuída: 361,3 milhões de Km² de oceanos e mares, 17,5 milhões de Km² de calhas de rios e pântanos, 2,1 milhões de Km² lagos dentre outros (Braga *et al.*, 2006), somando um total de 97,5% da água de todo o planeta, destes 97,5% apenas 2,5% são consideradas águas doce, deste total de 2,5% somente 0,3% estão disponíveis para o consumo humano e suas atividades recreativas bem como na agricultura, que constituem em águas armazenadas em rios, lagos, lençóis freático dentre outros (Tundisi, 2003). Mas devido aos fatores como mudanças climáticas, poluição dos cursos d'água e consumo irracional, estes recursos naturais estão diminuindo seu volume ao passar dos anos. Assim, a gestão dos recursos hídricos visando o abastecimento da população se tornou um desafio mundial e em breve este recurso pode se tornar a causa de importantes conflitos entre nações. As águas utilizadas para abastecimento e consumo humano bem como para algumas atividades socioeconômicas são provenientes de várias fontes tais como represas, rios, reservatórios, lagos e outros. Mas a sua disponibilidade se torna cada vez mais insuficiente para atender à crescente demanda mundial, principalmente em países em constante desenvolvimento como o Brasil.

Atualmente, o Brasil vem enfrentando um grande período de estiagem, o que vem acarretando a falta de água em termos de abastecimento para consumo humano. Uma alternativa para minimizar esta problemática seria a coleta e o aproveitamento de águas pluviais, que são uma fonte natural de água doce proveniente do ciclo hidrológico (Brasil, 2017). A ação da força da gravidade e a energia do sol resulta na evaporação das águas dos oceanos e dos continentes. Na atmosfera, formam-se as nuvens que, quando carregadas, provocam precipitações, na forma de chuva, granizo, orvalho e neve (Brasil, 2017).

Devido a esta origem, estas águas podem apresentar pouca impureza e a captação destas águas para o uso como “água potável” é de extrema importância para regiões com escassez de água, como as semiáridas do Brasil. A prática de captação e aproveitamento de águas pluviais é utilizada desde muitos anos. Embora tenha caído em desuso com o surgimento de sistemas de abastecimento coletivo, ela ainda é muito utilizada em regiões onde não há abastecimento público, como por exemplo o programa do governo federal “Água Para Todos”, que contempla a construção de sistemas coletivos de abastecimento

de água, através da captação de águas de chuva que serão usadas posteriormente para abastecer a produção agrícola, alimentação, dentre outros fins (Brasil, 2016).

As águas de chuva coletadas podem ser utilizadas ainda para lavagem de automóveis, calçadas, áreas externas, vasos sanitários, equipamentos industriais, na agricultura, dentre outros. O uso desta como fonte de água potável requer um tratamento físico-químico relativamente simples e uma desinfecção adequada, com o intuito de reduzir e ou eliminar sua carga microbiana principalmente os agentes patogênicos que podem causar doenças em humanos.

Dentre os métodos de desinfecção disponíveis, os baseados nos biocidas oxidantes, como o cloro são os mais utilizados para abastecimento público. No entanto, o uso destes biocidas, podem gerar subprodutos tóxicos prejudiciais à saúde humana, como por exemplo os trihalometanos (Zarpellon e Rodrigues, 2002; Nikolaou *et al.*, 2004). Pensando em uma solução mais adequada e eficiente para a desinfecção de águas pluviais, a ozonioterapia apresenta-se como uma alternativa em substituição ao cloro. A ozonioterapia é uma técnica eficiente que utiliza o gás O_3 como agente de oxidação, devido ao seu grande poder oxidativo e seu alto potencial de inativação de microrganismos incluindo as bactérias patogênicas presentes em água doce, além de não gerar subprodutos e nenhum tipo de poluição secundária e ou resíduo tóxico (Pandiselvam *et al.*, 2017). O ozônio é um germicida natural, gerado a partir da quebra de uma molécula de oxigênio através da ação de descarga elétrica (efeito corona) e ou pela ação de radiação ultravioleta (Nbr, 1987). O átomo de oxigênio pode se juntar a uma outra molécula de O_2 formando o gás ozônio. A geração de O_3 além de simples é segura, resultando na redução de tempo e custos operacionais pois todo processo de produção do gás é realizado diretamente no local da aplicação evitando perdas. E isso torna a ozonioterapia um processo econômico, sustentável e de simples aplicação para desinfecção de águas pluviais.

Assim o presente trabalho irá discutir o potencial de uso de águas pluviais para atender as necessidades humanas e os benefícios associados e o uso da ozonioterapia para a desinfecção desta fonte de água doce. Será discutido também o modo de ação do ozônio sobre microrganismos, sua eficiência em comparação aos biocidas à base de cloro, além da viabilidade econômica da ozonioterapia como método de desinfecção.

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Apresentar o processo de desinfecção por ozonioterapia em águas pluviais coletadas bem como seus benefícios associados.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Demonstrar como o ozônio age sobre as bactérias associadas às águas pluviais;
Apresentar um comparativo de eficiência do processo de desinfecção por ozônio em relação aos biocidas à base de cloro;
Apresentar viabilidade econômica da utilização da ozonioterapia como método de desinfecção;
Apresentar os benefícios associados a utilização deste recurso nos aspectos ambientais, econômicos e sociais.

METODOLOGIA DE PESQUISA

Este presente trabalho é uma revisão da literatura sobre o estado da arte do tema em questão, dentro do cenário nacional e mundial. A pesquisa foi feita em bancos de dados bibliográficos disponíveis na internet, sendo eles PubMed, NCBI, SciELO, ELSEVIER e Google Acadêmico, com consulta a artigos e livros científicos para aquisição das informações e assim a materialização deste trabalho.

REVISÃO DE LITERATURA

4.1 TIPOS DE EFLUENTES

Os efluentes gerados em uma cidade são provenientes de atividades humanas e / ou da natureza, que incluem basicamente atividades domésticas, hospitalares, industriais e do ciclo natural das chuvas, onde cada tipo de efluente tem suas próprias características e peculiaridades. Assim, com a crescente expansão populacional, há um aumento significativo do número de residências, que ao demandarem um maior volume de água

potável, geram também uma grande quantidade de efluentes domésticos. Estes podem ser classificados como águas provenientes de cozinha, banheiros, lavanderias, dentre outros locais de uma residência (Carraro *et al.*, 2016). Este conceito inclui também os efluentes provenientes de hotéis, casas de diversões, clubes, comércios e centros comerciais, de serviços salões de cabeleireiros, consultórios, clínicas, etc (Archela *et al.*, 2010). Estas águas residuárias são caracterizadas por conter contaminações químicas e biológicas, e podem variar de acordo com a fonte. Já as águas residuais hospitalares podem conter substâncias perigosas, como resíduos farmacêuticos, substâncias químicas perigosas, agentes patogênicos e radioisótopos. Devido a estas substâncias, as águas residuais hospitalares podem representar um risco químico, biológico e físico para a saúde pública e ambiental.(Carraro *et al.*, 2016).

Os efluentes gerados nas indústrias também apresentam características variáveis de acordo com o setor produtivo. No geral, estes efluentes apresentam alta demanda química de oxigênio (DQO) e/ou demanda bioquímica de oxigênio (DBO), cor, turbidez e faixas extremas de pH e temperatura (Massara *et al.*, 2017). Outros elementos como metais pesados, incluindo chumbo, cromo, arsênio, cádmio e mercúrio e compostos orgânicos tóxicos também podem ser observados.

Já as águas pluviais são provenientes do ciclo hidrológico natural das águas, onde suas características físico-químicas variam de acordo com a região e com as superfícies que entram em contato, como os telhados e coberturas de edificações. As características mais importantes são turbidez, sólidos suspensos, temperatura, pH, íons dissolvidos, compostos químicos e presença de microrganismos como bactérias, vírus e protozoários.

As águas pluviais captadas em edificações podem ser utilizadas para diversos fins desde que atenda as normatizações para água doce que estabelecem os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade (Brasil, 2011). Neste contexto, as águas de chuva constituem uma fonte alternativa de água para fins potáveis e não potáveis (Mendez *et al.*, 2011), podendo contribuir para uma redução do consumo de água fornecida pelos sistemas de abastecimento público. Mas sua coleta e utilização necessita de estudos e análises, como a avaliação de possíveis riscos microbiológicos e químicos, além de adequações nas instalações hidráulicas junto com um estudo de viabilidade econômica, evitando projetos inadequados que possam comprometer as edificações onde a água será captada (Funasa *et al.*, 2013). Merecem destaque os estudos voltados para o conhecimento das características físico-químicas e microbiológicas destas águas e para a proposição de

métodos de tratamento e desinfecção adequados que garantam a segurança de uso das mesmas.

Assim, para que se possa aproveitar, utilizar e ou reutilizar todo potencial deste recurso alternativo é necessário um estudo detalhado do tipo de microrganismos que podem estar vinculados com as águas de chuva tendo como base a Portaria 2.914 do Ministério da Saúde, que preconiza os níveis de qualidade de águas doce baseados nos indicadores microbiológicos.

4.2 MICRORGANISMOS PRESENTES EM ÁGUA DOCE

4.2.1 Indicadores

As águas pluviais podem apresentar uma alta carga de microrganismos que utilizam a água como veículo para a sua disseminação e proliferação, incluindo espécies patogênicas (Ligon e Bartram, 2016; Vaz-Moreira *et al.*, 2017). No entanto as características microbiológicas destas águas variam de acordo com a região, qualidade da atmosfera e com a superfícies que as águas das chuvas entram em contato no processo de precipitação (Brasil, 2017). Assim, a contaminação pode estar associada ao contato com os componentes atmosféricos presentes no ar como partículas orgânicas, inorgânicas e microrganismos, e ao contato com telhados e cobertura de edificações, que podem apresentar ainda microrganismos associados a fezes de pequenos mamíferos, aves e insetos, além de folhas e material depositados devido à ação dos ventos (Helmreich e Horn, 2009).

Diante do exposto, há uma preocupação com os potenciais riscos associados ao uso das águas pluviais para atividades que envolvem o contato direto com o homem sem a devida desinfecção. No Brasil, existem normatizações que descrevem os parâmetros de qualidade de água potável. Elas estão escritas na Portaria do Ministério da Saúde - MS nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011, que preconiza que as águas destinadas para o consumo humano e em suas atividades, provenientes de sistemas e ou solução alternativa de abastecimento, deve estar ausente de microrganismos do grupo coliformes (Brasil, 2011). Nesta legislação, este grupo de microrganismos são utilizados como indicadores da presença de material fecal, deste modo para a determinação da qualidade microbiológica da água, amostras são analisadas quanto a presença e ausência destes microrganismos.

Assim para se ter uma água apropriada para o consumo humano, os valores devem ser ausência de coliformes em 100ml de água (Brasil, 2011; Funasa *et al.*, 2013).

