M 2020

U.PORTO
FEUP FACULDADE DE ENGENHARIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

ANÁLISE DA MICROBIOTA DA ÁGUA DA REDE DE ABASTECIMENTO DE UMA UNIDADE DE PRODUÇÃO DE TINTAS

ANA MARISA MAGALHÃES GREGÓRIO
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA
À FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM
ÁREA CIENTÍFICA

Agradecimentos

A poucos dias de terminar o Mestrado Integrado em Engenharia Química não posso deixar de agradecer a todos aqueles que direta ou indiretamente influenciaram todo o meu percurso académico.

Em primeiro lugar quero agradecer à Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, ao DEQ e a todos os docentes do MIEQ que passaram por mim e me influenciaram nestes anos de estudo. Quero agradecer em especial à Professora Doutora Olga Nunes, que em contexto de aula sempre valorizou o ensino e a premissa de "saber fazer". Como orientadora não posso deixar de agradecer todo o auxílio, disponibilidade, conhecimento e sugestões ao longo da realização desta Dissertação.

Um grande agradecimento à empresa Barbot – Indústria de Tintas S.A., em especial ao Engenheiro Nuno Barbosa, por me ter concebido a oportunidade e o apoio para realizar a Dissertação em ambiente empresarial. Um especial obrigado ao Engenheiro Daniel Rocha, por toda a ajuda e disponibilidade. Mesmo em contexto de pandemia nunca deixou de me prestar auxílio em tudo o que precisei. Também quero agradecer a todos os restantes membros da empresa pelos dias que lá passei. Apesar de ter sido uma experiência curta, ficará para sempre na memória.

Deixo aqui um obrigada muito grande à Sara Ribeirinho Soares por toda a paciência e ajuda durante o meu período de estágio no LEPABE, na FEUP. Sem a ajuda dela nada disto teria sido possível.

Quero dedicar todo o meu percurso académico à minha família, em especial à minha mãe, ao meu pai e à minha irmã, uma vez que, sem eles nada disto teria sido o que foi. A eles devo-lhes também a pessoa que sou hoje. Foi com eles que festejei nos bons momentos e foi neles que vi o empurrão para continuar quando tudo parecia menos fácil. São, acima de tudo, o meu maior exemplo e prova que nada é assim tão impossível quando realmente queremos.

Por fim, não posso deixar de agradecer aos meus amigos mais chegados, que estiveram comigo ao longo dos últimos anos, nos momentos bons e menos bons. Foi ao lado de todos eles que conclui este percurso académico, do qual me orgulho bastante. O que vem depois? Não sei, mas estou certa de que tudo isto valeu muito a pena!

Resumo

Este projeto, que surgiu no âmbito da unidade curricular Dissertação do Mestrado Integrado em Engenharia Química, ao abrigo da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, pretendeu analisar a microbiota da água da rede de abastecimento da unidade de produção de tintas na empresa Barbot – Indústria de Tintas S.A..

As tintas são uma formulação complexa de diferentes componentes, que incluem substâncias orgânicas e inorgânicas: cargas, veículos fixos/ligantes, pigmentos, diluentes, solventes e outros aditivos. Alguns destes componentes podem funcionar como nutriente para os microrganismos, permitindo o seu crescimento nas tintas. No caso específico das tintas de base aquosa, estas são mais suscetíveis ao ataque e degradação por microrganismos devido ao seu solvente maioritário (água). Nesse sentido, é evidente crescimento microbiano, por exemplo, nos sistemas de abastecimento de água, ao longo do processo de produção da referida indústria ou até mesmo nos produtos finais já embalados. Para combater esta problemática a indústria de tintas opta atualmente pela desinfeção adequada da água utilizada no processo de produção, pela higienização adequada de superfícies/equipamentos e utilização responsável de biocidas, evitando a deterioração das tintas e, consequentemente, o seu aspeto/odor desagradável.

Devido à interrupção das atividades de estágio na empresa e na FEUP, motivada pela pandemia COVID-19, este documento apresenta uma abordagem teórica aprofundada acerca dos processos de desinfeção existentes em sistemas de abastecimento de água. Adicionalmente, apresenta o estudo experimental desenvolvido sobre a microbiota da rede de abastecimento de água da empresa, que consistiu na enumeração e identificação de heterotróficos totais cultiváveis em meio nutritivo.

Através da recolha e análise de água de 4 pontos distintos da rede de abastecimento de água utilizada na produção, foi possível concluir que um dos locais (PA2) apresenta diferenças estatisticamente significativas em relação à água fornecida pela Águas de Gaia, EM, S.A. (PA1), apresentando uma carga microbiana inferior. Desta forma, no sistema em estudo foi evidente uma diminuição na carga microbiana em relação à água proveniente da rede pública, o que comprova a eficácia dos processos de desinfeção utilizados pela empresa: cloração e radiação ultravioleta. Relativamente à identificação dos organismos cultiváveis no sistema de abastecimento de água da empresa, encontraram-se 9 géneros maioritários distintos: *Bacillus, Staphylococcus, Enhydrobacter, Mycobacterium, Methylobacterium, Blastomonas, Paenibacillus, Pelomonas* e *Streptomyces.* Tendo em conta os baixos índices de diversidade alfa e o baixo número de Unidades Taxonómicas Operatórias (OTUs), concluiu-se que a água do sistema de abastecimento apresenta baixa diversidade bacteriana.

Palavras Chave: tintas**,** água potável, bactérias, biocidas, cloro, radiação ultravioleta

Abstract

For Dissertation unit of Chemical Engineering Master's Degree at Faculty of Engineering of the University of Porto, a project was developed with the intention of analyzing water microbiota of the paint production unit supply network in Barbot - Indústria de Tintas S.A..

Paints are a complex formulation of different components that include organic and inorganic substances: extenders, fixed vehicles/binders, pigments, diluents, solvents, and other additives. Some of these components can act as a nutrient for microorganisms, allowing microbial growth in paints. Water-based paints are more susceptible to microbiota attack and degradation, due to its main solvent (water). Microbial growth is evidenced, for example, on water supply systems, during paints production process or even on final packaged products. Presently, to avoid this problem, paints industries opt to adequate cleaning of surfaces/equipment, disinfection of water used during production process and responsible use of biocides, avoiding paints deterioration and unpleasant aspect/smell.

Due to interruption of internship activities at Barbot and FEUP, caused by COVID-19 pandemic, this document introduces a deeper theoretical approach about the disinfection processes on water supply systems. Includes an experimental study developed about water microbiota in the water supply system network in Barbot, with the enumeration and identification of total cultivable heterotrophic in nutrient medium.

Through sampling and analysis of water from 4 phases of this system, it was possible to conclude that only one of them (PA2) showed a microbial load statistically different from Águas de Gaia, EM, S.A. (PA1). A decrease in microbial load was evident when compared to public network, which shows the effectiveness of the disinfection processes used in Barbot: chlorine and ultraviolet radiation. About the identification of cultivable organisms in water supply system, nine genera were detected: *Bacillus, Staphylococcus, Enhydrobacter, Mycobacterium, Methylobacterium, Blastomonas, Paenibacillus, Pelomonas* e *Streptomyces.* Considering alpha diversity low indexes and the low number of Operational Taxonomic Units (OTUs), it was concluded that the water supply system shows low bacterial diversity.

Key Words: paints**,** drinking water, bacteria, biocide, chlorine, ultraviolet radiation

Declaração

Declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

Marisa Gregório

setembro 2020

Índice

1 Introdução ... 1

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto ... 1

1.2 Apresentação da Empresa ... 1

1.3 Contributos do(a) autor(a) para o Trabalho ... 3

1.4 Organização da Tese ... 3

2 Contexto e Estado da Arte ... 5

2.1 Tecnologia da indústria de tintas e vernizes ... 5

2.2 Contaminação das tintas decorativas e/ou seus componentes ... 8

2.2.1 Tintas de base aquosa ... 8

2.2.2 Adição de biocidas na indústria das tintas e vernizes ... 9

2.2.3 Estabilidade das tintas / Redução das contaminações ... 12

2.2.4 Microrganismos heterotróficos nas tintas ... 13

2.3 Água da rede de abastecimento de uma unidade de produção ... 14

2.3.1 Processos de desinfeção da água nos sistemas de abastecimento ... 14

2.3.2 Controlo da incrustação biológica ... 16

2.4 Cloro livre e cloro combinado ... 17

2.4.1 Reações no processo de cloração ... 18

2.4.2 Mecanismo da desinfeção ... 20

2.4.3 Formação de subprodutos da desinfeção ... 21

2.5 Radiação ultravioleta (UV) ... 23

2.5.1 Mecanismo da desinfeção ... 24

2.5.2 Cinética da desinfeção com radiação UV ... 25

2.5.3 Mecanismos de reparação ... 26

2.6 Combinação de radiação ultravioleta (UV) e cloro livre ... 26

2.7 Objetivos da Dissertação de Mestrado ... 27

3 Materiais e Métodos ... 28

3.1 Instalação experimental: 28

3.2 Enumeração dos microrganismos cultiváveis 29

3.2.1 Procedimentos de amostragem 29

3.2.2 Quantificação de microrganismos heterotróficos totais 30

3.2.3 Análise estatística 30

3.3 Identificação dos organismos cultiváveis 30

3.3.1 Recolha da biomassa 30

3.3.2 Extração e quantificação do DNA 31

3.3.3 Amplificação do gene rRNA 16S por PCR 31

3.3.4 Eletroforese em gel de agarose 32

3.3.5 Sequenciação do gene rRNA 16S 33

4 Resultados e Discussão 34

4.1 Enumeração dos microrganismos cultiváveis 34

4.2 Identificação dos organismos cultiváveis 38

5 Conclusões 43

6 Avaliação do trabalho realizado 44

6.1 Objetivos Realizados 44

6.2 Sugestões de Trabalhos Futuros 44

6.3 Apreciação Final 44

Referências 45

Apêndice A - Heterotróficos totais 50

Apêndice B - Extração de DNA 52

Apêndice C – Quantificação de DNA 53

Apêndice D - Eletroforese em gel 54

Apêndice E - Taxonomia e diversidade genómica 55

Lista de Figuras

Figura 1 - Instalações da empresa Barbot, localizada em Canelas, Vila Nova de Gaia. 2

Figura 2 - Componentes de (1) uma tinta; (2) um verniz. 5

Figura 3 - Estrutura química de (1) isotiazolinona (C_3H_3NOS), (2) MIT - metilisotiazolinona (C_4H_5NOS), (3) BIT - benzisotiazolinona (C_7H_5NOS) e (4) CMIT - clorometilisotiazolinona (C_4H_4ClNOS). 11

Figura 4 - Estrutura química do EDDM - etilenodioxi dimetanol. 12

Figura 5 - Distribuição relativa na água das principais espécies de cloro (Cl_2, HOCl, OCl^-), em função do pH, a 25 ºC, na presença de 5×10^{-3} M de cloro. 18

Figura 6 - Exemplos de trihalometanos (THMs): (1) triclorometano (clorofórmio) e (2) bromodiclorometano. 22

Figura 7 - Lesões causadas pela radiação UV no DNA: formação de CPDs e de 6-4PPs. 25

Figura 8 - Instalação do sistema de abastecimento de água à unidade de produção de tintas (1) no exterior da fábrica onde se localiza o tanque de armazenamento de água e os sistemas de desinfeção por ultravioleta e cloro; (2) no interior da fábrica (zona da produção) onde se localizam três misturadores. 28

Figura 9 - Média dos resultados das contagens em placa (UFC/100 mL) dos 3 ensaios, após 6 dias de incubação a 30 ºC, para os 4 pontos de amostragem, com a respetiva indicação das barras de erros e da análise estatística efetuada (one-way ANOVA + Tukey's pairwise). 34

Figura 10 - Abundância relativa das classes identificadas com base na sequência do gene rRNA 16S. Volume de água filtrado para a recolha da biomassa × nº de placas: MPA1-100mL×2+100mL×2+100mL; MPA2 – 100mL×2+100mL×2; MPA3 – 100mL+100mL×2+100mL×2; MPA4 –10mL+100mL×2+100mL×2. 39

Figura 11 - Abundância relativa das ordens identificadas com base na sequência do gene rRNA 16S. Volume de água filtrado para a recolha da biomassa × nº de placas: MPA1-100mL×2+100mL×2+100mL; MPA2 – 100mL×2+100mL×2; MPA3 – 100mL+100mL×2+100mL×2; MPA4 –10mL+100mL×2+100mL×2. 39

Figura 12 - Abundância relativa das famílias identificadas com base na sequência do gene rRNA 16S. Volume de água filtrado para a recolha da biomassa × nº de placas: MPA1-100mL×2+100mL×2+100mL; MPA2 – 100mL×2+100mL×2; MPA3 – 100mL+100mL×2+100mL×2; MPA4 –10mL+100mL×2+100mL×2. 39

Figura 13 - Abundância relativa dos géneros maioritários identificados com base na sequência do gene rRNA 16S. Volume de água filtrado para a recolha da biomassa × nº de placas: MPA1-100mL×2+100mL×2+100mL; MPA2 – 100mL×2+100mL×2; MPA3 – 100mL+100mL×2+100mL×2; MPA4 –10mL+100mL×2+100mL×2. 40

Figura 14 - Abundância relativa das espécies maioritárias identificadas com base na sequência do gene rRNA 16S. Volume de água filtrado para a recolha da biomassa × nº de placas: MPA1-100mL×2+100mL×2+100mL; MPA2 – 100mL×2+100mL×2; MPA3 – 100mL+100mL×2+100mL×2; MPA4 –10mL+100mL×2+100mL×2. 40

Figura A.1 - Resultados das contagens em placa (UFC/100 mL), após 6 dias de incubação, para os 4 pontos de amostragem. 51

Figura D.1 - (a) Eletroforese em gel para as 4 misturas (pool dos diferentes ensaios) e para a diluição x10 da MPA3 e da MPA4; (b) NZYDNA Ladder VIII da Nzytech®. 54

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Exemplos de aditivos utilizados na produção de tintas, com indicação da sua respetiva função.....7

Tabela 2 - Principais espécies isoladas a partir de amostras de tintas em lata. 8

Tabela 3 - Concentração máxima de biocida (CMIT/MIT; MIT) admitida em tintas disponíveis na União Europeia.....12

Tabela 4 - Informações técnicas unitárias relativas ao funcionamento dos dois sistemas de desinfeção de água por radiação ultravioleta, na empresa em estudo (Barbot). 29

Tabela 5 - Preparação da master mix utilizada na PCR. 32

Tabela 6 - Indicação dos valores paramétricos presentes no Dec. Lei n.º 152/2017 e dos resultados obtidos nas contagens em placa (UFC/100 mL) para o método das membranas filtrantes. 36

Tabela 7 - Indicação dos valores paramétricos presentes no Boletim 'Controlo da qualidade da água para consumo' da zona de abastecimento do concelho de Vila Nova de Gaia e dos resultados obtidos nas contagens em placa (UFC/100mL) para o método das membranas filtrantes. 37

Tabela 8 - *Reads* para as 4 amostras em estudo. 38

Tabela 9 - Índices de diversidade alfa das amostras em estudo.....38

Tabela A.1 - Resultados das contagens em placa (UFC/100mL) para o método das membranas filtrantes, após 6 dias de incubação, para os 4 pontos de amostragem.....50

Tabela B.1 - Características do GRS Genomic DNA Kit Bacteria da Grisp®. 52

Tabela C.1 - Quantificação das misturas e amostras obtidas em cada um dos ensaios em separado para o ponto de amostragem 1 (PA1), 2 (PA2), 3 (PA3) e 4 (PA4) em termos de µg DNA.mL^{-1}. 53

Tabela E.1 - Abundância relativa das espécies identificadas com base na sequência do gene rRNA 16S na amostra MPA1. 555

Tabela E.2 - Abundância relativa das espécies identificadas com base na sequência do gene rRNA 16S na amostra MPA2. 55

Tabela E.3 - Abundância relativa das espécies identificadas com base na sequência do gene rRNA 16S na amostra MPA3. 56

Tabela E.4 - Abundância relativa das espécies identificadas com base na sequência do gene rRNA 16S na amostra MPA4. 56

Notação e Glossário

λ	Comprimento de onda

Lista de Siglas

I&D	Departamento de Investigação e Desenvolvimento
COV	Compostos orgânicos voláteis
LEPABE	Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia
UV	Ultravioleta
ECHA	Agência Europeia das Substâncias Químicas
BPR	Regulamento de Produtos Biocidas
ETA	Estação de Tratamento de Águas
EPSs	Substâncias poliméricas extracelulares
DBPs	Subprodutos de desinfeção
THMs	Trihalometanos
FDA	*Food and Drug Administration*
CPDs	Ciclobutanos de pirimidina
(6-4)PPs	Fotoprodutos (6-4)-pirimidina-pirimidona
PA1	Ponto de amostragem 1
PA2	Ponto de amostragem 2
PA3	Ponto de amostragem 3
PA4	Ponto de amostragem 4
PCA	Agar de contagem em placa / *Plate Count Agar*
UFC	Unidades formadoras de colónias
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reação em cadeia de polimerase
OTUs	Unidades Taxonómicas Operatórias
WHO	*World Health Organization*
PCQA	Programa de Controlo de Qualidade de Água
ERSAR	Entidade Reguladora de Serviços de Águas e Resíduos
IAREN	Instituto da Água da Região Norte
LD	Limite de deteção
pb	Pares de bases

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

O presente relatório descreve o trabalho desenvolvido entre março de 2020 e setembro de 2020, na empresa Barbot – Indústria de Tintas S.A., situada em Canelas, Vila Nova de Gaia. O tema do projeto é "*Análise da microbiota da água da rede de abastecimento de uma unidade de produção de tintas*". Este projeto surge no âmbito da unidade curricular Dissertação do Mestrado Integrado em Engenharia Química, ao abrigo da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

As tintas são uma formulação complexa de diferentes componentes, que incluem substâncias orgânicas e inorgânicas: cargas, veículos fixos/ligantes, pigmentos, diluentes, solventes (como por exemplo, água) e outros aditivos. Alguns destes componentes podem servir de nutriente para os microrganismos, permitindo o seu crescimento nas tintas. Nesse sentido, pretendeu-se estudar a água da rede de abastecimento da unidade de produção como uma possível proveniência da contaminação das tintas, enumerando e identificando os heterotróficos totais (cultiváveis em meio nutritivo). Devido à interrupção das atividades de estágio na empresa e na FEUP, motivada pela pandemia COVID-19, pretendeu-se fazer uma abordagem teórica aprofundada acerca dos processos de desinfeção existentes em sistemas de abastecimento de água, com o auxílio de todos os conhecimentos adquiridos ao longo do ciclo de estudos de Engenharia Química.

É crucial que as tintas disponibilizadas diariamente no mercado não se deteriorem, nem apresentem um aspeto/odor desagradável para o consumidor. Todas estas preocupações na gestão de uma empresa pautam a diferença e preservam a imagem da sua marca. Assim, as indústrias de tintas estão cada vez mais atentas às contaminações dos seus produtos e aos impactos negativos no ambiente, que surgem como resultado da sua produção. Desta forma, é importante compreender a origem de tais contaminações para ser possível a sua mitigação, bem como evoluir, estrategicamente, para um mercado mais responsável e atento às questões ambientais. Para garantir a total satisfação dos clientes deste setor e, se possível, a fidelidade dos mesmos, é essencial uma monitorização do grau de contaminação microbiológica desde o início do processo de produção até à fase final de embalamento e armazenamento do produto final, que pode durar semanas ou até anos. Para além disso, é bastante importante garantir a higienização periódica de todos os espaços de trabalho/produção, bem como garantir desinfeções regulares com a utilização de biocidas.