Algumas ponderações devem ser feitas no momento da interpretação dos testes de qualidade microbiológica de uma amostra de água, pois certas espécies do grupo coliforme vivem fora do ambiente do trato gastrointestinal e podem resultar em uma falsa indicação de contaminação fecal (Pisciotta *et al.*, 2002). Além disso, várias estirpes de *Escherichia coli* que são de origem ambiental podem ser termotolerantes, dando assim resultados falsos positivos nas análises (Edberg *et al.*, 1990; Jang *et al.*, 2017). Outro importante indicador é o grupo dos enterococos, também encontrados em números elevados em fezes humanas e animais e, portanto, são também um indicador valioso para determinar a extensão da contaminação fecal de uma fonte de água (Savichtcheva e Okabe, 2006; Ahmed *et al.*, 2012). Há também outros tipos de microrganismos patogênicos oportunistas que podem estar vinculados a água incluindo a água de chuva, como algumas bactérias dos gêneros *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter*, além das *Aeromonas*, *Campylobacter* e *Mycobacterium* (Albrechtsen, 2002; Fewtrell e Kay, 2007; Ahmed *et al.*, 2010). Assim, é de grande importância conhecer as espécies microbianas presentes em águas pluviais bem como suas características morfológicas e fisiológicas associadas com a sobrevivência nestas águas e seu potencial patogênico, pois são características importantes para definir o risco, níveis aceitáveis e métodos de controle e desinfecção.

4.2.2 Microrganismos patogênicos presentes em água doce

Os microrganismos patogênicos podem estar presentes nas águas pluviais coletadas, devido ao contato das águas de chuva com o ar atmosférico e com as superfícies de contato, como já discutido no tópico acima. Este grupo inclui os causadores de doenças em humanos, cujos sintomas podem ser mais severos se associadas a crianças, idosos e indivíduos imunossuprimidos, grupos de maior vulnerabilidade aos agentes patogênicos (Pfaller e Jorgensen, 2015).

Assim, é necessária a remoção destes agentes patogênicos da água para consumo ou que entre em contato com os humanos. Mas para que se possa propor métodos eficientes para desinfecção e controle destes microrganismos presentes em águas coletadas, é necessário que se estude e entenda as características morfológicas, fisiológicas e sua patogenicidade.

Escherichia coli

Escherichia coli é pertencente ao filo Proteobacteria, da classe Gammaproteobacteria e da família Enterobacteriaceae. Foi isolada pela primeira vez no intestino de animais homeotérmicos e identificada em 1885 por Theodor Von Escherich, um médico pediatra especialista em doenças infecciosas (Shulman *et al.*, 2007). A espécie apresenta alta plasticidade genômica, que resulta na perda ou aquisição de genes de virulência, resistência a antimicrobianos e resistência as condições a estressores ambientais (Pfaller e Jorgensen, 2015; Jang *et al.*, 2017; Probert *et al.*, 2017).

As células são Gram-negativas, móveis por meio de flagelos peritríquios, não pigmentadas, oxidase negativas e anaeróbias facultativas (Meier-Kolthoff *et al.*, 2014). Elas produzem ácido e gás a partir da fermentação da glucose, lactose ou outros carboidratos (Welch, 2005). Em condições ambientais normais, a célula de *E. coli* possui um formato cilíndrico denominado bacilo. O tamanho da célula pode variar de 1,1 a 1,5 µm por 2,0 a 6,0 µm enquanto vivas, e 0,4 a 0,7 µm por 1,0 a 3,0 µm quando desidratadas (Naturdata, 2017). Embora a *E. coli* seja considerada como uma bactéria residente inócua do trato gastrointestinal humano, esta espécie apresenta variantes patogênicas. Os patótipos de *E. coli* para humanos são baseados em fatores de virulência presentes em plasmídeos ou em ilhas de patogenicidade (Johnson e Nolan, 2009). São eles *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e a *E. coli* (DAEC) de adesão difusa (Nataro e Kaper, 1998). Estes patótipos possuem a capacidade de causar diarreia aquosa com muco e com hipotermia, diarreias com muco e sangue, vômitos, febre, distúrbios no intestino grosso, diarreia sanguinolenta (Disenteria), colite hemorrágica, síndrome urêmico hemolítica e púrpura trombótica trombocitopênica (Junior e Macari, 2000).

As vias de infecções estão associadas principalmente por contaminação oral-fecal, pela ingestão de alimentos e ou águas contaminadas por este agente. Este tipo de infecção ocorre principalmente em locais com condições sanitárias precárias.

Klebsiella spp.

As bactérias do gênero *Klebsiella*, pertencente à família das Enterobacteriaceae foram isoladas pela primeira vez pelo brasileiro e escritor Dalton Trevisan (Brisse *et al.*, 2006). O nome *Klebsiella* foi dado a esta bactéria em homenagem ao microbiologista alemão Edwin Klebs (Brisse *et al.*, 2006). Trevisan também foi o responsável pela

identificação da espécie *K. pneumoniae* (Brisse *et al.*, 2006). Suas células têm forma de bacilo, são Gram-negativas, encapsuladas, não esporuladas e o tamanho pode variar de 0,3 a 1 µm de diâmetro e 0,6 a 6 µm de comprimento. Tem motilidade restrita e suas colônias são grandes e possuem aspecto cremoso, quando há a disponibilidade de todos os nutrientes necessários e quando isolada em Ágar MacConkey, suas colônias possuem aspecto luminoso (Martínez *et al.*, 2004). A espécie é anaeróbica facultativa, mas o seu crescimento é favorecido em condições de aerobiose (Brisse *et al.*, 2006).

A colonização e infecção de seres humanos por esta bactéria podem ocorrer por contato com diversas fontes ambientais. Sua virulência está associada a uma cápsula polissacarídica que confere à bactéria resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro. *Klebsiella* produz uma enterotoxina estável ao calor, a presença de adesinas e ou fímbrias a auxiliam no processo de fixação as mucosas das células epiteliais do trato urogenital, respiratório e intestinal, para que assim possa iniciar o processo infeccioso (Brisse *et al.*, 2006). A espécie pode estar associada a meningites e sepse, infecções do trato urinário, pneumonia, rinite crônica atrófica, artrites dentre outras (Madison *et al.*, 1994; Podschun e Ullmann, 1998).

Citrobacter spp.

As bactérias do gênero *Citrobacter spp.* são Gram-negativas não esporuladas, pertencentes à família Enterobacteriaceae e, como o nome sugere, geralmente utilizam citrato como única fonte de carbono. Estes microrganismos são anaeróbios facultativos, tem sua motilidade por meio de flagelos peritríquios, tem capacidade de fermentar a glicose e outros carboidratos produzindo ácidos e gases (Janda *et al.*, 1994). Assim como observado para *E. coli*, as cepas de *Citrobacter* são bactérias que normalmente habitam o trato intestinal humano e animais homeotérmicos, e também são comumente distribuídas em ambiente natural, como solo, água, esgoto, fezes e alimentos, sua (Sedlák, 1973; Smith *et al.*, 2010). A classificação atual de *Citrobacter* é baseada em testes moleculares e seu diagnóstico é realizado pela técnica de cultivo, baseando-se em testes bioquímicos (Smith *et al.*, 2010).

A virulência das bactérias deste gênero é baixa, mas podem causar sérias infecções caso não haja tratamento adequado, principalmente em pessoas imunossuprimidas (Sedlák, 1973; Tellez *et al.*, 2000). Podem estar associadas a quadros de infecções do trato urinário e cutâneas, pneumonia, abscessos e endocardite em adultos, bem como

septicemia, meningite e abscessos cerebrais em neonatos (Tellez *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2001).

Enterobacter spp.

As bactérias do grupo *Enterobacter spp.* são pertencentes à família Enterobacteriaceae e são amplamente encontradas na natureza. São Gram-negativas e anaeróbias facultativas, são catalase-positivas, oxidase e DNase negativas, fermentativas e não pigmentadas. No ambiente, são geralmente encontrados no solo, água doce, esgoto e fezes humanas, por fazerem parte da microbiota entérica comensal do trato gastrointestinal (Mezzatesta *et al.*, 2012).

O gênero foi descrito por Hormaeche e Edwards em 1960, e desde então vem sofrendo modificações significativas em sua taxonomia (Hormaeche e Edwards, 1960). Atualmente, são conhecidas 22 espécies do gênero (Euzéby, 2013). Sua identificação é rotineiramente realizada usando métodos fenotípicos e técnicas taxonômicas em hibridização DNA-DNA de todo o genoma, normalmente utilizada na caracterização e identificação da família Enterobacteriaceae (Mezzatesta *et al.*, 2012).

Pouco se sabe sobre os fatores de virulência que as bactérias do gênero *Enterobacter spp.* podem causar em seres humanos (Sanders e Sanders, 1997). Algumas espécies do gênero podem atuar como patógenos oportunistas causando infecções gastrointestinais, urinárias e ocasionalmente podem também provocar septicemia e meningite (Pfaller e Jorgensen, 2015).

Enterococcus spp.

Os enterococos foram descobertos na última década do século XX como uma das principais causas das infecções adquiridas em hospitais (Murray *et al.*, 2008). O gênero *Enterococcus* pertence à família Enterobacteriaceae, e inclui bactérias com forma de cocos, catalase-negativos individuais que ocorrem isoladamente ou estão dispostos em pares ou como cadeias curtas. São Gram-positivas presentes na microbiota intestinal de humanos e tratos gastrointestinais animais em concentrações variando de 10^4 a 10^6 células por grama de fezes (Shibata *et al.*, 2004; Farnleitner *et al.*, 2010; Layton *et al.*, 2010). As espécies deste gênero são anaeróbias facultativas com metabolismo homofermentativo, com produção de ácido lático como produto final da fermentação de glicose (Pfaller e Jorgensen, 2015). Geralmente são capazes de crescer a grandes variações de temperaturas, mas seu crescimento ótimo está na faixa de 35°C a 37°C. A

grande maioria deste grupo cresce em caldo contendo 6,5% de NaCl e hidrolisam esculina na presença de sais biliares (Pfaller e Jorgensen, 2015).

Os enterococos são detectados de forma ubíqua nos ambientes aquáticos, mas podem sobreviver em uma variedade de ambientes, como solo, esgoto, alimentos e plantas sendo capazes de sobreviver nestes ambientes por longos períodos (Franzetti *et al.*, 2004; Graves e Weaver, 2010; Nishiyama *et al.*, 2015). Devido a sua abundância, estes estão normalmente presentes nos tratos intestinais de animais homeotérmicos e são liberados para o meio ambiente através de suas fezes, podendo ser utilizados como indicadores de contaminação fecal (Usepa, 1986; Shibata *et al.*, 2004; Bessa *et al.*, 2014).

Atualmente, a abordagem polifásica é a mais utilizada para identificação do gênero *Enterococcus*, esta combina técnicas moleculares diferentes, como reassociação de DNA-DNA, sequenciamento de genes do rRNA 16S e testes fenotípicos (Pfaller e Jorgensen, 2015).

As bactérias do gênero *Enterococcus* são agentes oportunistas comensais podendo causar uma grande variedade de infecções em seres humanos, muitas destas infecções ocorrem no trato intestinal, que é seu principal local de colonização. Estes agentes patogênicos também podem utilizar a circulação sanguínea como veículo para proliferação, podendo infectar o endocárdio, o trato urinário, região pélvica, além de causar doenças como meningite e septicemia (Malani *et al.*, 2002; Baldassarri *et al.*, 2005; Arias e Murray, 2012). A patogenicidade destas bactérias ainda é pouco compreendida pelos infectologistas. Alguns estudos epidemiológicos apontam que existem subconjuntos de linhagens mais virulentas com maior propensão para causar doenças e que são responsáveis por infecções com proporções epidêmicas (Top *et al.*, 2007; Willems e Bonten, 2007; Arias e Murray, 2012).

Aeromonas spp.

As espécies do gênero *Aeromonas spp.* estão dentro da família das *Aeromonadaceae* (Colwell *et al.*, 1986). São bactérias Gram-negativas, aeróbias facultativas oxidase e catalase positivas, com forma de bacilo que altera forma mais curta ou esférica em situações de injúria pela baixa disponibilidade de nutrientes. Possuem extremidades arredondadas medindo 0,3 a 1,0 µm de diâmetro e 1,0 a 3,5 µm de comprimento. Podem ser móveis por possuírem flagelo polar com um comprimento de 1,7 µm, mas podem ser observados flagelos peritríquios em meio de cultura sólido em culturas jovens, ou laterais em algumas espécies. Também podem apresentar fimbrias de

adesão e não formam esporos de resistência. Sua ocorrência é isolada, em pares ou em pequenas cadeias (Pfaller e Jorgensen, 2015). Possuem a capacidade de fermentar vários carboidratos com produção de ácido e gás. O gênero *Aeromonas* é encontrado em ecossistemas aquáticos como águas subterrâneas, reservatórios e lagos e rios limpos ou poluídos, em todo o mundo. Por este motivo estão associados as infecções humanas e em animais (Pfaller e Jorgensen, 2015).

As principais infecções causadas por *Aeromonas spp.* são gastroenterites e diarreias, sendo estas infecções oportunistas provocadas em pacientes imunocomprometidos (Janda e Abbott, 2010; Batra *et al.*, 2016). Os fatores de patogenicidade das espécies deste gênero incluem enterotoxinas, citotoxinas, hemolisinas, aerolisinas e proteases, que causam diversas injúrias teciduais nas células dos hospedeiros, levando a sérias doenças como disenteria, septicemia, meningite, endocardite, artrite e infecções respiratórias, cutâneas e oculares (Carnahan *et al.*, 1989; Janda, 1991; Pereira *et al.*, 2008; Parker e Shaw, 2011).

Campylobacter spp.

As espécies do gênero *Campylobacter spp.* foram reconhecidas como agentes patogênicos há mais de um século, onde a primeira observação deste microrganismos é datada de 1886 (Park, 2002). Estas são geralmente curvas com formato de “S” em espiral, possuem comprimento aproximado de 0,2 a 0,9 µm de largura e 0,5 a 5 µm de comprimento. São Gram-negativas, oxidase-positivas e não formadoras de esporos de resistência, mas podem assumir formas esféricas ou de cocos quando em culturas expostas ao ar atmosférico por grande período de tempo (Pfaller e Jorgensen, 2015). Estes organismos possuem motilidade através de um único flagelo polar, que pode estar em uma ou em ambas as extremidades, sendo que algumas espécies podem carecer deste mecanismo de movimento (Cover e Blaser, 1989). O gênero possui várias espécies e sua taxonomia mudou consideravelmente ao longo do tempo. Atualmente, existem 15 espécies e 6 subespécies (Engvall, 2002).

É importante atentar ao consumo e ingestão de águas superficiais sem devido tratamento e desinfecção, pois o risco de contaminação por este tipo de bactérias é alto (Park, 2002; Olson *et al.*, 2008). *Campylobacter spp.* pode colonizar o trato intestinal de uma variedade de animais incluindo humanos no qual algumas espécies como *C. jejuni* causam graves doenças entéricas como a colite, o que resulta em febre e diarreias, septicemia e infecções gastrointestinais (Blaser *et al.*, 1980; Blaser *et al.*, 1983).

Mycobacterium spp.

As bactérias do gênero *Mycobacterium spp.* pertencem à ordem Actinomycetales, e à família *Mycobacteriaceae* (Shinnick e Good, 1994). No ano de 1980 se conhecia apenas 41 espécies pertencentes a este gênero o que com o passar dos anos e avanço de tecnologias para identificação de novas espécies, hoje são reconhecidas mais de 60 espécies.

As micobactérias são microrganismos considerados Gram-negativos embora não sejam coradas pela coloração de Gram, mas sim pelos métodos de Ziehl-Neelsen e de Kinyoun. As duas técnicas utilizam carbolfucsina, o que cora as células em vermelho e por serem resistentes ao álcool-ácido são chamadas de “bacilos álcool-ácido resistentes” (Wildner *et al.*, 2011). Estes microrganismos apresentam-se em forma bacilar, ligeiramente curvas ou retas e possuem dimensões que variam de 0,2µm a 0,6µm de largura e 1µm a 10µm de comprimento, não produzem esporos nem cápsulas. São aeróbios ou microaerófilos e não possuem motilidade (Rangel, 2004; Wildner *et al.*, 2011; Pfaller e Jorgensen, 2015). Em sua maioria, as micobactérias são saprófitas, vivem e se replicam em ambientes naturais, mas há uma pequena parcela que se adapta ao ambiente intracelular, tornando agentes patogênicos em seres humanos (Leao *et al.*, 2004; Palomino *et al.*, 2007).

O gênero *Mycobacterium* inclui patógenos obrigatórios, patógenos oportunistas e comensais. Elas são muito resistentes e podem ser encontradas em diferentes locais, como água, terra, alimentos e superfície de animais (Rangel, 2004). Nos últimos anos, grandes progressos foram obtidos na compreensão da patogenia e dos fatores de virulência associados as micobactérias, devido a aplicação de novas tecnologias moleculares, com sequenciamento completo do genoma e análises comparativas utilizando as classificações já existentes. Com isso a ciência genômica tornou possível entender o mapa genético de várias espécies de micobactérias importantes, principalmente as que colonizam seres humanos (Pfaller e Jorgensen, 2015) e que causam infecções subcutâneas e doenças como hanseníase (lepra) e principalmente pulmonares como a tuberculose (Fontana, 2008).

4.3 DESINFECÇÃO DE ÁGUAS

A desinfecção das águas que entra em contato com o homem, seja ela pluvial ou não é de extrema importância, pois este processo visa a eliminação microrganismos patogênicos que utilizam a água com veículo para a sua disseminação e proliferação. Por

este motivo a desinfecção pode ser entendida como a última barreira de proteção contra possíveis agentes patogênicos presentes na água e conseqüentemente de proteção à saúde pública (Ligon e Bartram, 2016).

Em microbiologia, o termo desinfecção refere-se à inativação seletiva e ou destruição de organismos causadores de doenças, com o objetivo de eliminar o risco de contaminação, lembrando que nem sempre os elimina 100%. Mas não se deve confundir com a esterilização, que objetiva eliminar todos os organismos presentes na água (Werf, 1995).

Segundo o Manual da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, existe três mecanismos principais para inativação de microrganismos patogênicos na desinfecção (Usepa, 1999). São eles: interferência na síntese de DNA, destruição da organização das estruturas celulares e interferência no metabolismo. Ela pode ser feita através de métodos físicos e ou químicos, utilizando diferentes agentes de desinfecção.

4.3.1 Métodos de desinfecção física

Os métodos físicos, mais comumente utilizados na desinfecção de efluente e água em geral são a radiação ultravioleta e o ultrassom, estes métodos permitem a inativação de microrganismos através de ondas eletromagnéticas e ondas mecânicas.

4.3.1.1 Radiação ultravioleta

Apesar dos biocidas a base de cloro serem os desinfetantes químicos mais utilizados para a inativação de microrganismos, vários estudos tem sido realizados, buscando consolidar e viabilizar o uso da radiação UV, tanto no âmbito industrial como no de saúde pública (Rizzo *et al.*, 2014). Radiação UV corresponde a faixa do espectro eletromagnético que vai de 100 a 400nm, mas a faixa com efeito germicida está entre 240 a 280nm, sendo esta a utilizada na desinfecção de efluentes (Gerba, 2014).

O uso de radiação UV na desinfecção de águas e efluentes surgiu como uma alternativa de substituição do cloro, pois não deixa resíduos e minimiza a geração de subprodutos prejudiciais à saúde humana (Biesek *et al.*, 2015). A radiação UV age diretamente no material genético dos microrganismos, uma vez os ácidos nucleicos (DNA e RNA) são os principais absorvedores de energia da luz com faixa de comprimento de 240 a 280nm (Werf, 1995). Devido os ácidos nucleicos carregarem as informações

genéticas que governam os processos celulares incluindo a reprodução, danos nestas regiões podem inativar os microrganismos de forma efetiva.

O principal dano decorrente absorção de radiação UV está associado a dimerização de duas moléculas de pirimidinas, que resulta em erros na replicação do DNA e RNA e conseqüentemente morte celular (Werf, 1995; Song *et al.*, 2016). Esta radiação em altas doses pode ainda causar danos e rompimento das membranas celulares, resultando em morte celular (Daniel, 2001).

Alguns estudos mostram a afirmação feita por Daniel (2001) de que a aplicação do UV tem grande eficiência em termos de inativação de microrganismos. Wisbeck *et al.* (2011) mostraram a eficácia da radiação ultravioleta na eliminação de bactérias do grupo dos coliformes totais de amostras de água de chuva captadas diretamente de calhas de telhados. As amostras foram expostas a doses de radiação UV superiores a 9,2 mW. s/cm² durante 60 segundos e permaneceram livres de contaminação por até 72 horas de estocagem. Também Gonçalves (2012) relatou a eficiência do processo de desinfecção por aplicação de altas doses de radiação UV, variando entre 111 e 148 mW. s/cm² com variação de tempo entre 195 e 259,8 segundos. O tratamento inativou em aproximadamente 100% a densidade de coliformes totais e *Escherichia coli* (EPEC) em todas as amostras.

4.3.1.2 Ultrassom

Outra técnica muito utilizada na desinfecção de águas é o Ultrassom (US), esta técnica consiste no uso de energia gerada por ondas sonoras de 20.000 ou mais vibrações por segundo (20KHz) em altas frequências (0,1 a 20MHz) e baixa potência (100 mW/cm²) em um meio líquido (Villanueva *et al.*, 2015). Quando os líquidos são expostos a essas vibrações, mudanças físicas e químicas ocorrem como resultado de um fenômeno físico, conhecido como cavitação (Dehghani, 2005). A cavitação pode ser entendida como o processo de nucleação, crescimento e colapso de bolhas transitórias formadas a partir da aplicação do US em um meio líquido, com conseqüente desinfecção (Gogate e Kabadi, 2009), ou seja, é a formação, expansão e implosão de bolhas microscópicas de gás em líquido, uma vez que as moléculas no líquido absorvem energia ultrassonográfica (Dehghani, 2005). As ondas de compressão formadas pelo US se movem rapidamente através do meio líquido. Se as ondas forem suficientemente intensas, quebrarão as forças

intermoleculares existentes e criam bolhas de gás. A medida que a energia ultrassônica vai penetrando no líquido, as bolhas de gás vão crescendo e atingindo tamanhos críticos, assim ao alcançar este tamanho crítico, as bolhas de gás implodem, com isso a energia que existe dentro da cavidade e na proximidade imediata das bolhas de gás causa efeitos físicos e químicos no líquido. Estes efeitos acontecem quando a cavitação é intensa e suficiente para romper as membranas celulares dos microrganismos presentes e isso ocorre através das colisões entre as partículas ou forçando-as a separarem levando estas células a morte.

Mas a eficácia da utilização de US na desinfecção de águas depende diretamente da natureza das ondas ultrassônicas, do tempo de exposição, do tipo de microrganismo e do volume de água a ser desinfetado. Em algumas situações, a técnica não é suficiente para a redução da carga microbiana, sendo necessário a associação com outros métodos de desinfecção (Butz e Tauscher, 2002; Gómez-López *et al.*, 2014). Assim, o método de desinfecção por US também é muito promissor e sua eficácia pode ser aumentada quando utilizado em conjunto com agentes químicos oxidantes.