1.2 Apresentação da Empresa

A empresa Barbot – Indústria de Tintas S.A., adiante designada apenas por Barbot, caracterizada por valorizar a segurança e a qualidade dos seus produtos em primeiro lugar, surgiu

em 1920 como uma empresa de cariz familiar. Todavia, ao longo dos últimos anos, a mesma sofreu uma continua expansão, conseguindo assim afirmar-se no mercado nacional da indústria de tintas (Tintas Barbot, n.d.). Atualmente, está presente de Norte a Sul do país, com duas fábricas localizadas no concelho de Vila Nova de Gaia, em Laborim e em Canelas (Figura 1). Desta forma, apresenta assim um alargado campo de abrangência no mercado nacional, com infraestruturas providas de tecnologia moderna, uma alta capacidade produtiva e também uma elevada competitividade (Tintas Barbot, n.d.).



Figura 1 - Instalações da empresa Barbot, localizada em Canelas, Vila Nova de Gaia (Tintas Barbot, n.d.).

É perfeitamente evidente o caráter internacional na expansão do Grupo Barbot, estando este, atualmente, presente em 3 continentes: Europa (Portugal, Espanha, França, Bélgica, Luxemburgo, Suíça), África (Angola, Cabo Verde, Guiné, Moçambique) e América Latina (Perú) e sendo cinco as empresas que constituem o Grupo Barbot: Barbot Portugal, Barbot Angola, Barbot Moçambique, Barbot Cabo Verde e *Jallut* (Tintas Barbot, n.d.).

Hoje o Grupo Barbot apresenta uma marca fortalecida no mercado das tintas e uma oferta alargada de produtos e soluções para os problemas diários dos seus clientes e colaboradores, comercializando tintas e vernizes para diversos setores (Tintas Barbot, n.d.).

"Uma tinta Barbot é muito mais do que a sua cor. É tudo o que transmite, tudo o que inspira. É um movimento infinito de emoções."

A Barbot foca-se, essencialmente, numa melhoria contínua e na inovação dos seus produtos, desta forma, a empresa possui um Departamento de Investigação e Desenvolvimento (I&D) que é responsável pela conceção, formulação e desenvolvimento de novos produtos, no sentido de responder às necessidades do quotidiano (Tintas Barbot, n.d.).

No ano de 2003, a empresa obteve a Certificação segundo a norma ISO 9001, atingindo assim o grau mais elevado de qualidade (Tintas Barbot, n.d.).

A Barbot apresenta uma forte preocupação com a política de gestão ambiental. Exemplo disso são os mais recentes produtos não agressivos para o ambiente, ou seja, ecológicos, que pretendem

responder às questões da sustentabilidade tão abordadas na atualidade. Neste sentido, a Barbot tem como objetivo eliminar os impactos negativos no ambiente que surgem como resultado da sua atividade, nomeadamente, através do tratamento de resíduos industriais e da redução da emissão de compostos orgânicos voláteis (COV) (Tintas Barbot, n.d.).

A marca Barbot conquistou um forte posicionamento na decoração e renovação de interiores, sendo atualmente uma referência no mercado português. Assim, a assinatura "Novas emoções" reflete a aposta na esfera mais emocional associada ao universo da decoração (Tintas Barbot, n.d.).

"Porque uma tinta Barbot reflete muito mais do que a sua cor. Pretende ser aspiracional e inspiradora. Porque as pessoas podem viver em casas. Mas as casas também vivem nas pessoas. E uma casa sem cor é uma casa sem emoção."

1.3 Contributos do(a) autor(a) para o Trabalho

O trabalho desenvolvido permitiu analisar os organismos heterotróficos totais da água em diferentes pontos da rede de abastecimento de uma unidade de produção de tintas e, desse modo, avaliar a eficácia dos sistemas de desinfeção de água existentes na Barbot. Esta temática é bastante importante para uma indústria de tintas de base aquosa, uma vez que, a água é o solvente maioritário deste tipo de tintas. Desta forma, é importante salientar a necessidade de garantir a proteção bacteriológica neste tipo de tintas devido ao fácil crescimento de microrganismos, por exemplo, nos sistemas de abastecimento de água, ao longo do processo de produção da referida indústria ou até mesmo nos produtos finais já embalados. O conhecimento da microbiota da água da rede da Barbot permitirá retirar conclusões em relação à proveniência da contaminação das tintas, que foi já comprovada no âmbito de Dissertações realizadas, anteriormente, nesta mesma empresa.

Esta Dissertação de Mestrado, realizada em ambiente empresarial, teve a colaboração da Faculdade. Desta forma, as amostragens efetuadas durante o período de estágio foram realizadas na empresa, todavia, a parte experimental foi realizada nas instalações do LEBAPE, na FEUP.

1.4 Organização da Tese

Após uma contextualização geral do assunto em estudo e apresentação da empresa Barbot, no capítulo 2.1 faz-se uma pequena abordagem relativa à tecnologia da indústria das tintas e vernizes, destacando a importância de diversas matérias-primas. Posteriormente, no subcapítulo 2.2 aborda-se a problemática da contaminação de tintas decorativas ou componentes das tintas, nomeadamente tintas de base aquosa, fazendo referência à utilização consciente de biocidas (aditivos) para fins específicos, regulados pela Agência Europeia de Substâncias Químicas (ECHA). No subcapítulo 2.3 apresenta-se uma abordagem geral sobre a água da rede de abastecimento de unidades de produção industrial, nomeadamente sobre os processos de desinfeção de água, alertando para a existência de biofilmes, comumente encontrados nas paredes das condutas e reservatórios dos sistemas de

abastecimento de água. Nos subcapítulos 2.4, 2.5 e 2.6 apresenta-se uma pesquisa teórica aprofundada sobre a utilização de cloro e radiação ultravioleta (UV) como métodos de desinfeção em sistemas de abastecimento de água. No subcapítulo 2.7 estão descritos os objetivos desta Dissertação de Mestrado.

O capítulo 3 compreende a instalação do sistema de abastecimento de água na Barbot e, também, os materiais e métodos necessários para a realização da atividade experimental, nomeadamente a enumeração e identificação dos microrganismos cultiváveis.

No capítulo 4 são apresentados e discutidos os resultados obtidos. Neste capítulo são comparados os valores obtidos na enumeração de heterotróficos totais ao longo da linha de abastecimento de água com os dados fornecidos pela literatura e pelo boletim de análise da Águas de Gaia, Empresa Municipal, S.A.. Para além disso, são comparados os organismos identificados com outros estudos relacionados com a diversidade bacteriana em águas potáveis.

No capítulo 5 são apresentadas as conclusões desta Dissertação de Mestrado e o capítulo 6 faz referência à avaliação do trabalho realizado, onde se encontram sugestões de trabalhos futuros. Por fim, são apresentados Apêndices (A a E) com informação útil para a realização desta Dissertação.

2 Contexto e Estado da Arte

2.1 Tecnologia da indústria de tintas e vernizes

De uma forma detalhada e de acordo com a norma portuguesa NP41, pode-se descrever uma tinta como um produto de composição pigmentada líquida, pastosa ou sólida que, quando aplicado a um substrato, forma uma película sólida, contínua, corada e opaca, dotada de propriedades protetoras, decorativas ou propriedades específicas (Nogueira, 2008). Uma tinta é basicamente um verniz no qual foi adicionado um pigmento para proporcionar uma cor. Nesse sentido, a diferença entre tinta e verniz é que o verniz é sempre transparente, enquanto que, a tinta apresenta um "poder de cobertura" (Homem, 2018).

Uma tinta e um verniz são constituídos por componentes que interagem física e quimicamente. Desta forma, com base na norma portuguesa NP41, na Figura 2 estão descritos os principais componentes de uma tinta e de um verniz, divididos em duas partes: o extrato seco e o veículo volátil (Homem, 2018; Nogueira, 2008).

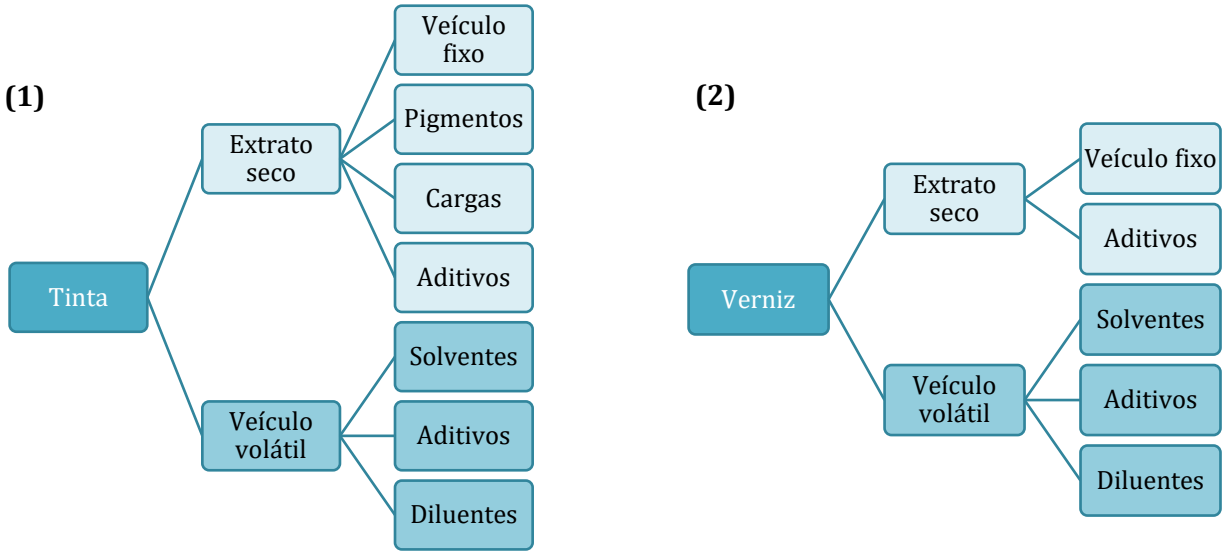


Figura 2 - Componentes de (1) uma tinta; (2) um verniz (Homem, 2018; Nogueira, 2008).

Os pigmentos, que dão cor e opacidade às tintas, compreendem o material particulado sólido (orgânico ou inorgânico), com cores específicas, praticamente insolúveis no veículo. Assim, a cor de um pigmento é influenciada pela sua estrutura química (absorção da luz), enquanto que a opacidade é influenciada pelo índice de refração (difração da luz). O dióxido de titânio é o pigmento branco (inorgânico) mais utilizado na indústria das tintas (Homem, 2018; Nogueira, 2008).

As cargas são substâncias que, sob a forma de partículas mais ao menos finas, apresentam um baixo poder de cobertura e são insolúveis no veículo. Podem contribuir ou não para a cor e são usadas

como constituintes de tintas, com o fim de lhes modificar determinadas propriedades, entre as quais: preço, permeabilidade da película, resistência química, brilho, sedimentação, resistência à abrasão, comportamento anticorrosivo e viscosidade. O carbonato de cálcio, barita, talco e mica são exemplos de cargas utilizadas na indústria das tintas (Homem, 2018; Nogueira, 2008).

O veículo fixo ou ligante, que é a parte não volátil do veículo, permite a formação da película sólida, compreendendo as resinas e os polímeros (alto peso molecular e baixo peso molecular). A parte mais importante do veículo fixo de uma tinta é constituída pelos óleos e resinas que o compõe. Assim, as resinas são substâncias orgânicas sólidas, semi-sólidas ou líquidas, amorfas, termoplásticas ou termoendurecíveis, más condutoras da eletricidade, em geral insolúveis na água, mas solúveis em certos dissolventes orgânicos. Existem diversos tipos de resinas, tais como resinas acrílicas, resinas alquídicas, resinas de poliuretano, resinas de silicone e resinas epóxi (Homem, 2018; Nogueira, 2008).

Os solventes são líquidos voláteis que, nas condições normais de secagem, são capazes de dissolver os veículos fixos das tintas e vernizes. Desta forma, proporcionam à tinta uma melhor estabilidade e um tempo de vida adequado. A água é um exemplo de solvente, sendo maioritariamente usado em tintas de base aquosa (Homem, 2018; Nogueira, 2008).

Os diluentes são líquidos voláteis, parcial ou totalmente miscíveis com o veículo. Quando adicionados a uma tinta ou verniz, garantem um nível ótimo de fluidez durante a sua aplicação. Assim, a adição de diluente na tinta para ajustar a viscosidade de aplicação é bastante importante para que a tinta alcance as características ótimas. O balanço correto de solventes garante uma boa formação de película após a aplicação da tinta. A utilização de um diluente desadequado ou de quantidades inadequadas, assim como, o desajuste na velocidade de evaporação do solvente (secagem física), podem alterar completamente o comportamento do produto final (Homem, 2018; Nogueira, 2008).

Para além dos componentes das tintas e vernizes já abordados, existem outras substâncias utilizadas nesta indústria, em baixas percentagens, conhecidas por aditivos. Estas substâncias servem para alterar algumas propriedades da tinta ou verniz como, por exemplo, contribuírem para facilitar o fabrico, melhorar a estabilidade da tinta na embalagem, facilitar a aplicação e resolver defeitos que possam aparecer na película de tinta. Os aditivos são classificados pela função que cumprem e não pela sua forma física ou composição química, uma vez que a sua função é a única característica que realmente importa (Homem, 2018; Nogueira, 2008). Na Tabela 1 encontram-se alguns exemplos e respetivas funções de aditivos utilizados na produção de tintas e vernizes.

Tabela 1 - Exemplos de aditivos utilizados na produção de tintas, com indicação da sua respetiva função (Homem, 2018).

Função dos aditivos	Modo de ação dos aditivos	Exemplo
Agentes antiespuma	Reduzem a tensão superficial na vizinhança das bolhas, fundindo-as em bolhas maiores e menos estáveis que, consequentemente, quebram.	Antiespumantes à base de silicone.
Secantes	Aumentam a velocidade de secagem da tinta.	Compostos orgânicos metálicos.
Dispersantes	Otimizam a dispersão dos pigmentos no veículo fixo.	Polieletrólitos solúveis em água, sais ou polifosfatos.
Estabilizadores (Absorvedores UV)	Convertem a radiação absorvida em calor, reduzindo a formação e propagação de radicais livres, que são responsáveis pela degradação do polímero.	HALS (*hindered amine light stabilizers*).
Bactericidas	Biocidas que destroem a parede bacteriana eliminando as bactérias.	Isotiazolinonas (MIT, BIT, CMIT).
Plastificantes	Aumentam a elasticidade do filme de tinta.	Ftalato de butil benzílico ($C_{19}H_{20}O_4$).
Espessantes	Aumentam a viscosidade da tinta.	Compostos à base de celulose.
Anticorrosivos	Conferem propriedades anticorrosão.	Derivado do ácido tânico.
Agentes anti-sedimento	Evitam a sedimentação dos pigmentos após o embalamento.	Estearato de alumínio.
Agentes anti-pele	Previnem a formação de uma película na superfície da tinta embalada (solidificação de óleos e resinas alquídicas), provocada por oxidação pelo oxigénio do ar.	Metil etil cetoxima.

De uma forma geral, as tintas são consideradas produtos potencialmente agressivos para a saúde humana e para o meio ambiente, devido à libertação de solventes orgânicos para a atmosfera e/ou produção de efluentes líquidos de base aquosa e de base solvente. Assim, nos últimos anos, a indústria das tintas sentiu necessidade de enfrentar estas situações através do desenvolvimento de produtos com um menor conteúdo em compostos agressivos para o ambiente, introdução de novas tecnologias (como tintas em pó ou tintas com alto conteúdo em sólidos), substituição de esquemas de base solvente por sistemas aquosos e investimento em sistemas de tratamento de efluentes e outros resíduos. Por outro lado, os fabricantes de matérias-primas para a indústria de tintas desenvolveram novos produtos menos agressivos para o ambiente, tendo em conta a legislação cada vez mais restritiva (*APT - Associação Portuguesa de Tintas*, n.d.). Para além disso, é ainda cada vez

mais evidente a automatização das operações de fabrico (maior compatibilidade com superfícies, secagem mais rápida, maior durabilidade, maior compatibilidade com condições atmosféricas adversas e esquemas de pintura mais simples (nº de demãos)) (Nogueira, 2008).

2.2 Contaminação das tintas decorativas e/ou seus componentes

As tintas são uma formulação complexa de diferentes componentes que lhes conferem características físicas tais como cor, aderência e viscosidade. É importante compreender que alguns componentes, referenciados no subcapítulo 2.1, podem servir de nutriente para os microrganismos, permitindo o seu crescimento nas tintas (embaladas ou em superfícies revestidas), uma vez que, estes são capazes de crescer na presença de um ambiente húmido favorável (Poulsen *et al*., 2018). Desta forma, a contaminação microbiana em tintas pode surgir a partir das matérias-primas ao longo do próprio processo de produção, ou ainda nas tintas já embaladas (Obidi *et al*., 2009). Para além disso, a deterioração das tintas decorativas, superfícies revestidas e alguns substratos revestidos pode também ser resultado de um ataque por subprodutos ácidos produzidos pela atividade microbiana (Associação Portuguesa de Tintas, 2014). Na Tabela 2 estão assinaladas algumas espécies de bactérias e fungos, geralmente isoladas em estudos efetuados com amostras de tintas em lata.

Tabela 2 - Principais espécies isoladas a partir de amostras de tintas em lata (Nogueira, 2008; Obidi et al., 2009; Poulsen et al., 2018).

Bactérias	*Pseudomonas, Bacillus, Enterobacter, Enterococcus, Citrobacter*
Fungos	*Penicillium, Aspergillus, Pullularia, Alternaria*

2.2.1 Tintas de base aquosa

A presente Dissertação centra-se na contaminação de tintas de base aquosa, uma vez que a fábrica da Barbot, situada em Canelas, se destaca pela produção deste tipo de tintas. Algumas das vantagens dos sistemas de base aquosa são o baixo conteúdo em solventes orgânicos, a boa durabilidade, a secagem rápida, a boa retenção do brilho e da cor, a flexibilidade melhorada, a rápida repintura, a maior permeabilidade ao vapor de água e o odor reduzido. Por outro lado, as tintas de base aquosa são mais suscetíveis ao ataque e degradação por microrganismos devido ao seu solvente maioritário (água), sendo necessária uma proteção bacteriológica (Nogueira, 2008).

Nogueira (2008) admite que praticamente todas as matérias-primas de natureza orgânica que se utilizam no fabrico de tintas de base aquosa, podem constituir uma fonte de alimentação para as bactérias, uma vez que as bactérias produzem enzimas que transformam esses produtos orgânicos em alimentos assimiláveis por elas. Essas enzimas podem permanecer ativas até que sejam completamente consumidas ou destruídas. Os compostos orgânicos presentes nas tintas também constituem uma fonte de alimentação para os fungos e algas, assim, os esporos que são transportados

pelas correntes de ar encontram um lugar ideal para crescerem quando se depositam na superfície das tintas (Nogueira, 2008).