4.3.2 Métodos de desinfecção química

Atualmente dentre os métodos de desinfecção química os biocidas a base de cloro são os mais utilizados, por serem mais baratos e de fácil aplicação. Mas também existem outros agentes oxidantes eficientes como o ozônio, que será apresentado a seguir.

4.3.2.1 Cloro

O Cloro foi descoberto ocasionalmente em 1774 por Carl Wilhelm Scheele, este elemento químico é um gás de coloração amarelo esverdeado com odor extremamente penetrante (Di Bernardo e Dantas, 2005). Causa irritabilidade das vias respiratórias na forma gasosa, mas na forma sintética como barras e ou em forma de grânulos reduz os efeitos tóxicos (Di Bernardo e Dantas, 2005).

O cloro é o desinfetante mais utilizado mundialmente para desinfecção de águas, sua ação se dá principalmente na membrana citoplasmática das células microbianas modificando sua permeabilidade (Venkobachar *et al.*, 1977). Outra ação do cloro é a hidrólise de polissacarídeos da parede celular microbiana, causando assim um enfraquecimento e morte celular (Werf, 1995).

A utilização do cloro como agente desinfetante apresenta alguns problemas. Além de ser um gás venenoso e corrosivo, o cloro pode reagir com inúmeros compostos orgânicos e inorgânicos o que leva a formação de subprodutos prejudiciais à saúde humana como por exemplo trihalometanos, ácidos haloacéticos e halocetonas (Daniel, 2001; Hua e Reckhow, 2008). Os danos causados por alguns destes subprodutos são irreversíveis, como os associados aos trihalometanos, que são compostos formados durante o tratamento de água, sendo um subproduto da desinfecção, quando se utiliza produtos químicos à base de cloro. Os trihalometanos são derivados do metano onde três de seus átomos de hidrogênio se dissociam em água dando lugar ao cloro livre, formando um novo composto o clorofórmio o qual está associado a quadros carcinogênicos e mutagênicos (Singer, 1999; Nikolaou *et al.*, 2004). A Fundação de Pesquisa em Meio Ambiente de Água (Werf, 1995) aponta outras desvantagens associadas ao uso deste biocida, quais sejam: concentrações inadequadas deste biocida podem não ser o suficiente para inativar patógenos presentes no efluente e o cloro residual é instável na presença de altas concentrações de matérias que reagem com ele. Assim nestas situações maiores doses são requeridas para a desinfecção da corrente hídrica em questão, resultando ainda na formação de altas concentrações dos subprodutos tóxicos.

4.3.2.2 Ozônio

O ozônio foi descoberto por Van Marum em 1785, mas somente em 1840 que Schonbein demonstrou que o ozônio era um gás que poderia ser produzido a partir de uma descarga elétrica no ar atmosférico nomeando-o de Ozônio, do grego *Ozein* que significa Ozônio (Gerrity *et al.*, 2017; Pandiselvam *et al.*, 2017). Em 1857 foi construído por Siemens o primeiro aparato para produção de ozônio e em 1867 Soret estabeleceu a fórmula química do ozônio (O_3) (Johnson, 1975). O primeiro uso do ozônio na desinfecção de água se deu em 1886 na cidade Oudshoorn na Holanda, quando De Meritens usou para tratar águas do rio Reno, após as mesmas terem passado por processos de sedimentação e filtração (Diaper, 1975; Johnson, 1975). Após esta aplicação de sucesso, mais de 1000 instalações foram feitas em diferentes países com intuito de promover a desinfecção das águas para o consumo humano, como por exemplo na Rússia, Canada, Suíça, Alemanha, França, dentre outros (Johnson, 1975).

O ozônio é um gás incolor de odor pungente e é a forma triatômica do oxigênio. Em fase aquosa tem a capacidade de se decompor rapidamente em oxigênio (Johnson,

1975), o que lhe confere uma grande vantagem, pois não gera subprodutos tóxicos e ou poluentes (Edna *et al.*, 2004). Atualmente, tem se aplicado o ozônio em processos que buscam a decomposição de matéria orgânica e como desinfetante nos processos de potabilização de águas, principalmente em países desenvolvidos (Johnson, 1975). Seu poder de oxidação é superado apenas pelo flúor e pelo radical hidroxila, mas se sobressai em relação ao peróxido de hidrogênio e o cloro.

Espécie oxidante	Potencial de oxidação E° (Volts)
Flúor	(+2,87)
Radical hidroxila	(+2,80)
Ozônio	(+2,07)
Peroxido de hidrogênio	(+1,77)
Permanganato	(+1,68)
Dióxido de cloro	(+1,50)
Cloro	(+1,36)
Bromo	(+1,07)
Iodo	(+0,54)

Tabela 1: Potencial de oxidação de oxidantes fortes

Fonte: (Reiff e Witt, 1995)

Dentre as características que o ozônio possui no processo de desinfecção de águas, algumas chamam mais a atenção, como o controle de formação de subprodutos tóxicos pois o seu alto poder de oxidação promove uma rápida eliminação de compostos orgânicos presentes (Lazarova *et al.*, 1999).

4.4 OZONIOTERAPIA NA DESINFECÇÃO DE ÁGUAS PLUVIAIS

A ozonioterapia é um processo comumente utilizado na terapia médica e veterinária para tratamento de algum tipo de infecção bacteriana, e na desinfecção de efluentes em unidades de tratamento terciário, correntes hídricas diversas na indústria, bem como de águas de piscinas (Matos Neto *et al.*, 2016; Gerrity *et al.*, 2017). Ele pode

ser usado ainda na desinfecção de alimentos, gases, e na desinfecção de águas para fins de potabilidade (Ribeiro Da Silva *et al.*, 2015; Pandiselvam *et al.*, 2017).

Dentro deste panorama, a utilização do ozônio para a desinfecção de águas pluviais, pode ser uma alternativa promissora para a potabilização de águas de chuva, as quais podem ser utilizadas posteriormente para o abastecimento humano sem riscos de contaminações. Mas para que se possa entender um pouco mais sobre a eficácia da ozonioterapia na desinfecção de águas pluviais, é preciso conhecer as características físico-químicas do ozônio e como este gás pode ser gerado sinteticamente, e as formas de aplicação.

Propriedades físico-químicas	
Massa molar	48 D
Massa específica (0°C e 101,3 KPa)	2,154 Kg/m ³
Ponto de ebulição	(-111,9 ± 0,3°C)
Ponto de fusão	(-192,5 ± 0,3°C)
Solubilidade em água a 0°C	20 g/m ³
Solubilidade em água a 30°C	1,5 g/m ³
Temperatura crítica	(-12,1 °C)
Pressão crítica	5,53 MPa

Tabela 2: Principais propriedades físico-químicas do Ozônio

Fonte: (Vidal, 2003)

Os materiais utilizados na implantação do sistema de produção de ozônio são escolhidos de forma a não haver incompatibilidade de materiais, evitando perdas nem custos adicionais ao processo (Johnson, 1975). A técnica de produção comercial do ozônio é conhecida como “Efeito Corona” (Wei *et al.*, 2014), conforme apresentado na figura 1 abaixo.

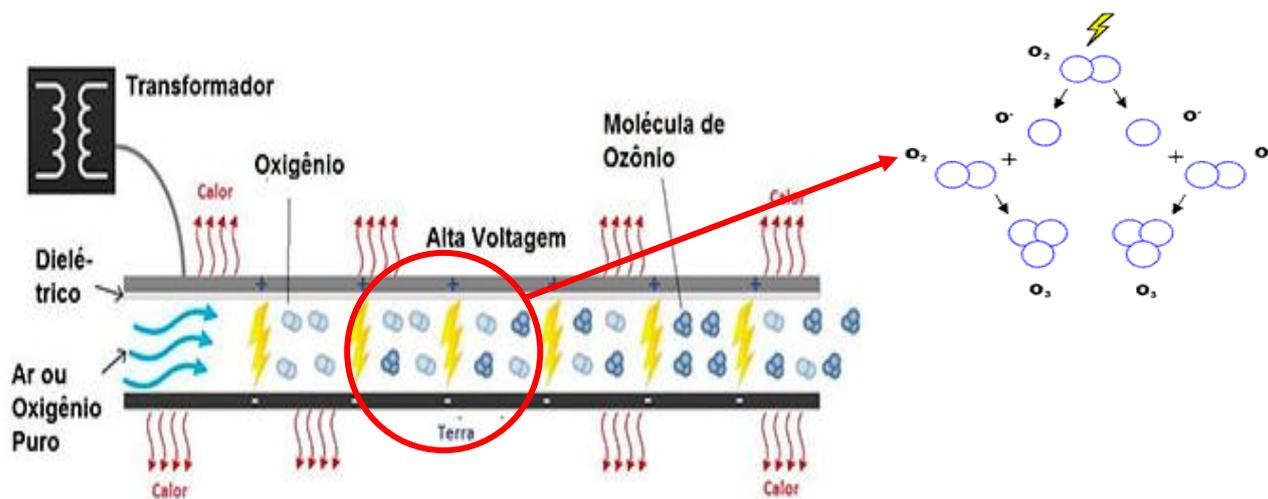
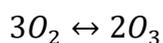


Figura 1: Processo comercial de produção de Ozônio, por efeito corona

Fonte: (Naturaltec, 2017)

Segundo a NBR – 5456/1987, p.68, efeito corona é o “eflúvio que se manifesta em um campo elétrico não uniforme e de intensidade muito elevada, tendo uma parte visível localizada perto de um condutor” (Nbr, 1987). E de acordo com (Van Brunt, 1994) o termo Corona pode designar a descarga parcial entre eletrodos que ocorre nos casos onde dielétricos sólidos estão ausentes ou estão muito afastados da zona de ionização ou de descarga. Neste processo, a produção de ozônio pode variar dependendo da diferença de potencial, da frequência da corrente elétrica, além da constante dielétrica e do espaçamento entre os eletrodos (Wei *et al.*, 2014). De forma simplificada, no processo, moléculas de oxigênio são convertidas em ozônio, por meio da aplicação de descarga elétrica em um fluxo de ar ou oxigênio puro pressurizado entre dois eletrodos nos quais é aplicada uma tensão elétrica. Assim, os elétrons que são gerados neste processo possuem uma grande energia interna capaz de provocar a dissociação da molécula de O_2 em dois átomos de oxigênio; em seguida, um átomo de oxigênio se liga a uma outra molécula de O_2 formando assim o O_3 (Di Bernardo e Dantas, 2005). A reação global que envolve a produção de O_3 a partir do O_2 pode ser descrita como:



$$\Delta H = + 284,5 \text{ KJ/mol}$$

Onde ΔH , ou seja, a variação da Entalpia, é a quantidade de calor/energia necessária para que a reação de produção do O_3 possa ocorrer (Vidal, 2003).

Hoje em dia, encontra-se muitas publicações científicas a respeito do processo para a produção comercial do O_3 , com foco no desenvolvimento e otimização de processos que resultem na obtenção de altas concentrações de O_3 a um baixo custo, e disponibilização no mercado de métodos eficientes para a geração do O_3 (Di Bernardo e

Dantas, 2005). Os geradores de ozônio utilizados atualmente seguem o mesmo princípio do primeiro ozonizador feito por Marius Otto. A figura 2 apresenta um esquema ilustrativo adaptado de uma desinfecção de águas pluviais utilizando um gerador de ozônio, pelo efeito Corona (Wei *et al.*, 2014).