Os efeitos da degradação biológica são em geral facilmente detetáveis, tais como mau odor, perda de viscosidade, descoloração e algumas complicações menos visíveis como, por exemplo, a fratura das cadeias moleculares dos polímeros, tornando as tintas mais vulneráveis ao ataque por fungos e bolores (Nogueira, 2008). Esta deterioração microbiológica, que proporciona uma má *performance* por parte das tintas, provoca perdas económicas para os consumidores e, também, para as indústrias produtoras de tintas (Poulsen *et al*., 2018).

Tendo em conta o referido anteriormente, um estudo elaborado no âmbito de outra Dissertação de Mestrado confirmou a presença de 7 espécies bacterianas - *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Cellulosimicrobium cellulans*, *Bacillus badius*, *Bacillus onubensis, Brevibacterium celere* e *Staphylococus haemolyticus* - em amostras distintas de tintas aquosas embaladas, produzidas nas instalações da Barbot.

2.2.2 Adição de biocidas na indústria das tintas e vernizes

Atualmente, a preservação das tintas é conseguida no próprio processo de produção, através da adição de biocidas – substâncias ativas e preparações que contêm uma ou mais substâncias ativas, que se adicionam com o objetivo de inibir/matar os microrganismos responsáveis pela contaminação das tintas (Poulsen *et al*., 2018). No entanto, se não forem utilizados de forma responsável, os produtos biocidas podem pôr em risco a saúde humana e o ambiente devido às suas propriedades intrínsecas (Associação Portuguesa de Tintas, 2014; Regulamento (UE) N.º 528/2012 de 22 de Maio de 2012 Relativo à Disponibilização No Mercado e à Utilização de Produtos Biocidas, 2012).

Os biocidas são utilizados em tintas decorativas para fins específicos, tais como conservantes para produtos durante o armazenamento, proteção de películas, proteção de substratos e, ainda, pesticidas especiais. Desta forma, a sua utilização adequada em tintas pode, por vezes, melhorar significativamente o período de vida útil da tinta na embalagem, a proteção conferida ao substrato, o tempo de vida do revestimento e, também, o ciclo de manutenção necessário (Associação Portuguesa de Tintas, 2014).

A 1 de Setembro de 2013 entrou em vigor o Regulamento (UE) n.º 528/2012 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo à disponibilização no mercado e à utilização de produtos biocidas (BPR), que visa simplificar a aprovação de substâncias ativas e a autorização de produtos biocidas, sem comprometer a proteção da saúde humana e do ambiente (European Chemicals Agency, n.d.-a). Assim sendo, todos os produtos biocidas requerem uma autorização antes de serem disponibilizados no mercado e as substâncias ativas contidas nesses produtos biocidas devem ser previamente

aprovadas (Regulamento (UE) N.º 528/2012 de 22 de Maio de 2012 Relativo à Disponibilização No Mercado e à Utilização de Produtos Biocidas, 2012; Silva *et al*., 2020).

A Agência Europeia de Substâncias Químicas (ECHA) é responsável pela publicação da lista de substâncias relevantes e dos respetivos fornecedores de substâncias e produtos, em conformidade com o artigo 95.º do Regulamento dos Produtos Biocidas. Assim, disponibiliza as suas propriedades perigosas, a classificação e rotulagem, bem como informações sobre o modo de as utilizar de forma segura. Desde 1 de setembro de 2015, um produto biocida não pode ser disponibilizado no mercado da União Europeia, a menos que o fornecedor da substância ou o fornecedor do produto esteja incluído na lista do artigo 95.º do tipo de produto ao qual o produto pertence (European Chemicals Agency, n.d.-b).

Desta forma, diversas substâncias ativas podem ser proibidas ou sujeitas a restrições, nomeadamente na sua concentração por peso para diversos fins específicos. Importa salientar que o objetivo deverá ser sempre a utilização da mais baixa concentração eficaz do biocida. Em suma, ao selecionar o biocida para tintas decorativas, deve-se ter em conta a legislação, a eficácia do biocida, a saúde, a segurança e a proteção ambiental (Associação Portuguesa de Tintas, 2014). Na Tabela 1 apresentada anteriormente encontram-se os aditivos utilizados em tintas com atividade biocida, como por exemplo, bactericidas.

Um efeito antimicrobiano pode ser definido como uma interação entre uma substância ativa e os alvos específicos da célula microbiana. Desta forma, os biocidas devem ser capazes de atingir os sítios-alvo com uma concentração mínima ativa. De uma forma geral, os processos envolvidos na ação antimicrobiana oferecem transporte de um agente antimicrobiano para a superfície da célula, adsorção, difusão, penetração e interação no alvo. Esses processos não são instantâneos, por isso, o tempo de morte correspondente pode depender dos agentes antimicrobianos usados. As diferenças dependem do modo de ação, bem como da constituição química e das propriedades físico-químicas do biocida (Ribeiro *et al*., 2019).

O grupo das isotiazolinonas (C_3H_3NOS) é um grupo de biocidas bastante utilizado no controlo do crescimento microbiano. Na Figura 3 é possível compreender a estrutura química de alguns compostos incluídos neste grupo, tais como o MIT (metilisotiazolinona), o BIT (benzisotiazolinona) e o CMIT (clorometilisotiazolinona) (Williams, 2007). Estes compostos são bastante utilizados no tratamento de águas industriais e, também, no setor das tintas, vernizes, adesivos, cosméticos e produtos de higiene pessoal (Lundov *et al*., 2014; Silva *et al*., 2020). Neste sentido, o produto mais utilizado para proteção das tintas embaladas é a mistura de CMIT/MIT, na proporção de 3:1, que apresenta um amplo espetro de ação, pois atua contra bactérias, fungos e algas (Williams, 2007).

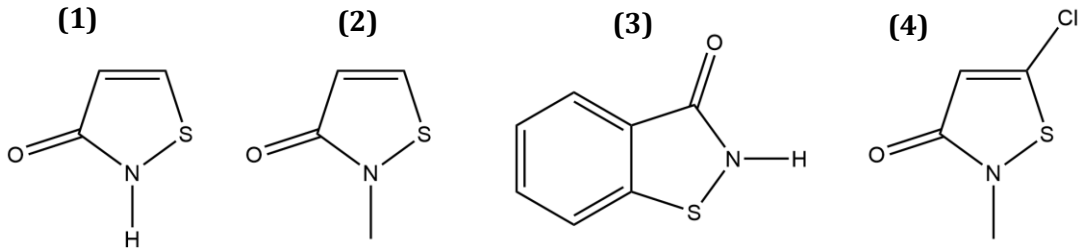


Figura 3 - Estrutura química de (1) isotiazolinona (C_3H_3NOS), (2) MIT - metilisotiazolinona (C_4H_5NOS), (3) BIT - benzisotiazolinona (C_7H_5NOS) e (4) CMIT - clorometilisotiazolinona (C_4H_4ClNOS) [ChemDraw®, adaptado de (PubChem, n.d.-b)].

Estes compostos são descritos como capazes de se difundir através da membrana celular das bactérias e da parede celular dos fungos (Silva et al., 2020). O mecanismo de ação das isotiazolinonas, como agentes eletrofílicos, baseia-se em duas etapas. Inicialmente, há uma rápida inibição (minutos) do crescimento e do metabolismo da célula e, posteriormente, um dano irreversível da célula, o que contribui para a inviabilidade e morte celular da mesma (horas) (Silva et al., 2020; Williams, 2007). As células são inibidas pela interrupção das vias metabólicas que envolvem as enzimas desidrogenases. Estas enzimas que reagem com as isotiazolinonas estão relacionadas com o Ciclo de Krebs (α-cetoglutarato desidrogenase, succinato desidrogenase, por exemplo) e com a produção de energia (NADH desidrogenase). As funções fisiológicas que são rapidamente inibidas nos microrganismos são o crescimento, a respiração celular (consumo de oxigénio) e a produção de energia (síntese de adenosina trifosfato). Muitas destas enzimas estão presentes em microrganismos aeróbios e anaeróbios, o que explica o facto da mistura CMIT/MIT apresentar um alargado espetro de ação. Estudos relacionados com a difusão dos biocidas nas células evidenciam que o CMIT é rapidamente transportado para o interior da célula por um processo que requer energia, enquanto que o MIT entra na célula de forma mais lenta, através de um típico processo de difusão (Williams, 2007). A morte da célula resulta da destruição de proteínas que contenham o grupo tiol e da produção de radicais livres (Silva et al., 2020; Williams, 2007).

As isotiazolinonas são todas voláteis, por isso, Lundov *et al*. (2014) admite que a emissão de isotiazolinonas, especialmente a partir das tintas, provoca reações graves de dermatite alérgica. Dessa forma, na União Europeia, surgiram medidas para restringir o uso de alguns destes compostos e foram aprovados critérios para a rotulagem e advertências nos produtos químicos (Silva *et al*., 2020). Na Tabela 3 estão presentes as restrições impostas, nomeadamente na concentração máxima de biocida admitida em tintas disponíveis na União Europeia. Para além disso, à luz dos dados toxicológicos mais recentes, espera-se que a União Europeia opte pela substituição dos biocidas mais tóxicos por outros com a mesma eficácia, mas com um perfil de segurança superior (Silva *et al*., 2020).

Tabela 3 - Concentração máxima de biocida (CMIT/MIT; MIT) admitida em tintas disponíveis na União Europeia (Silva *et al*., 2020).

Concentração máxima de biocida admitida em tintas	
CMIT/MIT	< 15 ppm
MIT	< 300 ppm

No caso específico da Barbot, o *stock* de biocidas utilizado no seu processo de produção sofrerá alterações ao longo deste ano. Por força da legislação a entrar em vigor por parte da ECHA, surge a necessidade de recorrer a alternativas livres de MIT, uma vez que, os limites legais permitidos para o princípio ativo são muito baixos. Desta forma, a empresa pretende apostar nos seguintes biocidas: CMIT/MIT (3:1) (1,4% matéria ativa); EDDM (etilenodioxi dimetanol) (14,2% matéria ativa) e CMIT/MIT (3:1) (0,5% matéria ativa); BIT (12% matéria ativa). Importa realçar que a mistura CMIT/MIT é quimicamente diferente do composto MIT, por isso, a presença de MIT na mistura CMIT/MIT considera-se muitas vezes como um resíduo, sem relevância, deixando este de constituir um problema. A estrutura química do EDDM (etilenodioxi dimetanol), substância utilizada na desinfeção e preservação de produtos como líquidos em lata, por exemplo, encontra-se na Figura 4. Importa realçar que esta substância, utilizada no combate de bactérias, fungos e leveduras, é prejudicial se for ingerida, causa lesões oculares graves e irritação na pele (European Chemicals Agency, n.d.-c).

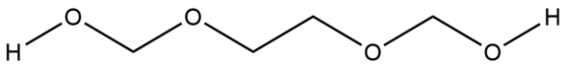


Figura 4 - Estrutura química do EDDM - etilenodioxi dimetanol ($C_4H_{10}O_4$) [ChemDraw®, adaptado de (PubChem, n.d.-a)].

2.2.3 Estabilidade das tintas / Redução das contaminações

Importa referir que a estabilidade da tinta enlatada depende de fatores como, por exemplo, o grau de contaminação das matérias-primas, o nível de higiene da área fabril, a utilização de um bom biocida adicionado na quantidade adequada e o tempo decorrido entre a produção e o enchimento. Quando um destes fatores não se verifica, como no caso do uso de matérias-primas contaminadas, a bioestabilidade do produto final fica bastante comprometida, uma vez que o biocida adicionado para proteger a tinta e assegurar a sua estabilidade a longo prazo, será imediatamente utilizado para combater essa mesma contaminação. No caso de se adicionar uma maior quantidade de biocida, pode provocar-se o aparecimento de formas mutantes dos microrganismos, que adquirem resistência à substância ativa usada (Nogueira, 2008).

As fontes mais importantes de contaminação numa fábrica são o ar, as matérias-primas, os resíduos que ficam nos equipamentos e as próprias pessoas. Assim sendo, é completamente

impossível eliminar todas as fontes de contaminação numa fábrica. No entanto, há boas práticas que permitem manter a área fabril num melhor estado. Uma das técnicas frequentemente utilizadas consiste em adicionar bactericida à água de lavagem dos tanques (preferencialmente contruídos em aço inox para facilitar a sua limpeza), fazendo-a circular através de todas as tubagens e equipamentos utilizados na produção das tintas. A limpeza do local de trabalho tem de fazer parte das rotinas diárias/semanais de todos os colaboradores da empresa. As matérias-primas e os produtos intermédios devem estar sempre tapados, no sentido de evitar a contaminação atmosférica. Para além disso, a água e outras matérias-primas devem ser, periodicamente, inspecionadas para se verificar que não constituem uma fonte de contaminação (Nogueira, 2008).

Os reservatórios de águas representam o ponto da rede de abastecimento de água de uma unidade de produção de tintas onde existe um maior tempo de permanência, ou seja, apresentam uma maior possibilidade de adquirir qualquer tipo de contaminação. Logicamente, o risco de contaminação aumenta quando os reservatórios de água não são sujeitos a limpeza e desinfeção adequadas. Desta forma, é recomendável realizar inspeções regulares, bem como a higienização dos reservatórios (CENERTEC, 2018).

2.2.4 Microrganismos heterotróficos nas tintas

Muitos microrganismos que contaminam as tintas são designados por heterotróficos, pois utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono para crescer e se multiplicarem (Poulsen *et al*., 2018). O crescimento é um processo dinâmico que requer energia e nutrientes para sintetizar os componentes e garantir a manutenção celular. Dessa forma, são requeridos macroelementos ou macronutrientes, tais como, carbono, oxigénio, hidrogénio, azoto, enxofre, fósforo, azoto, potássio, cálcio, magnésio e ferro. Para além destes, são também requeridos microelementos ou micronutrientes, igualmente necessários para as células, mesmo que em quantidades muito pequenas ou residuais, tais como, manganésio, zinco, cobalto, molibdénio e cobre (Ferreira *et al*., 2010).

Remover os macronutrientes, responsáveis pelo crescimento de todos os microrganismos, limitaria o crescimento microbiano nas tintas. No entanto, esses elementos são os principais constituintes da maioria dos compostos relevantes no setor da indústria de tintas. O carbono, hidrogénio e oxigénio fazem parte de muitos polímeros orgânicos, por exemplo, espessantes à base de celulose e polímeros à base de acrilato. O azoto, juntamente com o enxofre, também é incluído em polímeros como poliuretano e em biocidas, como BIT, MIT e CMIT. E também o fósforo é usado como um agente quelante em algumas tintas (Poulsen *et al*., 2018).

2.3 Água da rede de abastecimento de uma unidade de produção

Antes da água ser distribuída para consumo humano ou industrial, são vários os processos necessários para o tratamento da água, realizados numa Estação de Tratamento de Águas (ETA), tais como: gradagem, decantação, filtração, desidratação mecânica de lamas e, por fim, desinfeção através da adição de cloro para que a água não seja contaminada durante o transporte (SIMDOURO, n.d.). No caso particular da Barbot, situada em Canelas, a água que utiliza é proveniente da rede de abastecimento – Águas de Gaia, Empresa Municipal, S.A..

De acordo com o n.º 1 do artigo 6.º do Dec. Lei n.º 306/2007, de 27 de agosto, alterado pelo Dec. Lei n.º 92/2010, de 26 de julho e, posteriormente, alterado pelo Dec. Lei n.º 152/2017, de 7 de dezembro, que estabelece o regime da qualidade da água para consumo humano, a água destinada ao consumo humano deve respeitar os valores paramétricos das partes I, II e III do anexo I do presente Dec. Lei. Nesse sentido, tal como resulta do disposto no n.º 2 do artigo 8.º, compete às entidades gestoras de sistemas de abastecimento garantir que a água destinada ao consumo humano seja salubre, limpa e desejavelmente equilibrada, designadamente que, não contenha nenhum microrganismo, parasita ou substância em quantidade ou concentração que possa constituir um perigo potencial para a saúde humana (Diário Da República, 1.ª Série — N.º 164 — 27 de Agosto de 2007, 2007).

Por via disso, deve-se verificar ausência de contaminação fecal por 100 mL de água, ou seja, o valor paramétrico para as bactérias coliformes por 100 mL deve ser equivalente a zero. Para além disso, tal como se mostra previsto na nota n.º 13 do Anexo I ao Dec. Lei n.º 152/2017, de 7 de dezembro, não é desejável que o número de colónias por mL a 22 °C e a 36 °C seja superior a 100 e 20, respetivamente. Não obstante, prevê ainda a nota n.º 15 do referido diploma legal que a concentração de desinfetante residual na água da torneira do consumidor se deva situar entre 0,2 e 0,6 $mg.L^{-1}$ de cloro residual livre ou 0,1 e 0,4 $mg.L^{-1}$ de dióxido de cloro (ClO_2), sendo que, segundo a nota n.º 16, o valor deve ser tão baixo quanto possível sem comprometer a eficácia da desinfeção e deve apenas ser controlado quando é utilizado o dióxido de cloro (ClO_2) no processo de tratamento da água (Diário Da República, 1.ª Série — N.º 235 — 7 de Dezembro de 2017, 2017).

2.3.1 Processos de desinfeção da água nos sistemas de abastecimento

O controlo do desenvolvimento dos microrganismos na água para consumo humano ou industrial pode ser efetuado por processos de esterilização e desinfeção. Por esterilização entende-se a completa remoção/destruição de todas as formas de vida (células vegetativas e formas de dormência), quer patogénicas, quer não patogénicas. Por outro lado, a desinfeção, não implica, necessariamente, a remoção/destruição de todas as formas vivas (Ferreira *et al*., 2010).

Vários fatores, tais como, a concentração da população microbiana, a temperatura, o período do contacto com os microrganismos, a natureza do material a descontaminar (presença de material orgânico, pH, viscosidade, etc.) e as características dos microrganismos presentes, condicionam a eficácia dos agentes utilizados na esterilização ou desinfeção (Ferreira *et al*., 2010).

De um modo geral, na presença da maioria dos desinfetantes/esterilizantes, verifica-se inicialmente uma ação nas estruturas periféricas dos microrganismos. No caso da estrutura da parede celular das bactérias Gram positivas, estas não apresentam uma membrana externa, mas sim uma única camada espessa de peptidoglicano justaposta à membrana citoplasmática. Assim, na maioria dos casos, esta parede celular é permeável a macromoléculas, permitindo a fácil difusão de determinados agentes de desinfeção (Ferreira *et al*., 2010).

Por outro lado, no caso das bactérias Gram negativas, a parede celular é bastante mais complexa quanto à composição química e quanto à sua estrutura. Desta forma, apresenta uma camada de peptidoglicano mais fina justaposta à membrana citoplasmática e, também, uma membrana externa onde é possível encontrar lipopolissacarídeos, lipoproteínas e porinas, que auxiliam na resistência mecânica do invólucro das bactérias Gram negativas, uma vez que cooperam com o peptidoglicano. Assim, ao contrário do caso anterior, a parede celular das Gram negativas compõe uma barreira à penetração de compostos, sejam hidrofóbicos ou hidrófilos (Ferreira *et al*., 2010). Portanto, as bactérias Gram negativas são relativamente menos vulneráveis a agentes desinfetantes do que as bactérias Gram positivas, uma vez que a sua parede celular representa uma barreira maior à entrada de agentes externos (Ribeiro *et al*., 2019).

Os sistemas de abastecimento de água de uma unidade de produção de tintas representam um papel bastante preocupante, no que diz respeito a fenómenos de contaminação. Nesse sentido, a empresa apresenta vários sistemas de desinfeção de água, cujo esquema da instalação se encontra, detalhadamente, explicado no capítulo Materiais e Métodos, de forma a evitar o crescimento microbiológico na água necessária para a produção de tintas decorativas. A partir do subcapítulo 2.4 pretende-se fazer um estudo mais pormenorizado nos processos de desinfeção com adição de cloro e com recurso a radiação ultravioleta (UV), uma vez que são os processos adotados, atualmente, na empresa Barbot.

Biofilmes na rede de abastecimento de água

A colonização de uma superfície por bactérias é considerado um processo dinâmico, desde a primeira adesão superficial de uma célula bacteriana, com posterior formação de microcolónias, até à formação de macrocolónias, que constituem um biofilme maduro (Yao & Habimana, 2019). Na fase final, o biofilme atinge um estado pseudo-estável, onde o crescimento e a separação das células atinge um equilíbrio (Li *et al*., 2017). *Biofouling* é o termo usado para definir as camadas biológicas não desejáveis que se aderem nas superfícies (Zea *et al*., 2020).

Os biofilmes são constituídos por microrganismos embebidos em matrizes poliméricas produzidas/secretadas por eles próprios, designadas por substâncias poliméricas extracelulares (EPSs). Estas matrizes poliméricas, que são constituídas principalmente por polissacarídeos, proteínas, glicoproteínas, glicolípidos e ácidos nucleicos, funcionam como uma barreira protetora de difusão e uma base de nutrientes para proteger e facilitar o crescimento bacteriano. Com a formação de biofilmes, os microrganismos encontram-se protegidos em situações de *stress*, tais como, por exemplo, *stress* mecânico, exposição a biocidas químicos ou exposição a radiação UV (Ribeiro *et al.*, 2019; Yao & Habimana, 2019; Zea *et al.*, 2020).

As características dos biofilmes dependem de uma multiplicidade de fatores, tais como, número e diversidade das espécies presentes na água, concentração e natureza da matéria orgânica assimilável, composição e rugosidade da superfície de suporte, grau de corrosão, pH, temperatura, velocidade e turbulência, existência de zonas mortas, agente desinfetante utilizado, etc. (CENERTEC, 2018; CEQA, 2009).

Assim, em diferentes indústrias e mesmo em diferentes áreas da mesma, a natureza dos microrganismos presentes nos biofilmes pode variar, embora a população microbiana possa ser constituída por bactérias, fungos, algas, leveduras e até protozoários. Em ambientes industriais surgem bactérias de crescimento rápido, como *Pseudomonas, Aerobacter, Alcaligenes, Proteus, Arthrobacter, Bacillus* e outros. Os fungos presentes nos biofilmes são, geralmente, *Aspergillus, Cephalosporium* e *Penicillium* (CENERTEC, 2018).

2.3.2 Controlo da incrustação biológica

A tendência atual é a utilização de biocidas como resposta à presença de biofilmes (Zea *et al*., 2020). No entanto, os biofilmes possuem mecanismos de resistência à ação dos biocidas, uma vez que condicionam a sua difusão para o seu interior. Desta forma, admite-se que a resistência ao biocida é 100 vezes superior quando o microrganismo não está em suspensão, mas sim protegido por um biofilme (Li *et al*., 2017; Ribeiro *et al*., 2019). Por isso, os biofilmes apresentam-se naturalmente mais bem preparados que os microrganismos em suspensão para sobreviver a tensões provocadas pelo meio externo, tais como, temperaturas extremas, pH ou poluição (Yao & Habimana, 2019).

Além dos fatores ambientais, a resistência de um microrganismo ao biocida pode ser intrínseca, ou seja, uma propriedade natural do microrganismo, ou pode ser uma resistência adquirida por mutação pontual ou aquisição de DNA exógeno (Ribeiro *et al*., 2019). Desta forma, os biocidas devem então ser, periodicamente, substituídos por outros que atuem por um mecanismo diferente (CENERTEC, 2018).

2.4 Cloro livre e cloro combinado

O uso de cloro na desinfeção de sistemas de distribuição de água, para consumo humano ou industrial, começou desde o começo do século passado e, ainda hoje, é um dos métodos de desinfeção mais utilizados em todo o mundo (Wang *et al*., 2019).

As suas diversas vantagens, tais como, a elevada capacidade de desinfeção (controlo microbiano devido à sua eficácia contra diversas espécies de microrganismos, com consequente controlo do *biofouling*), controlo de sabor, odor e eliminação de micropoluentes (através da oxidação das moléculas presentes na água), e o baixo investimento/custo de operação contribuem para o facto do cloro ser o oxidante químico mais utilizado na desinfeção de sistemas de distribuição de água (Deborde & Gunten, 2008; Padhi *et al*., 2019; Wang *et al*., 2019). Para além disso, ao contrário de outros métodos de desinfeção utilizados em águas para consumo humano e industrial, este método mostra-se vantajoso, pelo facto de possibilitar uma determinada concentração residual de cloro, prevenindo uma possível recontaminação nos sistemas de distribuição de água mais longos (Padhi *et al*., 2019; Ray & Jain, 2014).

No entanto, através dos diversos estudos efetuados ao longo dos últimos anos, averiguou-se que algumas espécies de microrganismos, mesmo depois de se efetuar uma desinfeção com grandes concentrações de cloro, conseguem sobreviver nos sistemas de distribuição de água, evidenciando resistência ao referido processo de desinfeção (Wang *et al*., 2019). Adicionalmente, sob determinadas circunstâncias, este oxidante pode induzir a formação de subprodutos da desinfeção prejudiciais (DBPs) ou até mesmo a transformação de produtos, devido à sua reatividade com os componentes da água ou micropoluentes, como será explicado posteriormente (Deborde & Gunten, 2008). Assim, a porção de cloro consumida pelos constituintes químicos e biológicos presentes nas águas, pode prejudicar a garantia de uma concentração de cloro residual adequada e uniforme ao longo do tempo. Em suma, as propriedades físico-químicas da água, como a temperatura, o pH e a matéria orgânica, por exemplo, têm um impacto bastante importante na concentração necessária de cloro (Padhi *et al*., 2019).

Atualmente, são diversos os produtos à base de cloro eficazes no processo de desinfeção, disponíveis no mercado, tais como: cloro gasoso (Cl_2), solução de hipoclorito (por exemplo, hipoclorito de sódio – NaOCl - ou hipoclorito de cálcio – $Ca(OCl)_2$), dióxido de cloro (ClO_2) e outros compostos de cloro na forma líquida ou sólida (CEQA, 2009; Deborde & Gunten, 2008; Ersoy *et al*., 2019). O hipoclorito de sódio (NaOCl), que é bastante eficaz no processo de desinfeção contra diversos microrganismos, pode ser fornecido na forma líquida, que contém aproximadamente 13% de cloro ativo. O hipoclorito de cálcio ($Ca(OCl)_2$), pode ser fornecido na forma de granulado ou em pequenas tabletes que contêm aproximadamente 65% de cloro ativo (CEQA, 2009). O gás dióxido de cloro (ClO_2), que inclui oxigénio e cloro como agentes oxidantes, é altamente eficaz contra bactérias,

vírus, fungos e, por vezes, até esporos (Ersoy *et al*., 2019). O cloro gasoso (Cl_2) é o composto desinfetante mais comum no tratamento de água devido ao seu baixo custo e durabilidade (Liu *et al*., 2019).

De uma forma geral, o espetro de ação do cloro e das espécies formadas através da adição de cloro ao meio aquoso inclui as bactérias, vírus e fungos (Ding *et al*., 2019; Ferreira *et al*., 2010).

2.4.1 Reações no processo de cloração

Nesta secção apresentam-se as reações que ocorrem num processo de cloração com cloro gasoso (Cl_2), hipoclorito de sódio (NaOCl), hipoclorito de cálcio ($Ca(OCl)_2$) e dióxido de cloro (ClO_2).

O cloro gasoso (Cl_2) hidrolisa na água de acordo com a reação [1]. O ácido hipocloroso (HOCl), resultante da reação [1], é um ácido fraco (pK_{HOCl} = 7,5 a 25 ºC (Wang *et al*., 2019)) que se dissocia em solução aquosa, tal como se pode verificar na reação [2]. Importa referir que a sua dissociação rápida no ião hipoclorito (OCl^-) depende do pH da água (Deborde & Gunten, 2008).

$$Cl_2 + H_20 \rightarrow HOCl + H^+ + Cl^- \quad \textbf{[1]}$$

$$HOCl \rightarrow H^+ + OCl^- \quad \textbf{[2]}$$

Desta forma, o ácido hipocloroso (HOCl) e o ião hipoclorito (OCl^-) são as principais espécies de cloro livre presentes numa água com um pH entre 6 e 9 (Wang *et al*., 2019). Como se pode verificar na Figura 5, estas espécies de cloro livre distribuem-se de forma diferente, dependendo da temperatura e do pH da água (Deborde & Gunten, 2008; Ferreira *et al*., 2010). Em geral, Meyer (1994) admite que a reatividade do cloro diminui com o aumento do pH e a velocidade da reação aumenta com o aumento da temperatura.

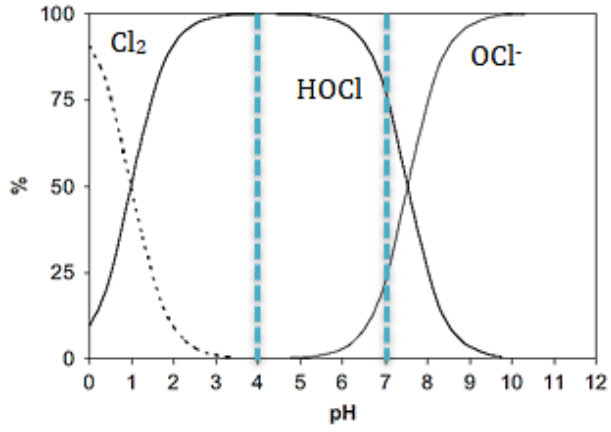


Figura 5 - Distribuição relativa na água das principais espécies de cloro (Cl_2, HOCl, OCl^-), em função do pH, a 25 ºC, na presença de 5×10^{-3} M de cloro [adaptado de (Deborde & Gunten, 2008)].

Através da análise da Figura 5 é possível assumir que a concentração de cada uma das espécies varia de forma não linear de acordo com o pH e, nestas condições, é evidente que a hidrólise do cloro gasoso (Cl_2) é mais completa com o pH superior a 4 (Deborde & Gunten, 2008; Wang *et al*., 2019).

Assim, a pH 5,8, o ácido hipocloroso (HClO) corresponde a 98,2% do cloro livre, a pH 7,4, o HClO corresponde a 57,2% do cloro livre e a pH 8,4, o HClO corresponde a 17,5% do cloro livre. Geralmente, o ácido hipocloroso (HClO) tem um maior poder bactericida do que o ião hipoclorito (OCl^-) (Wang *et al*., 2019). Por isso, a ação do biocida é ótima para pH entre 4 a 7 e decresce quando a solução se encontra alcalina, uma vez que, se verifica a dissociação de ácido hipocloroso (HOCl) com maior produção de ião hipoclorito (OCl^-) (Ferreira *et al*., 2010).

Durante o processo de cloração em águas que contêm espécies de amónia (NH_3 e NH_4^+), o ácido hipocloroso (HOCl) reage com o NH_3, uma vez que a reatividade do cloro com o NH_4^+ é praticamente insignificante. Desta forma, esta oxidação resulta em reações sucessivas que induzem a formação de cloraminas (monocloraminas (NH_2Cl), dicloraminas ($NHCl_2$) e tricloraminas (NCl_3)), tal como se pode verificar nas reações [3], [4] e [5] (Deborde & Gunten, 2008). As cloraminas são menos reativas que o cloro livre (Ackerson *et al*., 2018). A formação dos três tipos de cloraminas, cujo poder desinfetante varia entre si (dicloraminas > monocloraminas), depende da relação cloro/azoto, do pH, da temperatura e do tempo de reação (Meyer, 1994).

$$NH_3 + HOCl \rightarrow NH_2Cl + H_20 \quad \textbf{[3]}$$

$$NH_2Cl + HOCl \rightarrow NHCl_2 + H_20 \quad \textbf{[4]}$$

$$NHCl_2 + HOCl \rightarrow NCl_3 + H_20 \quad \textbf{[5]}$$

Em contraste com o cloro livre (Cl_2, HOCl, OCl^-), as cloraminas (NH_2Cl, $NHCl_2$, NCl_3) representam o cloro combinado (Deborde & Gunten, 2008). O cloro combinado tem propriedades oxidativas, tal como o cloro livre. Portanto, durante o processo de cloração, na presença de NH_3, a formação de cloraminas é importante para otimizar a desinfeção e minimizar a formação indesejada de subprodutos da desinfeção (DBPs) (Deborde & Gunten, 2008). No entanto, o cloro combinado tem uma ação antimicrobiana mais baixa do que o cloro livre (Jo *et al*., 2018).

As cloraminas têm sido utilizadas como desinfetante primário quando a cloração de determinada água contém altas concentrações de matéria orgânica ou outros precursores que provoquem a excessiva formação de subprodutos da desinfeção (DBPs) (Ackerson *et al*., 2018). Por outro lado, há um aumento do interesse da utilização de cloraminas como desinfetante secundário para manter uma concentração residual de desinfetante nos sistemas de distribuição de águas (Hua & Reckhow, 2007). Desta forma, muitas vezes, o cloro livre é utilizado nos primeiros passos de tratamento da água, antes da adição da amónia. Depois, quando a água está disponível para ser encaminhada para o restante sistema de distribuição, adiciona-se amónia pura para converter o resíduo de cloro livre em cloraminas, prevenindo assim a recontaminação das águas (Ackerson *et al*., 2018). Sem este ajuste final, o cloro livre continuaria a produzir compostos prejudiciais, tais como os trihalometanos (THMs), e o sistema de distribuição de água ficaria sem ação desinfetante ao fim de algumas horas de tratamento.

No caso de o cloro ser aplicado sob as formas de hipoclorito de sódio (NaOCl) e hipoclorito de cálcio ($Ca(OCl)_2$), em contacto com a água estes compostos ionizam-se, como evidenciam as reações [6] e [7], respetivamente (Meyer, 1994).

$$NaOCl + H_20 \rightarrow Na^+ + OCl^- + H_20 \quad \textbf{[6]}$$

$$Ca(OCl)_2 + H_20 \rightarrow Ca^{2+} + 2\ OCl^- + H_20 \quad \textbf{[7]}$$

No caso da utilização de dióxido de cloro (ClO_2) no processo de desinfeção da água, sendo este um poderoso desinfetante com um amplo espetro de ação, verifica-se a formação de clorito (ClO_2^-) e clorato (ClO_3^-) como principais subprodutos, constituindo, aproximadamente, 70% dos subprodutos totais (Ofori *et al*., 2018). Em solução aquosa, podem surgir as reações [8] e [9] (Ofori *et al*., 2018):

$$ClO_2 + e^- \rightarrow ClO_2^- \quad \textbf{[8]}$$

$$2ClO_2 + 2OH^- \rightarrow ClO_2^- + ClO_3^- + H_2O \quad \textbf{[9]}$$

O dióxido de cloro (ClO_2) não hidrolisa em solução aquosa, mas permanece como um gás dissolvido não dissociado com, aproximadamente, a mesma reatividade entre pH de 2 e 10. As maiores vantagens do uso de dióxido de cloro (ClO_2) na desinfeção de sistemas de tratamento de águas incluem a sua ampla eficácia numa alargada gama de pH, a sua estabilidade mesmo na presença de matéria orgânica, a menor formação de subprodutos da desinfeção (DBPs) e a sua eficácia mesmo com baixas concentrações de desinfetante (He *et al*., 2019; Ofori *et al*., 2018; Zea *et al*., 2020). Uma vez que o gás ClO_2 pode ser explosivo, devem ser consideradas as devidas precauções de segurança ao aplicar o dióxido de cloro (ClO_2) no controle microbiano de águas (Zea *et al*., 2020).

2.4.2 Mecanismo da desinfeção

Existem dois passos distintos de desinfeção com cloro: o pré-tratamento (para induzir uma desinfeção primária no início do processo de tratamento) e o pós-tratamento (para garantir uma determinada concentração residual de desinfetante no sistema de distribuição de água). Apesar da baixa atividade em microrganismos na presença de biofilmes, pelos motivos já explicados no subcapítulo 2.3.2, sabe-se que o cloro consegue garantir elevados níveis de desinfeção na água. Quando adicionado no final do processo de tratamento, ou seja, antes da água ser encaminhada para o sistema de distribuição (pós-tratamento), o cloro limita o crescimento de microrganismos heterotróficos (Deborde & Gunten, 2008).

De uma forma geral, a inativação dos microrganismos, através da utilização dos desinfetantes anteriormente mencionados, verifica-se através da disrupção da integridade da membrana celular, desequilíbrio da concentração de iões e, ainda, através de danos nos materiais celulares, tais como DNA, proteínas e moléculas lipídicas, provocando a morte celular (Ersoy *et al*., 2019; Liu *et al*., 2019).

As diferenças na eficácia de inativação relacionam-se com a espécie de cloro livre com maior poder bactericida presente em solução aquosa e com a carga da superfície bacteriana. No caso do ácido hipocloroso (HOCl), que é uma molécula neutra resultante da hidrólise de cloro gasoso na água, este consegue rapidamente entrar na superfície das células bacterianas carregadas negativamente e causar a desnaturação da suas proteínas intracelulares (Wang *et al*., 2019). O ácido hipocloroso (HOCl) apresenta uma eficácia de desinfeção superior, em relação a outras espécies de cloro, devido à sua forte capacidade de oxidação, ao tamanho pequeno da sua molécula e neutralidade elétrica, permitindo uma rápida penetração nas células (Meyer, 1994). Por outro lado, quando o valor de pH aumenta de 5,8 para 8,4, a proporção de ião hipoclorito (OCl^-) no cloro livre aumenta e a carga negativa na superfície das bactérias também aumenta, o que causa a repulsão entre o cloro e as bactérias, diminuindo a eficácia do processo de desinfeção (Wang *et al*., 2019).

2.4.3 Formação de subprodutos da desinfeção

De forma semelhante ao que acontece com outros processos de desinfeção, a cloração apresenta desvantagens, apesar do seu amplo espetro de ação e de proporcionar uma melhoria da qualidade da água (Deborde & Gunten, 2008).