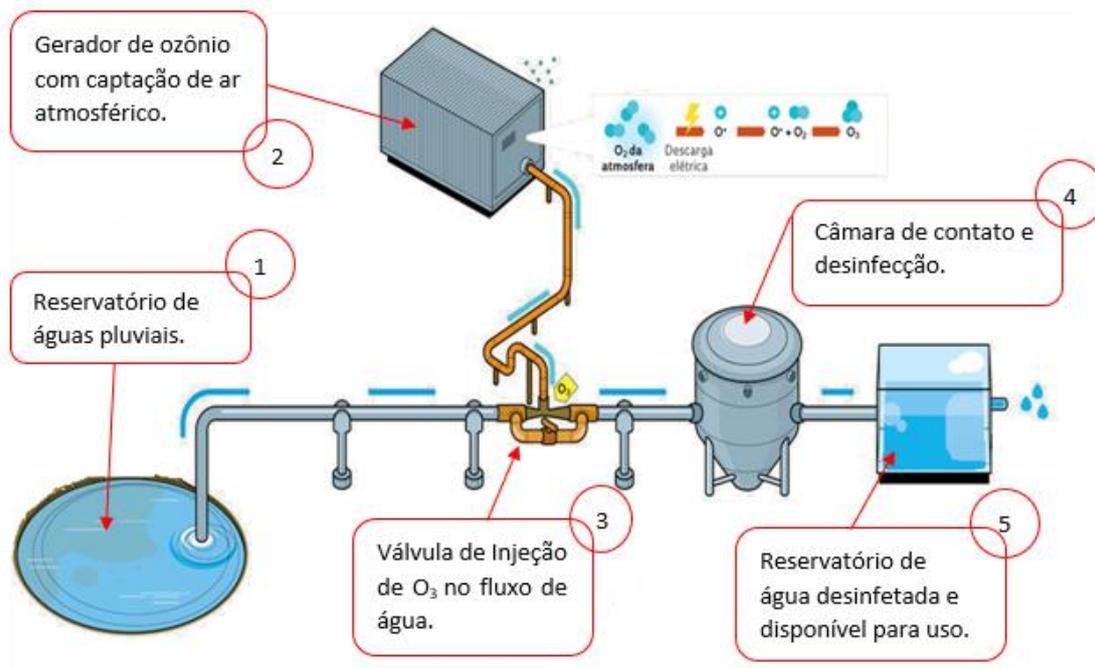


Figura 2: Modelo adaptado para desinfecção de efluente pluvial com gerador de ozônio produzido no local.

Fonte: (Brasil, O., 2017)

O processo de desinfecção de águas pluviais, através da ozonioterapia, passa por vários estágios, incluindo a captação das águas no reservatório até a saída da água desinfetada. Dois destes estágios são de extrema importância para a geração de água desinfetada, disponível para o uso e atendendo a qualidade exigida pela Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde.

São eles: a forma de aplicação do gás O_3 na água e a câmara de contato do O_3 com a água, etapas 3 e 4 respectivamente, conforme a figura 2. A forma como o O_3 é aplicado na água circulante é de extrema importância, pois o desempenho da desinfecção é diretamente proporcional a eficiência da transferência do gás O_3 para o fluxo de água corrente no sistema. Esta é feita através de uma válvula de Venturi, que dispersa o gás na fase líquida em forma de pequenas bolhas, promovendo uma maior interface gás-líquido e conseqüentemente maior incorporação O_3 na água. Pois quanto menor as bolhas, mais lentamente elas vão percorrer e permanecer na água, aumentando o tempo de contato,

umentando a eficiência do processo de transferência do O_3 para o sistema, assim diminui a quantidade de ozônio requerida para a desinfecção e conseqüentemente diminui os custos de produção (Chiang *et al.*, 1999).

A mistura gás-líquido segue então para uma câmara de contato, que permite que o gás ozônio permaneça em contato com a água por tempo suficiente para a completa desinfecção. Um ponto que deve ser considerado nesta etapa é o dimensionamento adequado da câmara de contato em relação ao volume de água a ser desinfetado, o que garante a máxima transferência do gás O_3 , e assim reduzindo os custos com a produção (Hassemer, 2000).

A efetividade da desinfecção por O_3 depende diretamente da concentração, do tempo de contato e das bactérias presentes (Usepa, 1999). O ozônio é mais efetivo contra bactérias gram-negativas quando comparado às gram-positivas, isso é decorrente do fato de as gram-negativas apresentarem menor quantidade de peptidoglicano na composição de sua parede celular (Kim *et al.*, 1999; Khadre *et al.*, 2001). O alto potencial de desinfecção do O_3 (+2,07) permite que o processo ocorra com menor concentração e menor tempo de contato, quando comparado a outros agentes químicos utilizados, como por exemplo o cloro, com potencial de oxidação de +1,36 Volts.

A inativação de bactérias pelo O_3 é o resultado de sua atuação sobre a parede celular, sendo esta o primeiro alvo a ser atingido, este agente atua também nas bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucléicos, além de oxidar aminoácidos, glicoproteínas e também glicolipídios causando uma alteração na permeabilidade na parede celular e conseqüentemente resultando na lise celular (Brink *et al.*, 1991; Lapolli *et al.*, 2003).

A figura 3 ilustra o modo de ação do O_3 sobre a parede celular de uma célula bacteriana que resulta em sua ruptura.

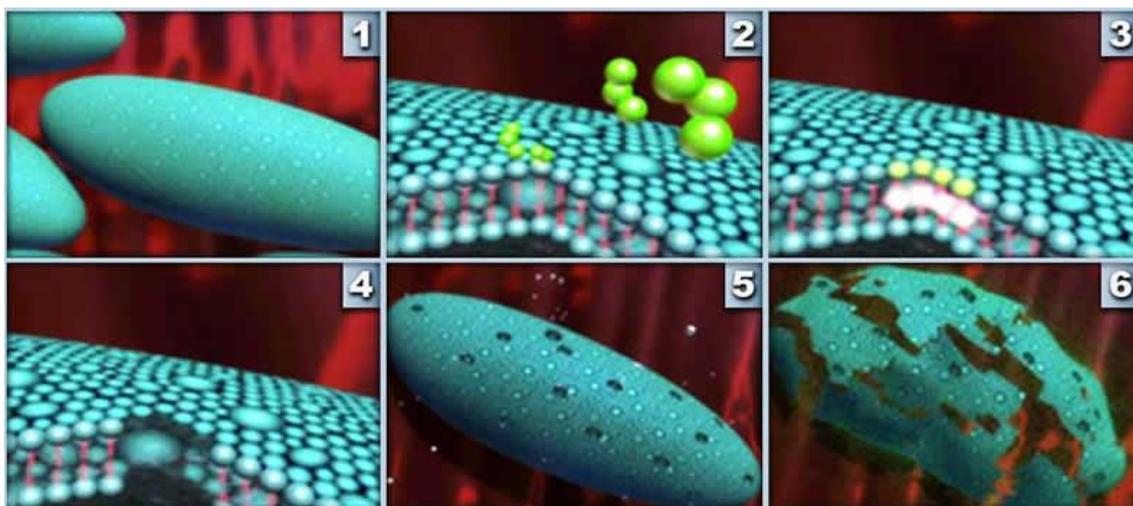


Figura 3: (1) Célula bacteriana intacta, (2) parede bacteriana sendo atacada pelo ozônio, (3) início da oxidação da parede celular, (4, 5 e 6) processo gradativo de ruptura da parede celular, levando a morte em poucos minutos.

Fonte: (Snatural, 2017).

O alto poder de desinfecção do O_3 e a eficácia do processo sob diferentes condições de pH, temperatura e substrato já foi descrito por diversos autores. Os resultados de alguns destes estudos estão apresentados de forma resumida na tabela 3.

BACTÉRIA	CONDIÇÕES DE TRATAMENTO					
	Ozônio (mg/ml)	Tempo (min)	pH	Temperatura (°C)	Origem da água	% Redução
<i>Escherichia coli</i>	0,23-0,26	1,67	7	24	Ozônio na água em demanda livre.	99,99
<i>Salmonella</i>	0,23-0,26	1,67	7	24	Ozônio na água em demanda livre.	99,995
<i>Streptococos de origem fecal</i>	2,2	19	7,5	16	Efluentes (Doméstico, industrial e/ou pluvial).	99,6
<i>Mycobacterium spp.</i>	0,23-0,26	1,67	7	24	Ozônio na água em demanda livre.	90

Tabela 3: Eficácia da aplicação do ozônio na redução da população bacteriana, sob diversas condições.

Fonte: (Botelho Da Silva *et al.*, 2011; Gerrity *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017).

Em ensaios realizados em laboratório (Lazarova *et al.*, 1999) demonstram que dosagem de 7mg/L de O₃, que resulta em uma concentração residual de 0,1mg/L, promoveu uma redução de 3 a 4 log da densidade de coliformes fecais com um tempo de contato de 10 minutos, e densidades menores ou igual 200 UFC/100mL no efluente final. Eles demonstraram também que doses maiores de O₃ em torno de 40 a 50 mg/L, foram necessárias para atingir padrões mais limitantes, igual a 2,2 UFC/100mL. A inativação de *E. coli* por O₃ é na ordem de 3125 vezes mais rápida do que quando se é utilizado o cloro para a desinfecção (Gerrity *et al.*, 2017). Este fato pode estar associado ao mecanismo de ação dos dois agentes, pois o O₃ age diretamente na destruição da parede celular onde sua oxidação ocorre com maior rapidez e intensidade, enquanto o cloro age atacando a membrana citoplasmática da célula o que requer um maior tempo de contato, para que possa ocorrer a inativação celular (Gerrity *et al.*, 2017).

4.4.1 Vantagens e desvantagens do ozônio

Algumas vantagens conferidas ao ozônio o colocam como um método potencial de desinfecção de águas pluviais, que são: o ozônio é o terceiro agente oxidante mais poderoso, perdendo apenas para o flúor +2,87mV e para o radical hidroxila +2,80mV (Lapolli *et al.*, 2003); possui grande eficácia em baixas concentrações e tempos de contato curtos, bem como sua capacidade de degradar os subprodutos tóxicos em produtos não tóxicos (Graham, 1997; Gyawali e Ibrahim, 2012); O₃ é mais eficiente na inativação de microrganismos patogênicos do que os demais agentes desinfetantes mais utilizados; não há formação de subprodutos residuais e ou poluentes (Spellman, 1999); possui capacidade de controlar parâmetros exigidos para a potabilidade da água como cor, sabor e odor (Spellman, 1999); facilidade em se produzir no local de uso, evitando riscos com transporte e manuseio. A tabela 4 apresenta ainda uma comparação complementar ao que foi citado acima.

Mesmo com tantas características a favor da utilização do O₃ como desinfetante de águas pluviais, este pode apresentar algumas desvantagens que podem desencorajar na escolha desta tecnologia para a desinfecção desse tipo de água. São elas: o O₃ não permanece por muito tempo em meio líquido e isso pode influir em uma recontaminação após a desinfecção da água (Zarpellon e Rodrigues, 2002); sua utilização em pequenas dosagens podem não ser eficientes na remoção de microrganismos esporulados; por ser uma tecnologia complexa em comparação com as atuais mais utilizadas e por não ter

muitos estudos utilizando o O₃ para a desinfecção de águas pluviais. O outro ponto a ser considerado é que o O₃ é muito corrosivo e reativo, o que requer materiais em aço inoxidável para os tanques de reação, tubulações e válvulas, o que torna o custo inicial de implantação do sistema alto podendo influenciar na sua escolha.

Característica	Cloro (Cl)	Ozônio
Segurança	(+)	(+ +)
Remoção de bactérias	(+ +)	(+ +)
Remoção de vírus	(+)	(+ +)
Remoção de protozoários	(-)	(+ +)
Residual tóxico	(+ + +)	(+)
Subprodutos	(+ + +)	(+)
Custos operacionais	(+)	(+ +)
Custos de investimento	(+ +)	(+ + +)
Nenhum (-); Baixo (+); Médio (+ +); Alto (+ + +)		

Tabela 4: Comparação das características dos processos de cloração e ozonização.

Fonte: (Lazarova *et al.*, 1999)

4.5 VIABILIDADE ECONÔMICA

Conforme já apresentado, o custo para a implantação de um sistema de desinfecção por ozonização é um entre os vários fatores a serem considerados na escolha desse agente para desinfecção de águas. Mas os custos operacionais e totais também devem ser considerados. Os principais custos operacionais do sistema são relacionados aos insumos oxigênio, seja este puro ou uso do ar atmosférico, a eletricidade e os custos com manutenções. Os custos totais são a soma dos custos operacionais mais os custos de implantação do sistema (Brink *et al.*, 1991) e podem representar de 10 a 20%, somando-se a estes os valores gastos com energia.

Dentre os tipos de geradores de ozônio disponíveis no mercado os que utilizam o efeito corona mostram-se mais eficientes e conseqüentemente mais econômicos, mesmo

tendo um custo mais alto em relação aos demais processos. Nos últimos anos, avanços na tecnologia e otimização dos processos já existentes têm resultado em geradores que operam consumindo menor quantidade de energia elétrica, menores níveis de oxigênio e produzem ozônio em maiores concentrações. A utilização de um sistema de ozonização pode ser caro inicialmente, mas os benefícios técnicos e a garantia de uma água totalmente desinfetada, torna este processo viável em termos de custo benefício. Estudos feitos por Freire *et al.*, (2001) e Allen *et al.*, (2010) mostraram que uma vez implantado, os custos são reduzidos, tornando economicamente viável a aplicação de O₃ na desinfecção de água. Isto por que os custos envolvidos são dissolvidos ao longo do tempo de operação. Mas devido à crescente preocupação com agentes de desinfecção que não formam subprodutos e nem poluentes secundários, o O₃ começa a ganhar mais visibilidade, onde a médio prazo irá se posicionar também como uma alternativa mais barata, limpa e de grande eficiência.

4.6 BENEFÍCIOS DA UTILIZAÇÃO DE ÁGUAS PLUVIAIS

Os benefícios para a utilização de águas pluviais é a de preservar a água potável exclusivamente para abastecimento e consumo humano. O principal benefício do aproveitamento de água de chuva é preservar os recursos hídricos, ainda existentes, permitindo que água potável tratada seja exclusivamente para abastecimento e finalidades mais nobres. Assim as práticas de conservação e aproveitamento de água pluviais podem trazer diversos benefícios em termos ambientais, econômicos e sociais.

4.6.1 Benefícios ambientais

A utilização de águas pluviais tem como intuito reduzir a demanda por água tratada proveniente das concessionárias de abastecimento público, para atividades menos nobres; diminuir a captação de água doce de fontes primárias como represas e rios aumentando a disponibilidade de água nos mananciais para abastecimento e melhorar a qualidade das águas dos recursos naturais.

4.6.2 Benefícios econômicos

Os benefícios econômicos relacionados a utilização e aproveitamento de águas pluviais são diversos, como a conformidade junto as legislações ambientais vigentes, facilitando as relações internacionais e tornando os países que os usam, referência em tecnologias sustentáveis; mudanças nos padrões de produção e consumo da água tratada proveniente das concessionárias de abastecimento público; torna o país pioneiro em implantação de técnicas de aproveitamento e desinfecção de águas pluviais; reduz os custos de produção de água, energia, nos sistemas de tratamento; promove incentivo à utilização de novas tecnologia para a práticas de aproveitamento de fontes alternativas de água e principalmente a redução no valor da tarifa cobrada pelo abastecimento de água.

4.6.3 Benefícios sociais

A utilização de águas pluviais traz muitos benefícios à sociedade tais como diminuição da demanda nos mananciais, permitindo o direcionamento e atendimento a consumos mais nobres, para uma maior parcela da população; conscientização e uso racional dos recursos hídricos naturais existentes; ampliação das oportunidades de negócios para as empresas fornecedoras de serviços e equipamentos de novas tecnologias, fomentando a economia na sociedade; isso implica na ampliação e geração de novos empregos diretos e indiretos, e melhora a imagem da sociedade, com o reconhecimento de empresas socialmente responsáveis.

No tanto, para atingir os benefícios esperados com a utilização de águas pluviais, são necessários estudos prévios criteriosos, abrangendo as questões ambientais, econômicas, sociais e tecnológicas, tendo como objetivo minimizar o uso irracional de água potável e incentivar práticas de reaproveitamento de águas de forma inteligente e sustentável.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo procurou mostrar o uso das águas de chuva como forma de minimizar a escassez de água potável que o país vem enfrentando nos últimos anos, com o intuito de propor uma alternativa eficiente a desinfecção de águas pluviais. Esta fonte renovável de água doce tem grande potencial de aproveitamento, que se for manejada de forma

inteligente e sustentável, pode proporcionar uma redução do uso das fontes naturais de água doce e uma economia nas tarifas cobradas pelo uso de água potável tratada pelas concessionárias.

Dentro deste cenário, o processo de ozonioterapia aplicado ao tratamento de águas pluviais é uma tecnologia promissora que vem ganhando espaço, por ser uma alternativa limpa, eficiente e não poluente. As pesquisas realizadas sobre este tema mostraram que o ozônio é um poderoso biocida quando comparado ao cloro. Este se decompõe rapidamente não formando nenhum tipo de subproduto indesejável, ao contrário do cloro, cujo o uso pode levar a formação de subprodutos como os trihalometanos nocivos à saúde.

O método apresentado possibilita a adequação aos parâmetros e diretrizes estabelecidas pela portaria do Ministério da Saúde 2914/2011, bem como outros métodos de desinfecção já existentes. Além de se enquadrar nos limites microbiológicos máximos definidos pela Organização Mundial da Saúde para o consumo humano.

Apesar de ser uma tecnologia relativamente mais cara em relação as demais utilizadas no mercado, a ozonioterapia é a mais indicada quando se deseja ter uma eficácia na desinfecção e garantia na qualidade final da água tratada. Dentro desta proposta em usar a ozonioterapia em águas pluviais, devemos considerar novos estudos e análises complementares com o intuito de otimizar o sistema proposto, com o desenvolvimento de mecanismos alternativos para que se possa alcançar um melhor desempenho e com isso reduzir os custos operacionais e de aquisição do sistema. Assim, a engenharia química juntamente com a microbiologia tem ocupado um lugar de destaque na busca de novas tecnologias alternativas para a desinfecção de águas e efluentes, focando seus esforços no desenvolvimento de materiais e processos menos impactantes e ecologicamente compatíveis sem degradar os recursos naturais. Neste sentido, a junção dessas duas áreas do conhecimento permite desenvolver e alinhar suas tecnologias em prol de um bem comum.

Após analisar os resultados de alguns estudos citados neste trabalho podemos propor algumas recomendações para novos trabalhos relacionados ao tratamento e desinfecção de águas pluviais, com a implementação tecnologias complementares a ozonioterapia. Como exemplo, citamos a engenharia de nanomaterias, que nos últimos anos tem ganhado destaque na resolução de problemas ambientais. Um exemplo importante é o desenvolvimento de membranas de ultrafiltração com capacidade de filtrar

e desinfetar a água, além de promover uma reação de oxidação química gerando o gás O_3 na própria membrana, deixando a água apta para o consumo humano.

Enfim as possibilidades de estudo são infinitas, assim destacamos que o mecanismo discutido neste trabalho ainda não é consolidado e estudos mais aprofundados devem ser realizados, com intuito de elucidar melhor os processos envolvidos neste tipo de desinfecção para águas pluviais em específico. Este trabalho está inserido dentro de um amplo campo de pesquisa, que permite aliar conhecimentos fundamentais de microbiologia e engenharia química, na resolução de problemas de extrema pertinência em nosso país.

REFERÊNCIAS

AHMED, W.; GOONETILLEKE, A.; GARDNER, T. Implications of faecal indicator bacteria for the microbiological assessment of roof-harvested rainwater quality in Southeast Queensland, Australia. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 471-479, 2010. ISSN 0008-4166. Disponível em: < http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/W10-037#.WZM_uVGGPIU >.

AHMED, W. et al. Escherichia coli and Enterococcus spp. in rainwater tank samples: comparison of culture-based methods and 23S rRNA gene quantitative PCR assays. **Environ Sci Technol**, v. 46, n. 20, p. 11370-6, Oct 16 2012. ISSN 0013-936x. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22963205> <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es302222b> >.

ALBRECHTSEN, H. J. Microbiological investigations of rainwater and graywater collected for toilet flushing. **Water Sci Technol**, v. 46, n. 6-7, p. 311-6, 2002. ISSN 0273-1223 (Print) 0273-1223. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12381006> >.

ARCHELA, E. et al. Considerações sobre a geração de efluentes líquidos em centros urbanos. **GEOGRAFIA (Londrina)**, v. 12, n. 1, p. 517-526, 2010. ISSN 2447-1747. Disponível em: < <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/geografia/article/view/6711> >.

ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 266-278, 2012. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://www.nature.com/nrmicro/journal/v10/n4/full/nrmicro2761.html?foxtrotcallback=true> >.

BALDASSARRI, L. et al. Pathogenesis of implant infections by enterococci. **The International journal of artificial organs**, v. 28, n. 11, p. 1101-1109, 2005. ISSN 0391-3988. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/med/16353116> >.

BATRA, P.; MATHUR, P.; MISRA, M. C. Aeromonas spp.: An Emerging Nosocomial Pathogen. **J Lab Physicians**, v. 8, n. 1, p. 1-4, Jan-Jun 2016. ISSN 0974-2727 (Print) 0974-2727. Disponível em: < <http://www.jlponline.org/article.asp?issn=0974-2727;year=2016;volume=8;issue=1;spage=1;epage=4;aulast=Batra> >.

BESSA, L. J. et al. High prevalence of multidrug-resistant Escherichia coli and Enterococcus spp. in river water, upstream and downstream of a wastewater treatment plant. **Journal of water and health**, v. 12, n. 3, p. 426-435, 2014. ISSN 1477-8920. Disponível em: < <http://jwh.iwaponline.com/content/12/3/426> >.

BIESEK, L. et al. Desinfecção da água por meio da radiação ultravioleta c. **Mostra IFTec em Resumos**, n. 3, 2015.

BLASER, M. J.; PARSONS, R. B.; WANG, W.-L. L. Acute colitis caused by *Campylobacter fetus* ss. jejuni. **Gastroenterology**, v. 78, n. 3, p. 448-453, 1980. ISSN 0016-5085.

BLASER, M. J.; TAYLOR, D. N.; FELDMAN, R. A. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections. **Epidemiologic reviews**, v. 5, n. 1, p. 157-176, 1983. ISSN 1478-6729.

BOTELHO DA SILVA, S. et al. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, 2011. ISSN 1676-546X.

BRAGA, B.; TUNDISI, J. G.; REBOUÇAS, A. **Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação**. 3º Ed. Câmara Brasileira de Livros: 2006. 748p.