As diferentes formas de cloro (Cl_2, HOCl, OCl^-), inerentes ao processo de desinfeção com cloro, evidenciam diferenças na sua reatividade com os microrganismos e micropoluentes. Entre as diferentes espécies de cloro, presentes em solução aquosa, o ácido hipocloroso é a principal forma reativa durante o processo de tratamento de água, como já foi explicado anteriormente. As outras espécies estão geralmente presentes em concentrações que são tão baixas ou insuficientemente reativas para serem significantes. Sendo um oxidante químico, o cloro consegue transformar vários micropoluentes orgânicos e inorgânicos que se encontram presentes na água, tais como Fe (II), As (III), NO_2^-, pesticidas ou medicamentos (Deborde & Gunten, 2008). Assim, para a maioria das reações de cloração, verifica-se a reação elementar, presente nas reações [10], [11] e [12], onde B representa um composto orgânico ou inorgânico (Deborde & Gunten, 2008).

$$HOCl + B \rightarrow \text{Produtos} \quad \textbf{[10]}$$

$$H^+ + HOCl + B \rightarrow \text{Produtos} \quad \textbf{[11]}$$

$$Cl_2 + B \rightarrow \text{Produtos} \quad \textbf{[12]}$$

No caso de compostos inorgânicos, verifica-se uma rápida transformação de amónia, halogéneos (Br^- e I^-), SO_3^{2-}, CN^-, NO_2^-, As (III) e Fe (II) pelo ácido hipocloroso. A reatividade do cloro, usualmente, resulta de um ataque eletrofílico inicial do ácido hipocloroso com os compostos inorgânicos (Deborde & Gunten, 2008).

Relativamente à reação do cloro com compostos orgânicos, são reportadas na literatura reações de oxidação, adição e substituição eletrofílica do cloro com os compostos orgânicos. As

reações de oxidação e adição são lentas e apenas os ataques eletrofílicos são, suficientemente, rápidos para serem significativos. Consequentemente, o cloro é altamente seletivo em relação aos compostos orgânicos e a sua reatividade é limitada a locais específicos (como grupos funcionais de amina e enxofre e sistemas aromáticos ativos) (Deborde & Gunten, 2008).

O cloro interage com a matéria orgânica dissolvida, originando subprodutos da desinfeção (DBPs), entre os quais se destacam os trihalometanos (THMs) e os ácidos haloacéticos (HAAs), que podem representar um risco para a saúde humana (compostos poluentes e cancerígenos) (Chen *et al*., 2020; Deborde & Gunten, 2008). Atualmente, entre os subprodutos da desinfeção identificados, os compostos de iodo e de bromo são os mais tóxicos (Deborde & Gunten, 2008). A formação de subprodutos da desinfeção (DBPs) depende de vários fatores, incluindo temperatura, pH, tempo de contato, cloro residual e matéria orgânica. Os trihalometanos (THMs) são considerados os compostos mais dominantes no processo de cloração (Padhi *et al*., 2019). Assim, quanto maior for a dosagem de cloro, maior será a probabilidade de formação dos trihalometanos (THMs), sendo que o cloro combinado tem menor poder de formação de trihalometanos (THMs) do que o cloro livre (Meyer, 1994).

Na Figura 6 estão presentes alguns exemplos de trihalometanos (THMs), que são compostos formados por um átomo de carbono, um de hidrogénio e três de halogénio (cloro, bromo, iodo), tais como o triclorometano ($CHCl_3$), mais conhecido por clorofórmio, e o bromodiclorometano ($CHBrCl_2$) (Padhi *et al*., 2019).



Figura 6 - Exemplos de trihalometanos (THMs): (1) triclorometano (clorofórmio) e (2) bromodiclorometano (ChemDraw®, adaptado de PubChem).

Assim sendo, quando o agente desinfetante é um oxidante, a presença de material orgânico e outros compostos oxidáveis irá consumir grande parte da quantidade de desinfetante necessária para eliminar/inativar os organismos, diminuindo a eficácia do processo de desinfeção (Jo *et al*., 2018). Esta desvantagem, assim como o aparecimento de microrganismos resistentes ao cloro, tem contribuído para o facto de se procurar, cada vez mais, alternativas para a desinfeção de reservatórios de abastecimento de água (Chen *et al*., 2020; Ding *et al*., 2019). Não seria aconselhado o recurso a doses superiores de cloro, no sentido de evitar o aparecimento de microrganismos resistentes ao cloro, uma vez que, isso aumentaria a formação de subprodutos da desinfeção indesejados (DBPs) (Dimapilis *et al*., 2018).

2.5 Radiação ultravioleta (UV)

Em 2000, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a desinfeção com recurso a radiação ultravioleta (UV) como um método efetivo, que consegue inativar a replicação de organismos patogénicos e deteriorar os microrganismos, seja em comida, água ou até bebidas (Li *et al*., 2019). Assim sendo, nos últimos anos, começou a ser utilizada a radiação UV no âmbito dos processos de desinfeção dos sistemas de abastecimento de água (Chen *et al*., 2020; Li *et al*., 2019; Yang *et al*., 2020; Zou *et al*., 2019).

A desinfeção por radiação UV é muito mais conveniente e segura, apresenta uma eficácia contra um amplo espetro de microrganismos e, para além disso, não produz subprodutos da desinfeção (DBPs), ao contrário da cloração abordada anteriormente (Chen *et al*., 2020; Li *et al*., 2019; Yang *et al*., 2020; Zou *et al*., 2019). Adicionalmente, não apresenta efeito residual capaz de prejudicar os seres humanos, meio ambiente ou vida aquática, não altera o pH/odor/sabor ou qualquer propriedade físico-química da água, é um processo de tratamento imediato (não necessita de tanques de acumulação ou longos períodos de retenção) e, também, apresenta simplicidade/facilidade de operação e manutenção (Alquímica, n.d.; Ray & Jain, 2014). Desta forma, este método tem sido bastante utilizado para substituir os aditivos químicos na desinfeção de sistemas de abastecimento de água, uma vez que é eficaz contra microrganismos resistentes ao cloro (Chen *et al*., 2020; Li *et al*., 2019; Yang *et al*., 2020; Zou *et al*., 2019).

No entanto, este método também apresenta desvantagens, uma vez que, depende de uma fonte de energia constante e, também, não protege o sistema de distribuição de água de uma possível recontaminação, porque não garante qualquer poder de desinfeção residual após o tratamento (Dimapilis *et al*., 2018; Ray & Jain, 2014). Para além disso, este é um método de desinfeção afetado por parâmetros da qualidade da água, tais como, a turbidez, a coloração e a concentração/tamanho dos sólidos suspensos na água (Zhou *et al*., 2016).

A radiação não ionizante, ultravioleta, compreende a radiação UVC (200 nm < λ < 280 nm), UVB (280 nm < λ < 315 nm) e UVA (315 nm < λ < 400 nm) (Li *et al*., 2019). A ação microbicida das radiações UV, compreendida entre 200 nm e 280 nm, é devida à sua absorção por diferentes componentes celulares, sendo os alvos principais os ácidos nucleicos (Ferreira *et al*., 2010). A radiação UV que tem maior ação germicida letal para bactérias, vírus, fungos, algas e leveduras, tem λ a rondar os 254 nm, porque é a mais efetivamente absorvida pelo DNA (Ferreira *et al*., 2010).

Apesar da máxima absorção UV pelo DNA dos microrganismos rondar os 254 nm, o λ do pico de absorção apresenta-se dependente do organismo alvo. Desta forma, existem diferentes sensibilidades à radiação UV que dependem do material genético dos microrganismos. Apenas a exploração de cada uma das espécies determinaria o λ ótimo de desinfeção para cada uma das

espécies. Para além disso, os fatores que influenciam os rendimentos de inativação são a densidade bacteriana, o pH, o tempo de exposição à radiação UV e o *λ* (Li *et al*., 2019).

A radiação UV pode ser gerada, convencionalmente, por lâmpadas de mercúrio, que incluem as lâmpadas de mercúrio de baixa pressão (LP) pois emitem numa região monocromática (254 nm) e as lâmpadas de mercúrio de média pressão (MP) pois emitem num espetro policromático, com vários *λ* (Li *et al*., 2019; Yang *et al*., 2020). De acordo com estas fontes de UV tradicionais, o vidro confere-lhes alguma fragilidade (Li *et al*., 2019) e diversos problemas ambientais podem surgir caso estas não sejam descartadas corretamente, uma vez que as lâmpadas UV contêm mercúrio tóxico (Li *et al*., 2019; Zou *et al*., 2019). Para além disso, a eficiência das lâmpadas é limitada (normalmente, inferior a 35%) e a sua duração é reduzida (cerca de 10 000 horas) (Zou *et al*., 2019).

Desta forma, Zou *et al*. (2019) e Li *et al* (2019) admitem que os díodos de luz UV-LEDs constituem uma solução "*friendly*" para os problemas abordados, anteriormente, uma vez que não incluem mercúrio, apresentam um menor consumo energético, uma funcionalidade "on/off" e uma maior durabilidade. De facto, Song *et al*. (2016), citado por Zou *et al*. (2019), estimam que os díodos de luz UV-LEDs alcancem as 100 000 horas, num futuro próximo. Para além disso, quando se pretende utilizar radiação pulsada, Zou *et al*. (2019) garante que os díodos de luz UV-LED são uma alternativa interessante, uma vez que estes podem ser ligados e desligados, com uma frequência alta e ajustável. A maioria das aplicações de UV-LEDs como método de desinfeção estão ainda na fase de pesquisa e desenvolvimento (I&D). No entanto, a utilização de UV-LEDs na desinfeção de sistemas de abastecimento de água tem sido alvo de atenção, uma vez que os estudos mais recentes evidenciam a necessidade de, no futuro, promover a padronização e normalização deste método (Li *et al*., 2019).

2.5.1 Mecanismo da desinfeção

Tal como se pode visualizar na Figura 7, as lesões mais comuns nos ácidos nucleicos, induzidas pela radiação UV, são os ciclobutanos de pirimidina (CPDs) e os fotoprodutos (6-4)-pirimidina-pirimidona [(6-4)PPs] (Chen *et al*., 2020; Li *et al*., 2019; Santos, 2010). A presença destas lesões é responsável por danos na estrutura de DNA que, inevitavelmente, interferem com os mecanismos e viabilidade das células. Desta forma, a normal replicação e transcrição do DNA fica inibida, resultando na inativação dos microrganismos (Nyangaresi *et al*., 2018).

A formação de ciclobutanos de pirimidina (CPDs) ocorre quando bases pirimidínicas (citosina, timina, uracilo) adjacentes absorvem a energia da radiação UV, formando um anel ciclobutano, através da ligação covalente entre os átomos de carbono C5 e C6 de ambas as bases nitrogenadas. No caso dos fotoprodutos (6-4)-pirimidina-pirimidona [(6-4)PPs] também se verifica uma ligação covalente entre pirimidinas da mesma hélice, envolvendo os carbonos C6 e C4 das pirimidinas 5' e 3', respetivamente (Santos, 2010; Zea *et al*., 2020).

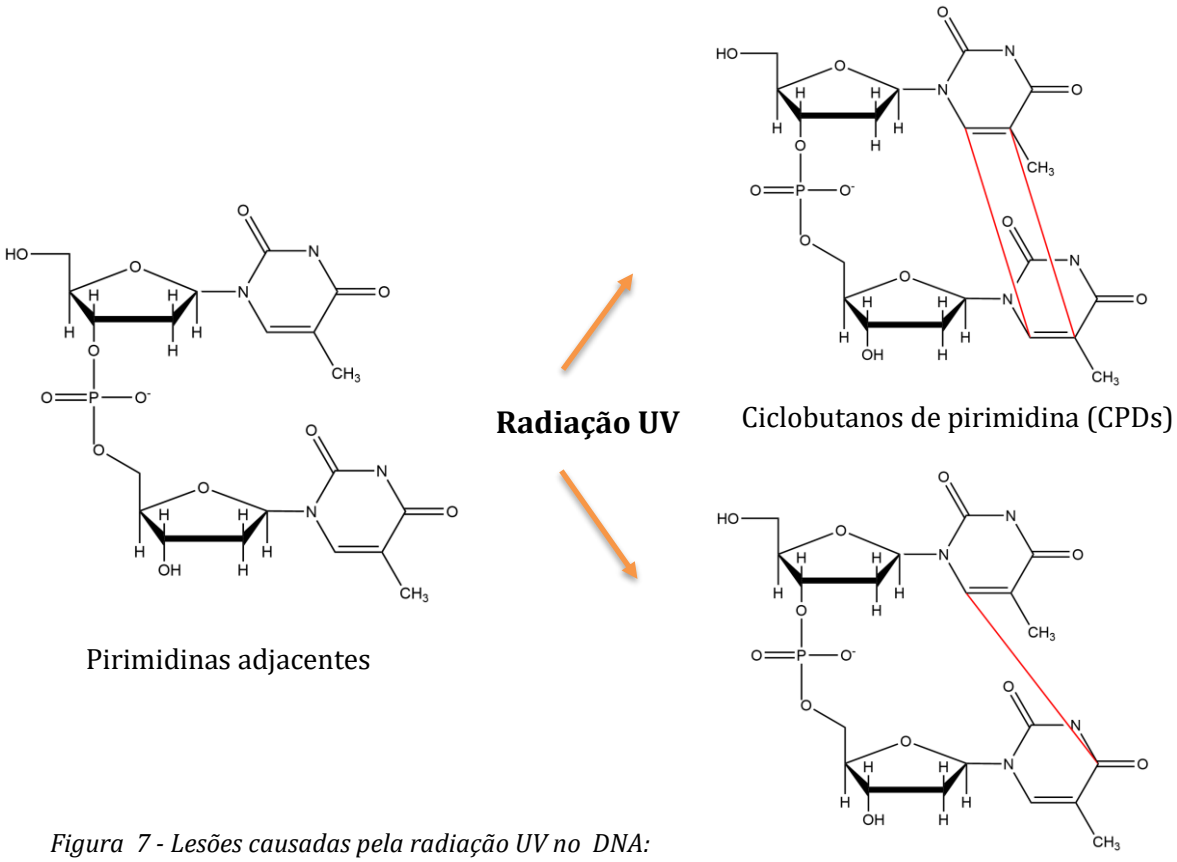


Figura 7 - Lesões causadas pela radiação UV no DNA: formação de CPDs e de 6-4PPs [ChemDraw®, adaptado de (Li et al., 2019; Santos, 2010)].

A desinfeção com radiação UV para além das lesões que provoca no DNA, afeta também as membranas e outros materiais celulares presentes nos microrganismos (Chen *et al*., 2020; Liu *et al*., 2019; Zea *et al*., 2020). Tendo em conta a estrutura e composição química das bactérias Gram positivas, explicada anteriormente no subcapítulo 2.3.1, Chen *et al*. (2020) afirma que o peptidoglicano, como camada mais externa, é a camada primeiramente exposta a fotões de alta energia e, portanto, deformada. Relativamente às bactérias Gram negativas, que apresentam uma estrutura completamente diferente, quando expostas à mesma radiação UV, sofrem danos, principalmente, nas regiões dos lipopolissacarídeos, sendo neste caso a camada de peptidoglicano menos afetada pela exposição UV. Assim sendo, as bactérias Gram negativas apresentam algumas vantagens em comparação com as bactérias Gram positivas, porque conseguem, após exposição UV, manter a sua forma e morfologia (Chen *et al*., 2020).

2.5.2 Cinética da desinfeção com radiação UV

A inativação microbiana depende, principalmente, da dose UV efetiva. Assim, a energia radiante absorvida pelo microrganismo é denominada por dose UV efetiva ou germicida. Na equação 13 está presente a fórmula para calcular a dose UV efetiva. Assim, a intensidade da radiação UV é expressa em fluxo ($W.m^{-2}$) e a dose UV é expressa em exposição radiante ($J.m^{-2}$) (Ray & Jain, 2014).

$$Dose\ UV\ efetiva\ (\mathrm{J}.m^{-2}) = Intensidade\ da\ radiação\ (\mathrm{W}.m^{-2}) \times Tempo\ de\ exposição\ (s) \quad \textbf{[13]}$$

A relação linear entre a dose UV aplicada e o logaritmo da inativação é utilizada para descrever o modelo de desinfeção com UV. Na equação 14 evidencia-se a fórmula do Modelo de Primeira - Ordem de *Chick-Watson* (Li *et al*., 2019).

$$\mathrm{Log}\ (N_0/N) = k \times dose\ UV \quad \textbf{[14]}$$

Onde N_0 e N corresponde ao número de unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/mL), antes e após exposição UV, respetivamente; k corresponde à taxa de inativação ($cm^2.mJ^{-1}$); e, por fim, a *dose UV* corresponde à intensidade da radiação a um determinado λ ($mJ.cm^{-2}$) (Li *et al*., 2019).

2.5.3 Mecanismos de reparação

Alguns microrganismos possuem mecanismos de resistência que permitem a reparação dos danos sofridos, após exposição UV (Chen *et al*., 2020; Ferreira *et al*., 2010; Matoh *et al*., 2019). Importa referir que este fenómeno é mais frequente na presença de baixas doses de UV (Li *et al*., 2019).

Fotoreativação é um processo onde os microrganismos absorvem a luz a 310 nm – 480 nm para ativar as fotoenzimas, que são as enzimas responsáveis pela separação dos dímeros de ciclobutanos de pirimidina (CPDs) e reparação do DNA. Por outro lado, a reparação no escuro, ou seja, na ausência de luz, consiste na substituição dos nucleótidos de DNA danificados por outros não danificados (Li *et al*., 2019; Nyangaresi *et al*., 2018; Ray & Jain, 2014). Contudo, apesar de alguns microrganismos possuírem estes mecanismos de reparação, o dano excessivo nos ácidos nucleicos e outros componentes celulares importantes é letal (Zea *et al*., 2020).

2.6 Combinação de radiação ultravioleta (UV) e cloro livre

Alguns estudos têm sido realizados no sentido de avaliar a combinação de dois ou mais processos de desinfeção (Liu *et al*., 2019). Como já foi referido anteriormente, a radiação UV é uma alternativa promissora ao cloro livre como desinfetante primário, devido à sua capacidade de inativar microrganismos sem originar subprodutos da desinfeção (DBPs). No entanto, devido à inexistência de poder desinfetante residual e ao possível reparo de microrganismos danificados por UV, este processo de desinfeção nem sempre pode ser utilizado de forma isolada (Wang *et al*., 2012).

Assim, a utilização de radiação UV como desinfetante primário pode diminuir, significativamente, as doses químicas efetivas e fornecer recursos adicionais de desinfeção. Posteriormente, a sua combinação com o cloro ou cloraminas, como desinfetante secundário, evidencia em diversos estudos uma desinfeção sinergética, impedindo o crescimento microbiano

(Wang *et al*., 2012). Em suma, a radiação UV é utilizada como primeiro modo de desinfeção e, posteriormente, é combinada com o cloro, para garantir um concentração residual de desinfetante, ou seja, uma desinfeção prolongada no tempo (Liu *et al*., 2019).

Liu *et al*. (2019) realizou um estudo onde simulou e estudou a desinfeção de sistemas de distribuição de água para consumo, recorrendo a dois modos de desinfeção: UV e Cl_2. Deste modo, realizou uma experiência com recurso a Cl_2 (controlo) e outra experiência com recurso a um sequenciação de dois modos distintos de desinfeção, isto é, UV/Cl_2. O objetivo foi comparar o efeito da combinação UV/Cl_2 nos organismos patogénicos, distribuídos por quatro fases distintas: água, biofilmes, produtos de corrosão e depósitos soltos (Liu *et al*., 2019).