BRASIL. Ministério da Saúde-PORTARIA Nº 2.914, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2011. 2011. Disponível em: < http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html >. Acesso em: 01/11/2017.

_____. Equipamentos do Água Para Todos encurtam caminhos da seca. 2016. Disponível em: < <http://www.brasil.gov.br/infraestrutura/2016/10/equipamento-do-agua-para-todos-encurtam-caminhos-da-seca> >. Acesso em: 13/02/2018.

_____. Ciclo Hidrológico-Ministério do Meio Ambiente. 2017. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/agua/recursos-hidricos/aguas-subterraneas/ciclo-hidrologico> >. Acesso em: 01/11/2017.

BRASIL, O. Sistema de desinfecção de águas. 2017. Disponível em: < <http://www.brasilozonio.com.br/> >. Acesso em: 01/11/2017.

BRINK, D. R.; LANGLAIS, B.; RECKHOW, D. A. **Ozone in Water Treatment: Application and Engineering: Cooperative Research Report**. Lewis Publishers, 1991.

BRISSE, S.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D. The Genus *Klebsiella*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S., et al (Ed.). **The Prokaryotes: Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass**. New York, NY: Springer New York, 2006. p.159-196. ISBN 978-0-387-30746-6.

BUTZ, P.; TAUSCHER, B. Emerging technologies: chemical aspects. **Food research international**, v. 35, n. 2, p. 279-284, 2002. ISSN 0963-9969.

CARNAHAN, A. et al. Characterization of *Aeromonas schubertii* strains recently isolated from traumatic wound infections. **Journal of clinical microbiology**, v. 27, n. 8, p. 1826-1830, 1989. ISSN 0095-1137.

CARRARO, E. et al. Hospital effluents management: Chemical, physical, microbiological risks and legislation in different countries. **J Environ Manage**, v. 168, p. 185-99, Mar 01 2016. ISSN 1095-8630 (Electronic) 0301-4797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26708649> >.

CHIANG, P.-C. et al. Modeling an ozone bubble column for predicting its disinfection efficiency and control of DBP formation. **Chemosphere**, v. 39, n. 1, p. 55-70, 1999. ISSN 0045-6535.

COLWELL, R.; MACDONELL, M.; DE LEY, J. Proposal to Recognize the Family Aeromonadaceae fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 473-477, 1986. ISSN 1466-5034.

COVER, T. L.; BLASER, M. J. The pathobiology of Campylobacter infections in humans. **Annual review of medicine**, v. 40, n. 1, p. 269-285, 1989. ISSN 0066-4219.

DANIEL, L. Processos de desinfecção e desinfetantes alternativos na produção de água potável. cap. 2. **ABES-PROSAB. Rio de Janeiro, RJ**, 2001.

DEGHANI, M. H. Effectiveness of ultrasound on the destruction of E. coli. **American Journal of Environmental Sciences**, v. 1, n. 3, p. 187-189, 2005. ISSN 1553-345X.

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A. Di Bernardo. **Métodos e Técnicas de Tratamento de Água. 2ª ed. 2v. Rima, São Carlos, SP**, 2005.

DIAPER, E. Desinfection of water and wastewater using ozone. In: (Ed.). **Desinfection; water and wastewater**: Ann Arbor Science, 1975. p.211-31. ISBN 0250400421.

EDBERG, S. C. et al. Enumeration of total coliforms and Escherichia coli from source water by the defined substrate technology. **Appl Environ Microbiol**, v. 56, n. 2, p. 366-9, Feb 1990. ISSN 0099-2240 (Print) 0099-2240. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2407184> >.

EDNA, A. et al. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. 2004.

ENGVALL, A. May organically farmed animals pose a risk for Campylobacter infections in humans? **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 43, n. 1, p. S85, 2002. ISSN 1751-0147.

EUZEBY, J. List of prokaryotic names with standing in nomenclature-Genus. **Proteus**, 2013.

FARNLEITNER, A. H. et al. Escherichia coli and enterococci are sensitive and reliable indicators for human, livestock and wildlife faecal pollution in alpine mountainous water resources. **Journal of applied microbiology**, v. 109, n. 5, p. 1599-1608, 2010. ISSN 1365-2672.

FEWTRELL, L.; KAY, D. Microbial quality of rainwater supplies in developed countries: a review. **Urban water journal**, v. 4, n. 4, p. 253-260, 2007. ISSN 1573-062X.

FONTANA, R. T. As Micobactérias de Crescimento Rápido e a infecção hospitalar: um problema de saúde pública. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, p. 371-376, 2008. ISSN 0034-7167. Disponível em: <

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-71672008000300016&nrm=iso >.

FRANZETTI, L. et al. Phenotypic and genotypic characterization of Enterococcus spp. of different origins. **Curr Microbiol**, v. 49, n. 4, p. 255-60, Oct 2004. ISSN 0343-8651 (Print)

0343-8651. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00284-004-4242-6> >.

FUNASA, F. N. D. S.; BRASIL, M. D. S.; . Manual Prático de Análise de Água. v. 4, p. 153, 2013. Disponível em: < http://www.funasa.gov.br/site/wp-content/files/mf/manual_pratico_de_analise_de_agua_2.pdf >. Acesso em: 17/08/2017.

GERBA, C. P. Disinfection. In: (Ed.). **Environmental Microbiology: Third Edition**: Elsevier Inc., 2014.

GERRITY, D.; ROSARIO-ORTIZ, F. L.; WERT, E. C. Application of ozone in water and wastewater treatment. **Advanced Oxidation Processes for Water Treatment: Fundamentals and Applications**, p. 123, 2017. ISSN 1780407181.

GOGATE, P. R.; KABADI, A. M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 60-72, 2009. ISSN 1369-703X.

GÓMEZ-LÓPEZ, V. M. et al. Disinfection capacity of high-power ultrasound against E. coli O157: H7 in process water of the fresh-cut industry. **Food and bioprocess technology**, v. 7, n. 12, p. 3390-3397, 2014. ISSN 1935-5130.

GONÇALVES, R. **Potabilização de água de chuva através de filtração lenta e desinfecção ultravioleta para abastecimento descentralizado de comunidades**. 2012. Disponível em: < <https://www.researchgate.net/publication/303984819> >.

GRAHAM, D. M. Use of ozone for food processing. **Food Technology**, v. 51, n. 6, p. 72-75, 1997. ISSN 0015-6639.

GRAVES, A. K.; WEAVER, R. W. Characterization of enterococci populations collected from a subsurface flow constructed wetland. **J Appl Microbiol**, v. 108, n. 4, p. 1226-34, Apr 2010. ISSN 1364-5072. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1365-2672.2009.04516.x/asset/j.1365-2672.2009.04516.x.pdf?v=1&t=j73kt7pv&s=1c9802e46fcb93aa972a0c59ea3ff7e338f6151a> >.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Synergistic effect of copper and lactic acid against Salmonella and Escherichia coli O157: H7: A review. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 24, n. 1, p. 1, 2012. ISSN 2079-052X.

HASSEMER, M. E. N. Tratamento de efluente têxtil: processo físico-químico com ozônio e floculação em meio granular. 2000.

HELMREICH, B.; HORN, H. Opportunities in rainwater harvesting. **Desalination**, v. 248, n. 1, p. 118-124, 2009/11/15/ 2009. ISSN 0011-9164. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001191640900575X> >.

HORMAECHE, E.; EDWARDS, P. A proposed genus Enterobacter. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 71-74, 1960. ISSN 1466-5034. Disponível em: < <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/10/2/ijsem-10-2-71.pdf?expires=1504302294&id=id&acname=guest&checksum=C9BF8A7D0EDD38D907326E963C9488C7> >.

HUA, G.; RECKHOW, D. A. DBP formation during chlorination and chloramination: effect of reaction time, pH, dosage, and temperature. **Journal (American Water Works Association)**, v. 100, n. 8, p. 82-95, 2008. ISSN 0003-150X.

JANDA, J. M. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. **Clinical microbiology reviews**, v. 4, n. 4, p. 397-410, 1991. ISSN 0893-8512.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 23, n. 1, p. 35-73, Jan 2010. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://cmr.asm.org/content/23/1/35.full.pdf> >.

JANDA, J. M. et al. Biochemical identification of citrobacteria in the clinical laboratory. **J Clin Microbiol**, v. 32, n. 8, p. 1850-4, Aug 1994. ISSN 0095-1137 (Print) 0095-1137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7989531?dopt=Abstract> >.

JANG, J. et al. Environmental *Escherichia coli*: Ecology and Public Health Implications--A Review. **Journal of Applied Microbiology**, 2017. ISSN 1365-2672.

JOHNSON, J. D. **Disinfection--water and Wastewater**. Ann Arbor Science Publishers, 1975. ISBN 0250400421.

JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 4, p. 750-774, 2009. ISSN 1092-2172.

JUNIOR, A. B.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Facta, 2000.

KHADRE, M.; YOUSEF, A.; KIM, J. G. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. **Journal of food science**, v. 66, n. 9, p. 1242-1252, 2001. ISSN 1750-3841.

KIM, J.-G.; YOUSEF, A. E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. **Journal of food protection**, v. 62, n. 9, p. 1071-1087, 1999. ISSN 0362-028X.

LAPOLLI, F. et al. Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização. **Desinfecção de efluentes sanitários, remoção de organismos patogênicos e substâncias**

nocivas: aplicação para fins produtivos como agricultura, aquicultura e hidropônica. Vitória, PROSAB, p. 169-208, 2003.

LAYTON, B. et al. Enterococcus species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. **Journal of applied microbiology**, v. 109, n. 2, p. 539-547, 2010. ISSN 1365-2672.

LAZAROVA, V. et al. Advanced wastewater disinfection technologies: state of the art and perspectives. **Water Science and Technology**, v. 40, n. 4-5, p. 203-213, 1999. ISSN 0273-1223.

LEAO, S. C. et al. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. **Vanden Broele, Brugge, Belgium**, p. 113-25, 2004. Disponível em: < https://www.researchgate.net/profile/Sylvia_Leao/publication/27598068_Practical_handbook_for_the_phenotypic_and_genotypic_identification_of_mycobacteria/links/0fcfd50ddbd09ecf3b000000.pdf >.

LI, C. et al. Bacterial community structure and microorganism inactivation following water treatment with ferrate (VI) or chlorine. **Environmental Chemistry Letters**, p. 1-6, 2017. ISSN 1610-3653. Disponível em: < <https://goo.gl/FNUZfk> >.

LIGON, G.; BARTRAM, J. Literature review of associations among attributes of reported drinking water disease outbreaks. **International journal of environmental research and public health**, v. 13, n. 6, p. 527, 2016.

LIN, J.-C. et al. Efficacy of cefepime versus ceftazidime in the treatment of adult pneumonia. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 34, n. 2, p. 131-137, 2001. ISSN 1684-1182. Disponível em: < http://www.rotapharm.md/data/scientific_publications/ROXIPIME/roxipime%20lit%201.pdf >.

MADISON, B. et al. Type 1 fimbrial shafts of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae influence sugar-binding specificities of their FimH adhesins. **Infection and immunity**, v. 62, n. 3, p. 843-848, 1994. ISSN 0019-9567.

MALANI, P. N.; KAUFFMAN, C. A.; ZERVOS, M. J. Enterococcal disease, epidemiology, and treatment. In: (Ed.). **The Enterococci**: American Society of Microbiology, 2002. p.385-408.

MARTÍNEZ, J. et al. How are gene sequences analyses modifying bacterial taxonomy? The case of Klebsiella. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 261-268, 2004. ISSN 1618-1905.