Os resultados obtidos por Liu *et al*. (2019) evidenciam que, comparando com o controlo (Cl_2), o efeito sinergético entre o UV e o Cl_2 é mais eficiente na redução do número de organismos patogénicos no efluente do sistema de distribuição de água, com a mesma concentração residual de cloro. Por outro lado, como já foi abordado, anteriormente, os biofilmes, os produtos de corrosão e os depósitos são zonas chave para o crescimento microbiano de organismos patogénicos em sistemas de distribuição de água. Após o estudo, Liu *et al*. (2019) verificou que os organismos patogénicos que colonizam estas três fases são similares, sendo que estes organismos patogénicos evidenciam tolerância à desinfeção, tanto com a utilização de Cl_2, como com a utilização de UV/Cl_2.

O estudo efetuado por Liu *et al*. (2019) é bastante relevante para a empresa onde esta Dissertação de Mestrado se insere, uma vez que, a Barbot, situada em Canelas, também optou pela combinação de dois processos de desinfeção de água: cloração e radiação UV.

2.7 Objetivos da Dissertação de Mestrado

Esta Dissertação, desenvolvida em ambiente empresarial com a colaboração das instalações/equipamentos disponíveis no LEPABE (FEUP), teve como objetivo a análise da microbiota da água (enumerando e identificando os heterotróficos totais) em diferentes pontos da rede de abastecimento da unidade de produção de tintas, de forma a avaliar a eficácia dos sistemas de desinfeção de água existentes na Barbot: cloração e radiação UV.

3 Materiais e Métodos

3.1 Instalação experimental:

A Figura 8 esquematiza o sistema de abastecimento de água da unidade de produção de tintas na Barbot, com a respetiva indicação dos sistemas de desinfeção de água existentes na empresa.

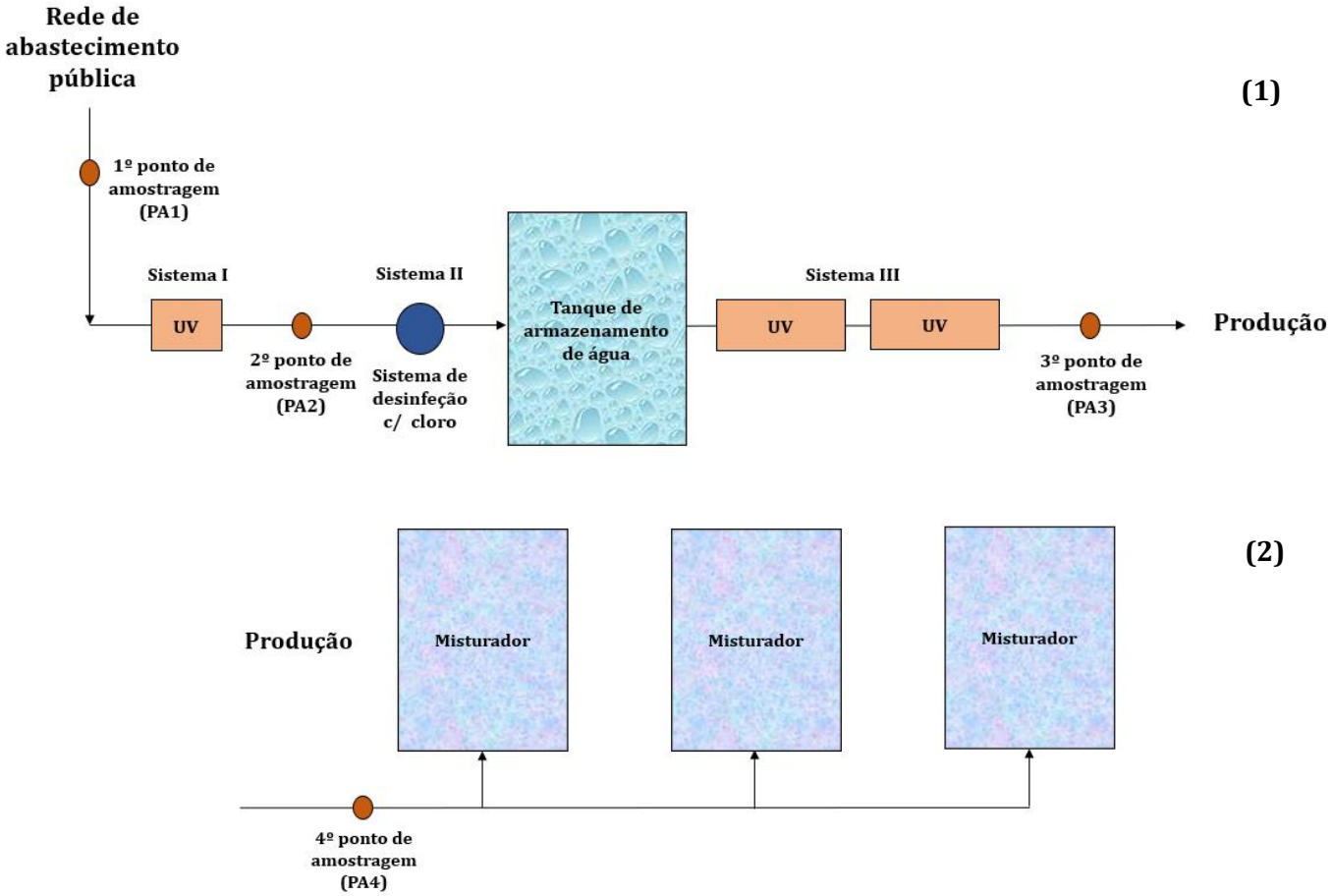


Figura 8 - Instalação do sistema de abastecimento de água à unidade de produção de tintas (1) no exterior da fábrica onde se localiza o tanque de armazenamento de água e os sistemas de desinfeção por ultravioleta e cloro; (2) no interior da fábrica (zona da produção) onde se localizam três misturadores.

A água que a Barbot utiliza é proveniente da rede de abastecimento pública – Águas de Gaia, EM, S.A.. Desta forma, o primeiro ponto de amostragem – PA1 – corresponde à água da torneira do departamento de I&D, ou seja, água proveniente da rede de abastecimento pública. A empresa possui vários sistemas de tratamento de água, no sentido de evitar o crescimento microbiológico na água utilizada para a produção de tintas decorativas. O sistema I é o primeiro destes pontos de desinfeção, sendo composto por apenas 1 lâmpada UV. O 2º ponto de amostragem – PA2 – localiza-se a jusante do sistema I (Fig. 8). Posteriormente, a empresa possui um sistema de desinfeção através de adição de cloro, denominado por sistema II, antes da água ser armazenada num tanque (Fig. 8). Após a

passagem da água pelo tanque de armazenamento, na tubagem de alimentação da água à produção, encontra-se instalado o sistema III de desinfeção com radiação UV, composto por dois conjuntos de 6 lâmpadas UV cada. O 3º ponto de amostragem – PA3 – localiza-se a jusante do sistema III (Fig. 8). Posteriormente, o 4º ponto de amostragem – PA4 – situa-se imediatamente antes das tubagens derivativas que encaminham a água, quando esta é requerida pelo comando de produção, a cada um dos misturadores (Fig. 8).

Relativamente aos sistemas I e III de desinfeção por radiação UV, compostos por elementos de funcionamento completamente automáticos, a capacidade de produção máxima de água tratada foi fixada em 2,5 $m^3.h^{-1}$ e 30 $m^3.h^{-1}$, respetivamente. A Tabela 4 evidencia as informações relativas ao funcionamento dos dois sistemas de tratamento de água com recurso a radiação UV.

Tabela 4 - Informações técnicas unitárias relativas ao funcionamento dos dois sistemas de desinfeção de água por radiação ultravioleta, na empresa em estudo (Barbot).

	Sistema I: Câmara de radiação em aço inox	**Sistema III:** Câmara de radiação em aço inox
Dimensões (comprimento × diâmetro)	930 mm × 64 mm	854 mm × 320 mm
Vida efetiva de cada lâmpada	8 000 h	8 000 h
Alimentação elétrica	230 V	230 V
Potência	45 W	245 W × 2
Número de lâmpadas de fumos de mercúrio (240 nm < λ < 280 nm)	1	6 × 2 conjuntos de lâmpadas = 12

3.2 Enumeração dos microrganismos cultiváveis

3.2.1 Procedimentos de amostragem

Com as devidas condições de assepsia e, recorrendo a frascos *Schott* de 500 mL previamente esterilizados, realizou-se a recolha da água da rede de abastecimento da empresa, em 3 dias distintos, nos 4 pontos de amostragem que se apresentam indicados na Figura 8. A amostragem foi realizada de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and WasteWater*.

A 1ª amostragem de água realizou-se a 10 de março (1º ensaio). Devido à interrupção das atividades experimentais motivada pela pandemia COVID-19, a 2ª amostragem realizou-se a 3 de julho (2º ensaio) e a 3ª amostragem realizou-se a 10 de julho (3º ensaio). Com o intuito de prosseguir com a atividade experimental e ser, ainda, possível identificar os organismos cultiváveis, não foram realizadas mais amostragens na empresa durante o período da Dissertação de Mestrado.

3.2.2 Quantificação de microrganismos heterotróficos totais

O método das membranas filtrantes é uma metodologia de referência para a pesquisa e quantificação dos microrganismos indicadores utilizados na avaliação da qualidade da água, sendo que, é principalmente utilizada na avaliação de águas de abastecimento e águas naturais de superfícies ou subterrâneas, com turvação reduzida (Ferreira *et al*., 2010).

Assim, no sentido de proceder à quantificação dos microrganismos heterotróficos totais, recorreu-se ao método das membranas filtrantes, com membranas de 0,22 μm de porosidade da Sartorius®. Para cada amostra filtraram-se volumes de água de 100 mL, 10 mL, 1 mL e 1 mL das diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}. As diluições decimais seriadas foram realizadas em solução salina estéril (0,85% NaCl, $m.v^{-1}$).

Após cada filtração, cada membrana foi colocada na superfície de meio *Plate Count Agar* (PCA) da VWR Chemicals®. As culturas incubaram a 30 °C, durante 6 dias. Os 3 ensaios foram realizados em duplicado. A contagem foi realizada nas placas que continham entre 5 e 80 UFC, tendo sido realizada a 16 de março (1º ensaio), a 9 de julho (2º ensaio) e, por fim, a 16 de julho (3º ensaio).

3.2.3 Análise estatística

Os resultados obtidos para a enumeração dos heterotróficos totais foram comparados utilizando a ferramenta de análise estatística One-Way ANOVA + Tukey's Pairwise (PAST v4.0).

3.3 Identificação dos organismos cultiváveis

3.3.1 Recolha da biomassa

Após a enumeração dos microrganismos heterotróficos totais, recolheu-se a biomassa das placas da menor diluição de cada um dos ensaios (quando não se verificou qualquer sinal de contaminação), com o auxílio de uma espátula devidamente flamejada e solução salina estéril (0,85% NaCl, $m.v^{-1}$), para tubos Eppendorf® previamente esterilizados. Salvo algumas exceções, os duplicados foram recolhidos para o mesmo tubo Eppendorf®.

A biomassa extraída para a amostra referente ao PA1 corresponde a: 2 filtrações de 100 mL do 1º ensaio + 2 filtrações de 100 mL do 2º ensaio + 1 filtração de 100 mL do 3º ensaio. A biomassa extraída para a amostra referente ao PA2 corresponde a: 2 filtrações de 100 mL do 1º ensaio + 2 filtrações de 100 mL do 2º ensaio. No caso da amostra referente ao PA2 apenas foram considerados 2 ensaios, uma vez que no terceiro ensaio não se verificou crescimento para o referido ponto de amostragem. A biomassa extraída para a amostra referente ao PA3 corresponde a: 1 filtração de 100 mL do 1º ensaio + 2 filtrações de 100 mL do 2º ensaio + 2 filtrações de 100 mL do 3º ensaio. A biomassa extraída para a amostra referente ao PA4 corresponde a: 1 filtração de 10 mL do 1º ensaio + 2 filtrações de 100 mL do 2º ensaio + 2 filtrações de 100 mL do 3º ensaio. Posteriormente,

centrifugou-se e armazenou-se os tubos a -20 ºC até se iniciar a extração de DNA, com o auxílio do *GRS Genomic DNA Kit Bacteria* da Grisp®.

3.3.2 Extração e quantificação do DNA

O *GRS Genomic DNA Kit Bacteria* da Grisp®, que pode ser utilizado tanto no caso de bactérias Gram negativas, como no caso de bactérias Gram positivas, é um método eficiente e rápido que garante a purificação de DNA genómico, através da lise celular e separação do DNA dos restantes componentes celulares (Grisp, n.d.). Todo o procedimento foi realizado de acordo com o protocolo disponibilizado pelo *GRS Genomic DNA Kit Bacteria* da Grisp®. Na Tabela B.1 do Apêndice B do presente relatório estão detalhadas algumas características do *kit* referido anteriormente (Grisp, n.d.).

Após a extração, quantificou-se o DNA de cada uma das amostras, com o auxílio do *Qubit™ fluorometer* da Invitrogen™ e do *Kit Qubit dsADN High Sensitivity Assay* da Invitrogen™. O *Kit* inclui uma solução tampão (*Quant-iT™ dsDNA HS buffer*), duas soluções padrão de 0 $\mu g.mL^{-1}$ e 10 $\mu g.mL^{-1}$ (*Quibit dsDNA HS standard*) da Life Technologies™ e fluorocromo (*Qubit dsDNA HS Reagent 200x concentrate)*. Cada amostra foi preparada com 199 µL da *master mix* e 1 µL de DNA. O padrão 1 foi preparado com 190 µL da *master mix* e 10 µL da solução padrão 1 (0 $\mu g.mL^{-1}$). O padrão 2 foi preparado com 190 µL de *master mix* e 10 µL de solução padrão 2 (10 $\mu g.mL^{-1}$). Assim sendo, a *master mix* utilizada em cada amostra e em cada padrão foi preparada com 199 µL de solução tampão e 1 µL de fluorocromo, presentes no *kit* referido anteriormente. Antes da quantificação, procedeu-se à calibração do aparelho.

Posteriormente, reuniu-se em *pools* equimolares os 3 ensaios realizados para o PA1, PA3 e PA4, e reuniu-se numa *pool* apenas 2 ensaios para o PA2, uma vez que não se verificou crescimento no terceiro ensaio realizado para o PA2. No fim, quantificou-se o DNA nas 4 misturas obtidas (MPA1, MPA2, MPA3, MPA4), tal como descrito acima, com o objetivo de garantir quantidade suficiente para uma sequenciação viável. Os resultados da quantificação de DNA encontram-se na Tabela C.1 do Apêndice C.

3.3.3 Amplificação do gene rRNA 16S por PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica *in vitro* que permite amplificar exponencialmente uma região específica de DNA. Foi realizada uma PCR para amplificar o gene rRNA 16S, de forma a confirmar a existência de DNA bacteriano e a ausência de inibidores no DNA extraído.

Na Tabela 5 estão presentes os reagentes utilizados e os respetivos volumes (µL) na preparação da *master mix*. Em cada amostra utilizou-se 2 µL de *template* DNA e 48 µL da *master mix*, perfazendo 50 µL de volume final. Neste caso, as amostras foram amplificadas individualmente com *primers* específicos para a região hipervariável do gene ribossomal 16S de bactérias, tal como o

primer forward 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCA-3') e o *primer reverse* 1492R (5'-TACCTTGTTACGACT-3').

Tabela 5 - Preparação da master mix utilizada na PCR.

Master mix	Volumes (µL)	Master mix	Volumes (µL)
10x Taq Buffer	35,0	*Primer Forward* 27F (100 µm)	3,5
$MgCl_2$ (50 mM)	17,5	*Primer Reverse* 1492R (100 µm)	3,5
dNTPs (10mM)	70	Água ultra pura	187, 75
Taq DNA Polimerase (5 $U.\mu L^{-1}$)	1,75		

Realizou-se a amplificação dos fragmentos de DNA que codificam para o rRNA 16S nas 4 misturas obtidas (MPA1, MPA2, MPA3, MPA4) e, também, na diluição x10 da MPA3 e na diluição x10 da MPA4, uma vez que a concentração destas últimas duas misturas se apresentava mais elevada. O programa da PCR selecionado no termociclador *MJ Mini Personal Thermal Cycler* da Bio-Rad®, para um volume final de 50 µL, consistiu em:

Desnaturação inicial → 95 ºC (5')

Desnaturação → 94 ºC (1')

Annealing → 55 ºC (1')

Extensão → 72 ºC (1'30'') } x35 ciclos

Extensão final → 72 ºC (10')

Na realização da PCR, inicialmente, verificou-se um processo de desnaturação, cujo aquecimento serviu para quebrar as ligações de hidrogénio entre as cadeiras de DNA e, consequentemente, separar ou desnaturar a dupla hélice de DNA, resultando num molde de cadeia simples de DNA. Posteriormente, durante a fase de arrefecimento, verificou-se uma diminuição da temperatura para que os *primers* se ligassem às suas bases complementares nos moldes de cadeia simples de DNA. Por fim, durante o processo de extensão, verificou-se um aumento da temperatura para que a Taq polimerase na sua temperatura ótima sintetizasse novas cadeias a partir da ligação dos nucleótidos livres (dNTPs) a cada um dos *primers.*

3.3.4 Eletroforese em gel de agarose

Os resultados da PCR foram avaliados através da eletroforese em gel de agarose. Esta técnica, que envolve a passagem de uma determinada corrente através de um gel, consiste na separação de fragmentos de DNA, de acordo com o seu tamanho e carga.

Para preparar o gel de agarose, fez-se uma mistura entre o pó de agarose (Pronadisa®) e a solução tampão TAE 50x (Tris/Acetato/EDTA). Posteriormente, o gel foi colocado numa tina de

eletroforese, imerso em tampão, posicionando-se entre os dois elétrodos paralelos à fileira de poços do gel localizados numa das extremidades do gel. Nos diferentes poços foram carregados 12 µL de cada uma das seis amostras de DNA (MPA1, MPA2, MPA3, MPA4, diluição x10 da MPA3, diluição 10x da MPA4) e num dos poços foi carregado 5 µL de um marcador de peso molecular como o NZYDNA Ladder VIII da Nzytech®, que apresenta um padrão de bandas espaçadas regularmente, com diferentes pesos moleculares. No sentido de obter uma separação eficiente das bandas, a corrente aplicada à eletroforese foi de 90 V, durante cerca de 45 minutos. Após a corrida, o gel foi corado numa solução de brometo de etídeo que se liga ao DNA. As bandas de DNA foram visualizadas num transiluminador de luz UV da Bio-Rad® e, por fim, a imagem foi processada com o auxílio do *software* Quantity One® (ver Apêndice D).

3.3.5 Sequenciação do gene rRNA 16S

Foram enviadas 4 amostras (MPA1, MPA2, MPA3, MPA4), com um volume total de 20 µL cada, para uma empresa externa (Unidade de Sequenciação Avançada, Biocant), no sentido de sequenciar o DNA para uma região hipervariável do gene ribossomal 16S de bactérias e, assim, identificar os organismos cultiváveis presentes no sistema de abastecimento de água da indústria de tintas.