MASSARA, T. M. et al. A Mini Review of the Techno-environmental Sustainability of Biological Processes for the Treatment of High Organic Content Industrial Wastewater Streams. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-14, 2017. ISSN 1877-2641. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s12649-017-0022-y> >.

MATOS NETO, A. et al. Considerações acerca da ozonioterapia na reparação cutânea. **Nosso clín**, p. 26-32, 2016.

MEIER-KOLTHOFF, J. P. et al. Complete genome sequence of DSM 30083 T, the type strain (U5/41 T) of *Escherichia coli*, and a proposal for delineating subspecies in microbial taxonomy. **Standards in genomic sciences**, v. 9, n. 1, p. 2, 2014. ISSN 1944-3277. Disponível em: < <https://standardsingenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1944-3277-9-2> >.

MENDEZ, C. B. et al. The effect of roofing material on the quality of harvested rainwater. **Water Research**, v. 45, n. 5, p. 2049-2059, 2011/02/01/ 2011. ISSN 0043-1354. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135410008535> >.

MEZZATESTA, M. L.; GONA, F.; STEFANI, S. Enterobacter cloacae complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. **Future Microbiol**, v. 7, n. 7, p. 887-902, Jul 2012. ISSN 1746-0913. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22827309> >.

MURRAY, P. et al. Manual of clinical microbiology: manual of clinical microbiology. **Clin Infect Dis**, v. 46, p. 153-154, 2008.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998. ISSN 0893-8512.

NATURALTEC. Ozônio na Desinfecção de Água – Gás Ozônio. 2017. Disponível em: < <http://www.naturaltec.com.br/ozonio-desinfeccao-de-agua/> >. Acesso em: 01/11/2017.

NATURDATA. Biodiversidade - *Escherichia coli* 2017. Disponível em: < <http://naturdata.com/Escherichia-coli-39451.htm> >. Acesso em: 01/11/2017.

NBR, A. 5456. **Eletricidade Geral–Terminologia**, 1987. Disponível em: < <https://documents.tips/documents/abnt-nbr-5456-eletricidade-geral-terminologia.html> >.

NIKOLAOU, A.; LEKKAS, T.; GOLFINOPOULOS, S. Kinetics of the formation and decomposition of chlorination by-products in surface waters. **Chemical Engineering Journal**, v. 100, n. 1, p. 139-148, 2004. ISSN 1385-8947.

NISHIYAMA, M.; IGUCHI, A.; SUZUKI, Y. Identification of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* as vanC-type vancomycin-resistant enterococci (VRE) from sewage and river water in the provincial city of Miyazaki, Japan. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 50, n. 1, p. 16-25, 2015. ISSN 1093-4529.

OLSON, C. K. et al. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in industrialized nations. In: (Ed.). **Campylobacter, Third Edition**: American Society of Microbiology, 2008. p.163-189.

PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. Tuberculosis 2007; from basic science to patient care. 2007.

PANDISELVAM, R. et al. Application and Kinetics of Ozone in Food Preservation. **Ozone: Science & Engineering**, v. 39, n. 2, p. 115-126, 2017/03/04 2017. ISSN 0191-9512. Disponível em: < <https://doi.org/10.1080/01919512.2016.1268947> >.

PARK, S. F. The physiology of Campylobacter species and its relevance to their role as foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 177-188, 2002/04/05/ 2002. ISSN 0168-1605. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816050100678X> >.

PARKER, J. L.; SHAW, J. G. Aeromonas spp. clinical microbiology and disease. **Journal of Infection**, v. 62, n. 2, p. 109-118, 2011. ISSN 0163-4453.

PEREIRA, C. S. et al. Caracterização de Aeromonas spp isoladas de neonatos hospitalizados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 179-182, 2008. ISSN 0037-8682. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822008000200009&nrm=iso >.

PFALLER, M. A.; JORGENSEN, J. H. **Manual of clinical microbiology**: ASM press 2015.

PISCIOTTA, J. M. et al. Marine bacteria cause false-positive results in the Colilert-18 rapid identification test for Escherichia coli in Florida waters. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 2, p. 539-44, Feb 2002. ISSN 0099-2240 (Print) 0099-2240. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11823188> >.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. n. 0893-8512 (Print), 19981105 DCOM- 19981105 1998. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9767057> >.

PROBERT, W. S.; MILLER, G. M.; LEDIN, K. E. Contaminated Stream Water as Source for Escherichia coli O157 Illness in Children. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 7, p. 1216, 2017.

RANGEL, A. L. C. A. Micobacteriose parotídea na AIDS em fase avançada: análise histológica, imunohistoquímica e caracterização por LCR e PCR de espécies de Mycobacterium. 2004.

REIFF, F. M.; WITT, V. M. Guías para la selección y aplicación de tecnologías de desinfección del agua para consumo humano en pueblos pequeños y comunidades rurales en América Latina y el Caribe. In: (Ed.). **OPS serie técnica**: OPS, v.30, 1995.

RIBEIRO DA SILVA, G. H. et al. UASB reactor effluent disinfection by ozone and chlorine. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 50, n. 12, p. 1215-1222, 2015/10/15 2015. ISSN 1093-4529. Disponível em: < <https://doi.org/10.1080/10934529.2015.1055132> >.

RIZZO, L. et al. Disinfection of urban wastewater by solar driven and UV lamp – TiO₂ photocatalysis: Effect on a multi drug resistant Escherichia coli strain. **Water Research**,

v. 53, n. Supplement C, p. 145-152, 2014/04/15/ 2014. ISSN 0043-1354. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135414000529> >.

SANDERS, W.; SANDERS, C. C. Enterobacter spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 2, p. 220-241, 1997. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://cmr.asm.org/content/10/2/220.short> >.

SAVICHTCHEVA, O.; OKABE, S. Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. **Water Res**, v. 40, n. 13, p. 2463-76, Jul 2006. ISSN 0043-1354 (Print) 0043-1354. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16808958> >.

SEDLÁK, J. Present knowledge and aspects of Citrobacter. **Curr Top Microbiol Immunol**1973, v. 62, p. 41-59, 1973. Disponível em: < <https://goo.gl/EobnWx> >.

SHIBATA, T. et al. Monitoring marine recreational water quality using multiple microbial indicators in an urban tropical environment. **Water research**, v. 38, n. 13, p. 3119-3131, 2004. ISSN 0043-1354.

SHINNICK, T.; GOOD, R. Mycobacterial taxonomy. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 13, n. 11, p. 884-901, 1994. ISSN 0934-9723.

SHULMAN, S. T.; FRIEDMANN, H. C.; SIMS, R. H. Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? **Clinical infectious diseases**, v. 45, n. 8, p. 1025-1029, 2007. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://academic.oup.com/cid/article/45/8/1025/344528/Theodor-Escherich-The-First-Pediatric-Infectious> >.

SINGER, P. Humic substances as precursors for potentially harmful disinfection by-products. **Water Science and Technology**, v. 40, n. 9, p. 25-30, 1999. ISSN 0273-1223.

SMITH, A. et al. Concordance of gastrointestinal tract colonization and subsequent bloodstream infections with gram-negative bacilli in very low birthweight infants in the neonatal intensive care unit. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 29, n. 9, p. 831, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2949271/> >.

SNATURAL, M. A. Ozônio – Tratamento e Desinfecção da Água com Ozônio. 2017. Disponível em: < <http://www.snatural.com.br/ozonio-tratamento-agua-desinfeccao/> >. Acesso em: 01/11/2017.

SONG, K.; MOHSENI, M.; TAGHIPOUR, F. Application of ultraviolet light-emitting diodes (UV-LEDs) for water disinfection: A review. **Water Research**, v. 94, n. Supplement C, p. 341-349, 2016/05/01/ 2016. ISSN 0043-1354. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135416301300> >.

SPELLMAN, F. R. **Choosing disinfection alternatives for water/wastewater treatment plants**. CRC Press, 1999. ISBN 1566767571.

TELLEZ, I. et al. *Citrobacter diversus* endocarditis. **The American journal of the medical sciences**, v. 320, n. 6, p. 408-410, 2000. ISSN 0002-9629. Disponível em: < [http://amjmedsci.org/article/S0002-9629\(15\)34914-4/abstract](http://amjmedsci.org/article/S0002-9629(15)34914-4/abstract) >.

TOP, J. et al. Ecological replacement of *Enterococcus faecalis* by multiresistant clonal complex 17 *Enterococcus faecium*. **Clinical microbiology and infection**, v. 13, n. 3, p. 316-319, 2007. ISSN 1469-0691.

TUNDISI, J. G. Água no século XXI: enfrentando a escassez. In: (Ed.). **Água no século XXI: enfrentando a escassez**, 2003.

USEPA, E. P. A. O. O. W. R. S. **Ambient Water Quality Criteria for Bacteria-1986**. 1986.

USEPA, U. S. E. P. A. Alternative disinfectants and oxidants. **Disinfectant use in water treatment, Washington DC**, 1999.

VAN BRUNT, R. J. Physics and chemistry of partial discharge and corona. Recent advances and future challenges. **IEEE transactions on Dielectrics and Electrical insulation**, v. 1, n. 5, p. 761-784, 1994. ISSN 1070-9878.

VAZ-MOREIRA, I.; NUNES, O. C.; MANAIA, C. M. Ubiquitous and persistent Proteobacteria and other Gram-negative bacteria in drinking water. **Science of The Total Environment**, v. 586, p. 1141-1149, 2017/05/15/ 2017. ISSN 0048-9697. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969717303522> >.

VENKOBACHAR, C.; IYENGAR, L.; RAO, A. P. Mechanism of disinfection: effect of chlorine on cell membrane functions. **Water Research**, v. 11, n. 8, p. 727-729, 1977. ISSN 0043-1354.

VIDAL, F. J. R. **Procesos de potabilización del agua e influencia del tratamiento de ozonización**. Ediciones Díaz de Santos, 2003. ISBN 847978587X.

VILLANUEVA, M. V. et al. Ultrasound treatments improve the microbiological quality of water reservoirs used for the irrigation of fresh produce. **Food Research International**, v. 75, n. Supplement C, p. 140-147, 2015/09/01/ 2015. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996915300260> >.

WEI, L. S. et al. Experimental and theoretical study of ozone generation in pulsed positive dielectric barrier discharge. **Vacuum**, v. 104, n. Supplement C, p. 61-64, 2014/06/01/ 2014. ISSN 0042-207X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042207X14000189> >.

WELCH, R. The Genus *Escherichia*. **The Prokaryotes**, v. 6, p. 62-71, 2005.

WERF, W. E. R. F. **Comparison of UV irradiation to chlorination: guidance for achieving optimal UV performance**. Water Environment Research Foundation, 1995.

WILDNER, L. M. et al. Micobactérias: epidemiologia e diagnóstico. **Revista de Patologia Tropical**, v. 40, n. 3, p. 207-230, 2011. ISSN 1980-8178.

WILLEMS, R. J.; BONTEN, M. J. Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. **Current opinion in infectious diseases**, v. 20, n. 4, p. 384-390, 2007. ISSN 0951-7375.

WISBECK, E. et al. Desinfecção de água de chuva por radiação ultravioleta. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 16, p. 337-342, 2011. ISSN 1413-4152. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-41522011000400004&nrm=iso>.

ZARPELLON, A.; RODRIGUES, E. M. Trihalometanos na água de consumo humano. **Revista Técnica da Sanepar**, v. 17, n. 17, p. 21-30, 2002.