Desta forma, as amostras foram amplificadas individualmente com um *primer* específico para a região hipervariável pretendida (V3-V4). Num segundo PCR foram adicionados os *barcodes*, para identificação inequívoca de cada amostra, e os adaptadores de sequenciação. Os amplicões gerados foram quantificados, reunidos em *pools* equimolares e sequenciados na plataforma MiSeq® (Illumina®) em ponte no formato *paired-end* 2x300 bp (Genoinseq, 2020). Todos os dados obtidos foram analisados na plataforma *EzBioCloud* (versão PKSSU4.0; *http://ezbiocloud.net/*), no sentido de agrupar as sequências obtidas em Unidades Taxonómicas Operatórias (OTUs) a um nível de similaridade de 97% e classificar taxonomicamente as OTUs obtidas. Os índices de diversidade alfa foram calculados após todas as amostras terem sido normalizadas pelo menor valor de "*valid reads*" (80 559).

4 Resultados e Discussão

4.1 Enumeração dos microrganismos cultiváveis

Na Figura 9 apresenta-se a média dos resultados obtidos nos 3 ensaios a partir das contagens em placa (UFC/100 mL). Relativamente à análise estatística efetuada, concluiu-se que os resultados obtidos no PA1 apresentam diferenças estatisticamente significativas em relação ao PA2. Para além disso, PA3 e PA4 não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si nem diferenças estatisticamente significativas em relação ao PA1 e PA2.

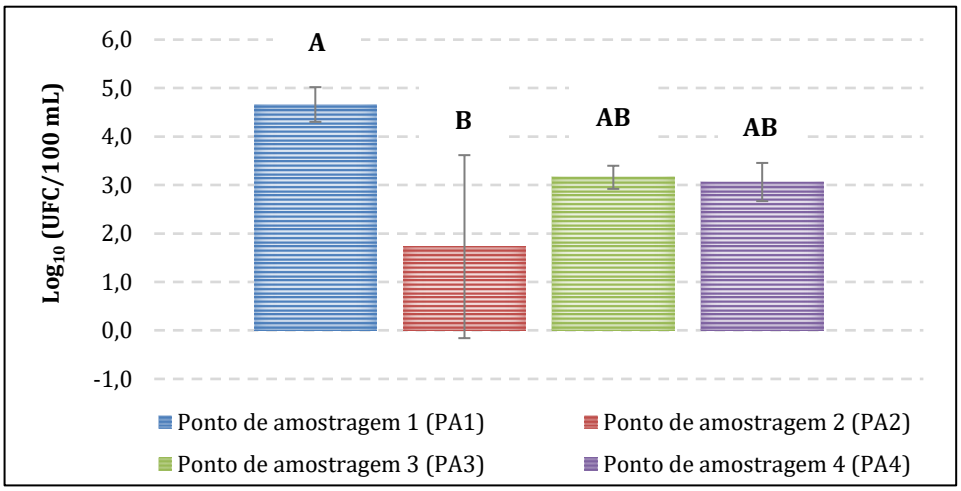


Figura 9 - Média dos resultados das contagens em placa (UFC/100 mL) dos 3 ensaios, após 6 dias de incubação a 30 ºC, para os 4 pontos de amostragem, com a respetiva indicação das barras de erros e da análise estatística efetuada (one-way ANOVA + Tukey's pairwise).

O primeiro ponto de amostragem (PA1) corresponde à água da torneira do departamento de I&D, por isso, a água é proveniente da rede de abastecimento pública – Águas de Gaia, EM, S.A. – sem qualquer tratamento de desinfeção efetuado pela Barbot. Importa salientar que foi no PA1 que se verificou o maior número de colónias a 30 ºC nos ensaios realizados.

Por outro lado, o 2º ponto (PA2) localiza-se após a passagem da água no sistema I de desinfeção (UV). Desta forma, verifica-se que o número de colónias a 30 ºC diminui ≈ 2 a 3 log em relação aos resultados obtidos para o PA1, o que pode ser explicado pelo facto de a água neste ponto passar por um sistema de desinfeção constituído por uma lâmpada UV.

O 3º ponto (PA3) localiza-se após a passagem da água pelo sistema II (cloração), pelo tanque de armazenamento de água e pelo sistema III (UV). Neste ponto, verifica-se um recrescimento de ≈ 1 log de microrganismos sobreviventes a 30 ºC. Como já foi discutido, anteriormente, os tanques de armazenamento são bastante propícios a aumentos de carga microbiana, devido ao maior tempo de permanência. No entanto, como a água passa por um sistema de desinfeção mais intenso do que o 1º passo de desinfeção, constituído por 2 conjuntos de 6 lâmpadas UV cada, verifica-se um aumento da

carga microbiana de ≈ 1 log. Logicamente, o risco de contaminação aumenta quando os reservatórios de água não são sujeitos a limpeza e desinfeção adequadas, por isso, é importante realizar, periodicamente, limpezas nos tanques de armazenamento. Para além disso, Liu *et al*. (2019) defende que a radiação UV deve ser utilizada como primeiro modo de desinfeção e, posteriormente, combinada com o cloro, para garantir um concentração residual de desinfetante, ou seja, uma desinfeção prolongada no tempo.

O 4º ponto (PA4) localiza-se na zona de produção das tintas, imediatamente antes das tubagens derivativas que encaminham a água, quando esta é requerida pelo comando de produção, a cada um dos misturadores. Neste ponto não foram evidentes alterações significativas na carga microbiana em relação ao PA3. Estes valores vão de encontro ao esperado, uma vez que não há nenhum sistema de desinfeção entre eles que poderia contribuir para alterações na carga microbiana.

Independentemente do ponto de amostragem é evidente uma diminuição no número de colónias entre o ensaio realizado em março de 2020 e os restantes ensaios realizados em julho de 2020, tal como se pode verificar na Figura A.1 do Apêndice A. Importa referir que o número de heterotróficos pode variar entre localidades e entre amostragens consecutivas no mesmo local (WHO, 2017).

A *World Health Organization* (WHO) refere ainda que é expectável que o número de heterotróficos diminua significativamente após processos de tratamento de água (como por exemplo, coagulação e sedimentação) e processos de desinfeção (como por exemplo, ultravioleta, ozono, cloro). No entanto, o número de colónias totais pode aumentar na ausência de desinfetante residual ou em superfícies em contacto com biofilmes, tal como já foi referido anteriormente. Para além disso, a WHO assume que, nos sistemas de distribuição de água, um aumento deste valor ou um número anormal de colónias, na ausência de outros indicadores de contaminação, pode indicar a deterioração da salubridade da água, deficientes condições de desinfeção, uma possível estagnação da água ou um potencial desenvolvimento de biofilmes (WHO, 2017).

Em suma, tendo em conta a diminuição da carga microbiana de cerca de 1 a 3 log após o 1º passo de desinfeção, é possível afirmar que todos os processos de desinfeção utilizados pela Barbot parecem funcionar.

Na Tabela 6 é possível verificar se os valores registados cumprem com os valores paramétricos recomendados no Dec. Lei n.º 152/2017, de 7 de dezembro, uma vez que, tal como se mostra previsto na nota n.º 13 do Anexo I ao Dec. Lei n.º 152/2017, não é desejável que o número de colónias por mL a 22 °C e a 36 °C seja superior a 100 e 20, respetivamente.

Tabela 6 - Indicação dos valores paramétricos presentes no Dec. Lei n.º 152/2017 e dos resultados obtidos nas contagens em placa (UFC/100 mL) para o método das membranas filtrantes.

Ponto de amostragem	Dec. Lei n.º 152/2017		UFC/100 mL a 30 ºC
	Valor paramétrico UFC/100 mL a 22 ºC	Valor paramétrico UFC/100 mL a 36 ºC	
1	$1,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^3$	$5,9 \times 10^4$
2			$1,4 \times 10^3$
3			$1,6 \times 10^3$
4			$1,5 \times 10^3$

Por outro lado, pela análise dos dados do boletim de 'Controlo da qualidade da água para consumo', disponibilizado pela rede de distribuição de água utilizada na Barbot - Águas de Gaia, EM, S.A., foi possível quantificar a presença de heterotróficos e verificar a concentração de cloro residual disponível na água da zona de abastecimento do Concelho de Vila Nova de Gaia.

A verificação da qualidade da água da rede pública foi realizada através de análises periódicas na torneira do consumidor, segundo o Programa de Controlo de Qualidade da Água (PCQA) aprovado pela autoridade competente Entidade Reguladora de Serviços de Águas e Resíduos (ERSAR), tal como pressupõe o Dec. Lei n.º 306/2007, de 27 de agosto. As recolhas das amostras de água foram realizadas por Técnicos Analistas de Águas de Gaia, EM, S.A., qualificados pela RELACRE, e as análises foram realizadas por laboratório acreditado e de referência da ERSAR - IAREN (Instituto da Água da Região Norte) (Águas de Gaia, EM, 2019).

Assim, tendo em conta um volume de água fornecido de 51 927 $m^3.dia^{-1}$, num total de 40 análises realizadas durante os meses de outubro a dezembro de 2019, quantificaram-se, no máximo, 44 UFC/mL e 28 UFC/mL, a 22 ºC e 37 ºC, respetivamente, e o cloro residual disponível nesta água foi de 1,15 $mg.L^{-1}$ - edital nº 4/2019 (Águas de Gaia, EM, 2019).

Estes valores demonstram cumprir os parâmetros estabelecidos no Dec. Lei n.º 152/2017 para uma temperatura de 22 ºC, uma vez que se quantificaram menos de 100 UFC/mL. Por outro lado, durante as 40 análises realizadas pela Águas de Gaia, no máximo, quantificaram-se 28 UFC/mL a 37 ºC e o valor paramétrico a 36 ºC estabelecido no Dec. Lei n.º 152/2017 é de 20 UFC/mL. Assim, pode-se assumir que os dados presentes no edital n.º 4/2019 cumprem com os valores do Dec. Lei referido, uma vez que o desvio não é muito significativo.

Posteriormente, tendo em conta um volume de água fornecido de 53 030 $m^3.dia^{-1}$, num total de 42 análises realizadas durante os meses de janeiro a março de 2020, quantificaram-se, no máximo, 1 UFC/mL e 56 UFC/mL, a 22 ºC e 37 ºC, respetivamente, e o cloro residual disponível nesta água foi 0,17 $mg.L^{-1}$ no mínimo e 1,42 $mg.L^{-1}$ no máximo - edital n.º 1/2020 (Águas de Gaia, EM, 2020).

Estes valores demonstram cumprir os parâmetros estabelecidos no Dec. Lei n.º 152/2017 para uma temperatura de 22 ºC, uma vez que se quantificaram menos de 100 UFC/mL, no entanto, a

diferença entre o número de colónias é bastante significativa. Por outro lado, durante as 42 análises realizadas pela Águas de Gaia, no máximo, quantificaram-se 56 UFC/mL a 37 ºC e o valor paramétrico a 36 ºC estabelecido no Dec. Lei n.º 152/2017 é de 20 UFC/mL. Assim, pode-se assumir que os dados presentes no edital n.º 1/2020 não cumprem com os valores do Dec. Lei referido, uma vez que o desvio é bastante significativo.

Tal como se pode verificar na Tabela 7, os resultados obtidos no âmbito desta Dissertação de Mestrado, referentes à enumeração de heterotróficos totais no PA1 do sistema de distribuição de água da Barbot - torneira do departamento de I&D - podem ser comparados com os dados presentes no boletim de 'Controlo da qualidade da água para consumo', disponibilizado pela Águas de Gaia, EM, S.A..

Tabela 7 - Indicação dos valores paramétricos presentes no Boletim 'Controlo da qualidade da água para consumo' da zona de abastecimento do concelho de Vila Nova de Gaia e dos resultados obtidos nas contagens em placa (UFC/100mL) para o método das membranas filtrantes.

Boletim 'Controlo da qualidade da água para consumo' – Edital nº 4/2019		**Boletim 'Controlo da qualidade da água para consumo' – Edital nº 1/2020**		**Ponto de amostragem 1**
Valor paramétrico UFC/100 mL 22 ºC	**Valor paramétrico UFC/100 mL 37 ºC**	**Valor paramétrico UFC/100 mL 22 ºC**	**Valor paramétrico UFC/100 mL 37 ºC**	**UFC/100 mL 30 ºC**
$4{,}4 \times 10^3$	$2{,}8 \times 10^3$	$1{,}0 \times 10^2$	$5{,}6 \times 10^3$	$5{,}9 \times 10^4$

Desta forma, é possível afirmar que se verificou um aumento no número de colónias no PA1 em comparação com os resultados obtidos a partir da análise da água disponibilizada pela rede pública. Isto pode ser justificado pelo facto do desinfetante residual adicionado no tratamento da água da rede pública não ser suficiente para inibir o crescimento microbiano ao longo do sistema de distribuição até às torneiras dos consumidores. Para além disso, a enumeração de heterotróficos totais foi realizada com uma temperatura de incubação de 30 ºC, o que permite uma maior diversidade de microrganismos mesófilos ($T_{ótima}$ = 20 ºC - 45 ºC (Ferreira *et al*., 2010)).

Ainda assim, importa relembrar que o edital nº 4/2019 e o edital nº 1/2020, disponibilizados pela Águas de Gaia, EM, S.A., se referem ao último trimestre do ano passado e ao 1º trimestre do ano corrente, respetivamente. Todavia, toda a atividade experimental no âmbito desta Dissertação de Mestrado foi realizada a partir do 2º trimestre do ano de 2020. Desta forma, não é possível obter uma comparação conclusiva sem a disponibilização do edital nº 2/2020 e edital nº 3/2020 das análises realizadas pela Águas de Gaia, EM, S.A..

O espetro de microrganismos heterotróficos inclui organismos resistentes aos processos de desinfeção, como os formadores de esporos; organismos sensíveis aos processos de desinfeção, tais como as bactérias coliformes; e organismos que rapidamente proliferam na água tratada na ausência de desinfetante residual (WHO, 2017).

4.2 Identificação dos organismos cultiváveis

O DNA extraído da biomassa de PCA das amostras MPA1, MPA2, MPA3 e MPA4 foi submetido a uma técnica de PCR, ocorrendo a amplificação do gene rRNA 16S. Os resultados da eletroforese realizada aos produtos da PCR permitiram confirmar a existência de DNA bacteriano (ver Apêndice D). Assim sendo, prosseguiu-se com a sequenciação da região hipervariável do gene ribossomal 16S (V3-V4) nas várias amostras, com o propósito de identificar os organismos cultiváveis, presentes no sistema de abastecimento de água da indústria de tintas.

A sequência do gene ribossomal 16S de bactérias apresenta pequenas diferenças entre espécies, o que permite distinguir os diferentes organismos cultiváveis. Deste modo, após a sequenciação do fragmento do gene rRNA 16S, procedeu-se à análise na plataforma *EzBioCloud* das sequências de DNA obtidas, no sentido de as agrupar em Unidades Taxonómicas Operatórias (OTUs) a um nível de similaridade de 97% e classificar taxonomicamente as OTUs obtidas. A Tabela 8 apresenta o valor de "*raw reads*", "*filter reads*", "*merged reads*" e "*valid reads*" para cada uma das amostras.

Tabela 8 - Reads para as 4 amostras em estudo.

Amostra	Raw Reads (%)	Filter Reads (%)	Merged Reads (%)	Valid Reads (%)
MPA1	138 875 (100,0 %)	137 380 (98,92 %)	134 405 (96,78 %)	82 021 (82,0 %)
MPA2	122 402 (100,0 %)	120 186 (98,19 %)	117 788 (96,23 %)	94 480 (94,5 %)
MPA3	110 674 (100,0 %)	109 438 (98,88 %)	107 922 (97,51 %)	88 283 (88,3 %)
MPA4	91 797 (100,0 %)	90 915 (99,04 %)	88 976 (96,93 %)	80 559 (90,8 %)

As 4 amostras foram normalizadas pelo valor 80 559, no sentido de poderem ser comparadas entre si. Na Tabela 9 estão presentes os índices de diversidade alfa de todas as amostras, incluindo o número de OTUs para cada uma delas.

Tabela 9 - Índices de diversidade alfa das amostras em estudo.

Amostra	Nº OTUs	ACE	Chao1	Jackknife	Shannon	Simpson	PD
MPA1	85	111,22	103,75	110	1,55	0,28	161
MPA2	48	65,57	58,50	63	0,18	0,93	132
MPA3	56	62,75	62,11	67	1,41	0,34	96
MPA4	47	51,74	50,11	55	0,86	0,63	89

Estes parâmetros permitem analisar a diversidade das amostras, uma vez que, quanto maior o seu valor maior a diversidade das mesmas. Assim, tendo em conta os baixos índices de diversidade alfa e o baixo número de OTUs, pode-se concluir que as 4 amostras apresentam baixa diversidade genómica. De uma forma geral, as amostras MPA1 e MPA3 apresentam maior diversidade do que as restantes, dado que os índices de diversidade alfa são superiores. Todavia, não é possível comparar

diretamente os resultados entre si, porque a recolha da biomassa nem sempre contemplou os duplicados e os cultiváveis presentes em 100 mL de amostra e, para além disso, na amostra MPA2 apenas foram considerados 2 ensaios em vez de 3 ensaios, tal como explicado no capítulo Materiais e Métodos. As Figuras 10 a 14 traduzem a classificação taxonómica das OTUs obtidas.

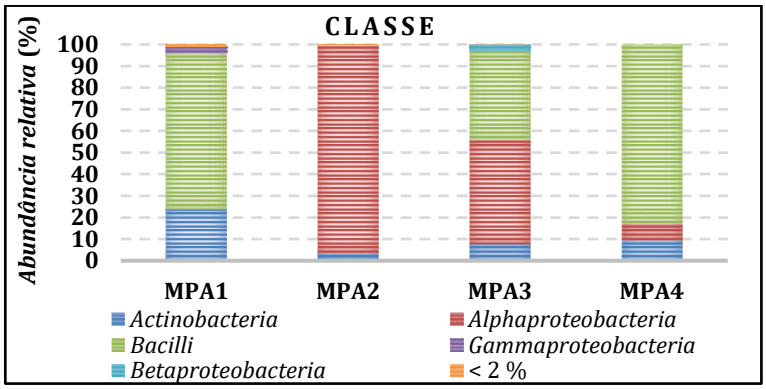


Figura 10 - Abundância relativa das classes identificadas com base na sequência do gene rRNA 16S. Volume de água filtrado para a recolha da biomassa × nº de placas: ***MPA1****- 100mL×2+100mL×2+100mL;* ***MPA2*** *– 100mL×2+100mL×2;* ***MPA3*** *– 100mL+100mL×2+100mL×2;* ***MPA4*** *–10mL+100mL×2+100mL×2.*

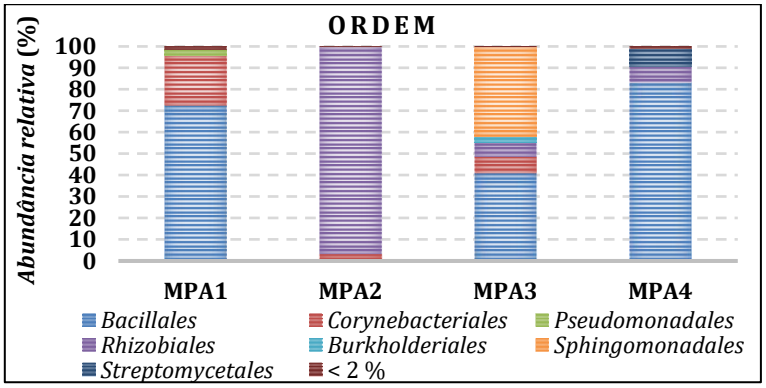


Figura 11 - Abundância relativa das ordens identificadas com base na sequência do gene rRNA 16S. Volume de água filtrado para a recolha da biomassa × nº de placas: ***MPA1****- 100mL×2+100mL×2+100mL;* ***MPA2*** *– 100mL×2+100mL×2;* ***MPA3*** *– 100mL+100mL×2+100mL×2;* ***MPA4*** *–10mL+100mL×2+100mL×2.*

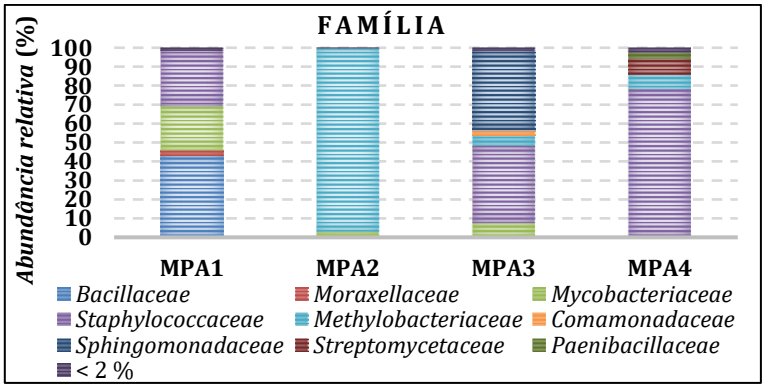


Figura 12 - Abundância relativa das famílias identificadas com base na sequência do gene rRNA 16S. Volume de água filtrado para a recolha da biomassa × nº de placas: ***MPA1****- 100mL×2+100mL×2+100mL;* ***MPA2*** *– 100mL×2+100mL×2;* ***MPA3*** *– 100mL+100mL×2+100mL×2;* ***MPA4*** *–10mL+100mL×2+100mL×2.*

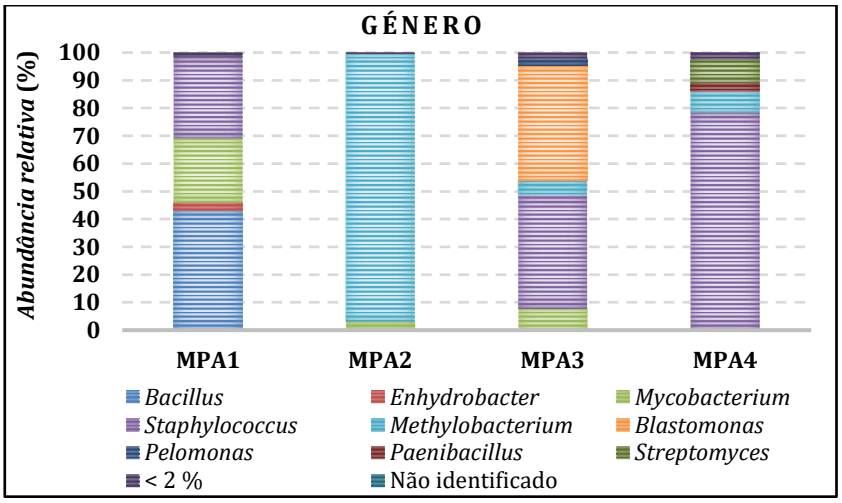


Figura 13 - Abundância relativa dos géneros maioritários identificados com base na sequência do gene rRNA 16S. Volume de água filtrado para a recolha da biomassa × nº de placas: ***MPA1****- 100mL×2+100mL×2+100mL;* ***MPA2*** *– 100mL×2+100mL×2;* ***MPA3*** *– 100mL+100mL×2+100mL×2;* ***MPA4*** *–10mL+100mL×2+100mL×2.*

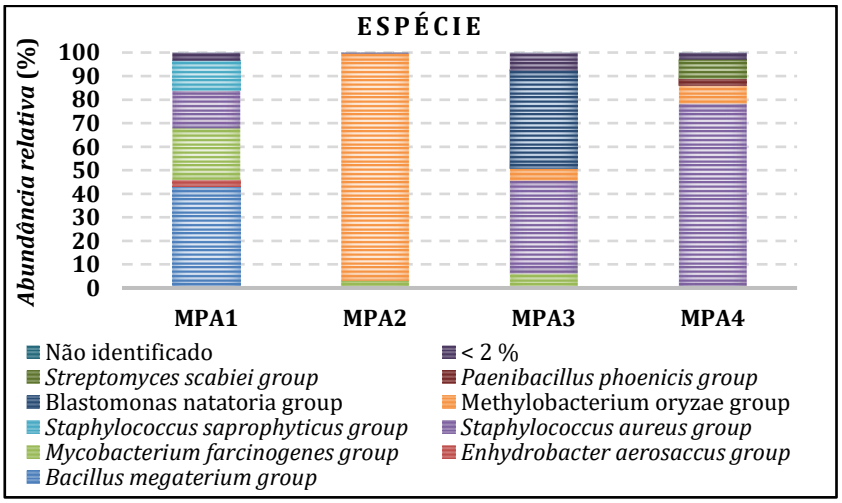


Figura 14 - Abundância relativa das espécies maioritárias identificadas com base na sequência do gene rRNA 16S. Volume de água filtrado para a recolha da biomassa × nº de placas: ***MPA1****- 100mL×2+100mL×2+100mL;* ***MPA2*** *– 100mL×2+100mL×2;* ***MPA3*** *– 100mL+100mL×2+100mL×2;* ***MPA4*** *–10mL+100mL×2+100mL×2.*

Através dos resultados obtidos concluiu-se que no sistema de abastecimento de água da empresa Barbot se identificaram diferentes classes maioritárias de organismos (Fig. 10), tais como *Actinobacteria* (filo *Actinobacteria*), *Bacilli* (filo *Firmicutes*), *Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria* (filo *Proteobacteria*). Relativamente a uma categoria taxonómica inferior, concluiu-se que existem 9 géneros maioritários distintos (Fig. 13), tais como *Bacillus, Staphylococcus, Enhydrobacter, Mycobacterium, Methylobacterium, Blastomonas, Paenibacillus, Pelomonas* e *Streptomyces.* Importa realçar que a percentagem de cada organismo pode não ser a real, uma vez que se baseia nas células recuperadas após cultivo.

De seguida, pretende-se comparar os resultados obtidos com outros estudos relacionados com a diversidade bacteriana em águas potáveis, suportados na análise da sequência do gene rRNA 16S.

De acordo com a categoria taxonómica superior, os organismos geralmente predominantes na água potável pertencem ao filo *Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes* e *Firmicutes* (Botsaris *et al*., 2015; Vaz-Moreira *et al*., 2013, 2014). Desta forma, esta informação corresponde aos resultados obtidos nesta Dissertação.

Tendo em conta uma categoria taxonómica inferior, os géneros de organismos *Bacillus, Aeromonas, Pseudomonas* (Botsaris *et al*., 2015; Vaz-Moreira *et al*., 2013, 2014)*, Flavobacterium, Sphingomonas, Mycobacterium, Acidovorax* (Vaz-Moreira *et al*., 2013, 2014)*, Acinetobacter* (Botsaris *et al*., 2015; Vaz-Moreira *et al*., 2014)*, Rhodococcus, Clostridium* (Vaz-Moreira *et al*., 2014)*, Staphylococcus, Enterococcus, Enterobacter* (Botsaris *et al*., 2015) são frequentemente cultiváveis a partir de águas potáveis. Deste grupo de géneros bacterianos, *Bacillus, Mycobacterium* e *Staphylococcus* correspondem a géneros identificados numa proporção superior a 2% no sistema de abastecimento de água da empresa em estudo.

Bacillus (filo *Firmicutes*) é um género de bactérias com forma de bastonete, Gram positivas e produtoras de endósporos - formas de dormência mais resistentes a condições desfavoráveis conhecidas. Este género de bactérias, resistente a processos de desinfeção e esterilização, é geralmente encontrado num largo espetro de ambientes naturais, como o solo e a água (Priest, 2008).

As bactérias do género *Mycobacterium* (filo *Actinobacteria*), em forma de haste (hifas), aeróbias, crescem lentamente em ambientes de água e meios de cultura e apresentam uma parede celular com alto conteúdo em lípidos. Este género de organismos tem sido encontrado em sistemas de distribuição de água mesmo na presença de sistemas de desinfeção, uma vez que, *Mycobacterium* é relativamente resistente ao tratamento e desinfeção da água (WHO, 2017).

Staphylococcus aureus (filo *Firmicutes*) é uma espécie de bactérias de forma esférica (cocos), não formadora de esporos, Gram positiva e tem uma temperatura de crescimento entre os 18 ºC e os 40 ºC. Embora seja mais resistente que a *Escherichia coli* ao cloro residual, a sua presença na água é facilmente controlada pelo tratamento convencional e desinfeção adequada (WHO, 2017). Neste caso, os resultados obtidos contrariam esta informação, uma vez que, esta espécie bacteriana foi identificada numa proporção elevada (Fig.14) em três dos quatro pontos de amostragem em estudo.

Acinetobacter (filo *Proteobacteria*) é um género de bactérias Gram negativas, com a forma de cocobacilos, frequentemente encontradas no solo, em águas residuais, na água potável e em sistemas de distribuição de água. Estas bactérias são sensíveis a desinfetantes como o cloro e, por isso, na presença de desinfetante residual o seu número deve ser reduzido (WHO, 2017). Neste estudo, este género de bactérias é um exemplo de um dos géneros que se encontra numa proporção inferior ao *cut-off* de 2%, pelo que não é identificado na Fig. 13. Isto pode ser justificado pela presença de uma determinada concentração de cloro residual no sistema de abastecimento de água da empresa Barbot.

Os coliformes totais, que conseguem crescer e sobreviver em sistemas de distribuição de água (em particular na presença de biofilmes), são bacilos, Gram negativos, não formadores de esporos, fermentadores rápidos da lactose a 35 ºC – 37 ºC, com formação de ácido e gás. Para além disso, os coliformes totais são sensíveis à desinfeção, por isso, deve ser evidente a ausência de coliformes totais imediatamente após uma desinfeção. Desta forma, a presença destes organismos pode indicar um processo de desinfeção inadequado ou a presença de biofilmes que por si só podem dificultar esse processo nos sistemas de abastecimento de água. A bactéria coliforme termotolerante, *Escherichia coli* (filo *Proteobacteria*), que fermenta lactose a altas temperaturas, constitui cerca de 90% dos coliformes fecais ou típicos, sendo um indicador de contaminação fecal (WHO, 2017). O crescimento de *Escherichia* geralmente requer o uso de um meio de cultura seletivo, por isso, quando na presença de um meio de cultura como o *Plate Count Agar* (PCA), estes organismos representam uma pequena percentagem das populações cultiváveis (Vaz-Moreira *et al*., 2014), tal como se verificou com a atividade laboratorial realizada.

Os microrganismos heterotróficos na água de consumo não representam uma preocupação em termos de saúde pública, no entanto, incluem potenciais patogénicos "oportunistas", tais como *Acinetobacter, Aeromonas, Flavobacterium, Klebsiella, Moraxella, Serratia, Pseudomonas* e *Xanthomonas* (WHO, 2017). No sistema de abastecimento de água à unidade de produção de tintas da Barbot não foi identificado, numa proporção superior a 2%, qualquer organismo deste grupo de potenciais patogénicos "oportunistas".

Através da enumeração de heterotróficos totais, comprovou-se que a empresa Barbot apresenta sistemas de desinfeção adequados, dado que se verificou uma diminuição da carga microbiana em todos os pontos de amostragem. A presença de *Bacillus* e *Mycobacterium* no sistema de abastecimento de água da empresa Barbot permite então validar que, mesmo na presença de um sistema de desinfeção adequado, estes géneros bacterianos podem ser identificados.

Tendo em conta um estudo elaborado, anteriormente, no âmbito de uma Dissertação de Mestrado, foram isolados 5 géneros, tais como *Pseudomonas, Cellulosimicrobium, Bacillus, Brevibacterium* e *Staphylococus,* a partir de três amostras distintas de tintas aquosas embaladas, produzidas nas instalações da Barbot. Desta forma, pode-se concluir que nem todos os géneros encontrados agora nas amostras de água foram encontrados nas amostras de tintas aquosas embaladas. Em primeiro lugar, a atividade experimental deveria ser realizada ao mesmo tempo, ou seja, nas mesmas condições de produção, para ser possível comparar efetivamente o crescimento microbiano nas amostras de tintas aquosas embaladas e na água do sistema de abastecimento da unidade de produção. Por outro lado, tal como se verificou, era de esperar que algumas das bactérias inicialmente identificadas na água de produção fossem eliminadas até à fase de enchimento do produto final. Isto porque durante a produção de tintas é adicionada uma determinada quantidade de biocida que pode ajudar no controlo do crescimento microbiano nas tintas aquosas embaladas.

5 Conclusões

A análise da proveniência da contaminação das tintas é uma temática bastante importante, uma vez que as tintas são uma formulação constituída por diferentes componentes, que podem servir de nutriente para os microrganismos, permitindo o seu crescimento nas tintas. As tintas de base aquosa surgiram com o propósito de substituir os esquemas de base solvente, pela necessidade de introduzir nas indústrias de tintas tecnologias menos agressivas para a saúde humana e para o meio ambiente. Todavia, este tipo de tintas são mais suscetíveis ao ataque e degradação por microrganismos devido ao seu solvente maioritário (água). Assim, é importante efetuar um controlo da carga microbiana, bem como, garantir a desinfeção adequada da água utilizada no processo de produção deste tipo de tintas.

Nesse sentido, o objetivo desta Dissertação foi avaliar o crescimento de heterotróficos totais ao longo da linha de água dentro da empresa, através da enumeração de células viáveis, pelo método das membranas filtrantes. Além disto, os organismos cultiváveis foram também identificados através da extração e sequenciação do respetivo DNA. Ambos os fatores avaliados permitiram inferir sobre a eficácia dos processos de desinfeção de água existentes na rede de abastecimento da unidade de produção de tintas da empresa – cloração e radiação UV.

Em suma, com a realização desta Dissertação foi evidente uma diminuição na carga microbiana em relação à água proveniente da rede pública, por isso, os processos de desinfeção existentes na empresa mostraram-se eficientes no controlo do desenvolvimento bacteriano.

Relativamente à identificação dos organismos cultiváveis, presentes na água utilizada na produção de tintas aquosas da Barbot, foram identificados 9 géneros maioritários distintos: *Bacillus, Staphylococcus, Enhydrobacter*, *Mycobacterium, Methylobacterium, Blastomonas, Paenibacillus, Pelomonas* e *Streptomyces*. Tendo em conta os baixos índices de diversidade alfa e o baixo número de Unidades Taxonómicas Operatórias (OTUs), concluiu-se que a água do sistema de abastecimento da empresa apresenta baixa diversidade bacteriana. Alguns destes géneros bacterianos, como *Bacillus* e *Staphylococcus,* foram encontrados anteriormente em tintas aquosas da empresa.

6 Avaliação do trabalho realizado

6.1 Objetivos Realizados

A presente Dissertação permitiu analisar a microbiota da água utilizada no processo de produção de tintas decorativas de base aquosa pela Barbot, a partir da recolha de água em 4 pontos de amostragem distintos ao longo da rede de abastecimento da unidade de produção de tintas. Esta atividade experimental, através da enumeração de células viáveis e, também, através da identificação dos organismos cultiváveis, permitiu confirmar a existência de organismos pertencentes a 9 géneros maioritários distintos. No entanto, de acordo com os índices de diversidade alfa, foi possível avaliar que este processo de distribuição de água apresenta baixa diversidade bacteriana. Para além disso, foi possível avaliar a eficácia dos sistemas de desinfeção de água existentes na Barbot: cloração e radiação UV. Assim, apesar do número reduzido de recolhas de água efetuadas, devido à pandemia COVID-19, foi possível averiguar uma diminuição da carga microbiana com os referidos processos de desinfeção.

6.2 Sugestões de Trabalhos Futuros

Tal como foi referido no corpo da Dissertação, reuniram-se em *pools* equimolares os ensaios realizados para o mesmo ponto de amostragem, obtendo-se assim as amostras MPA1, MPA2, MPA3, MPA4. Esta estratégia surgiu no sentido de reduzir os custos envolvidos com toda a atividade experimental. Todavia, seria interessante identificar os organismos totais e cultiváveis em todas as amostras individualmente, isto é, em cada dia de ensaios e em cada ponto de amostragem. Desta forma, seria possível identificar alterações nos organismos ao longo do tempo (entre março e julho de 2020). Outro estudo interessante, que não foi possível realizar devido à interrupção das atividades de estágio, seria a análise da água antes e após a lavagem do tanque da água da rede de abastecimento da unidade de produção de tintas, na Barbot. Assim, seria possível obter conclusões quanto à importância e frequência da realização das lavagens e desinfeções no sistema em estudo.

6.3 Apreciação Final

De uma forma geral, foram concluídos com sucesso os objetivos iniciais da presente Dissertação. Contudo, devido à pandemia COVID-19, a atividade experimental foi reduzida, tendo sido feita uma pesquisa teórica aprofundada acerca dos processos de desinfeção existentes em sistemas de abastecimento de água, nomeadamente na empresa onde esta Dissertação se inseriu. Assim, a atividade experimental inicialmente planeada envolveria mais ensaios do que os que se realizaram, o que permitiria obter resultados, possivelmente, mais consistentes.

Referências

Ackerson, N. O. B., Killinger, A. H., Liberatore, H. K., Ternes, T. A., Plewa, M. J., Richardson, S. D., & Duirk, S. E. (2018). Impact of chlorine exposure time on disinfection byproduct formation in the presence of iopamidol and natural organic matter during chloramination. *Journal of Environmental Sciences (China)*, *78*, 204–214. https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.09.022

Águas de Gaia, EM, S. A. (2019). Controlo da Qualidade da Água para Consumo Humano - Zona de Abastecimento do Concelho de Vila Nova de Gaia - Rede Predial. In *Edital nº4/2019*.

Águas de Gaia, EM, S. A. (2020). Controlo da Qualidade da Água para Consumo Humano - Zona de Abastecimento do Concelho de Vila Nova de Gaia - Rede Predial. In *Edital nº1/2020*.

Alquímica. (n.d.). *Proposta para fornecimento de sistemas de esterilização por Radiação UV*.

APT - Associação Portuguesa de Tintas. (n.d.). Retrieved June 1, 2020, from http://www.aptintas.pt/respeitoAmbiente.aspx

Associação Portuguesa de Tintas. (2014). *Guia para a utilização de Biocidas nas Tintas Decorativas*. http://www.aptintas.pt/Media/doc_421_guia_biocidas_versao2_2014_valid_dgs_pt.pdf

Botsaris, G., Kanetis, L., Slaný, M., Parpouna, C., & Makris, K. C. (2015). Microbial quality and molecular identification of cultivable microorganisms isolated from an urban drinking water distribution system (Limassol, Cyprus). *Environmental Monitoring and Assessment*, *187*(12). https://doi.org/10.1007/s10661-015-4957-9

CENERTEC - Centro de Energia e Tecnologia. (2018). *Limpeza, Desinfeção e Controlo de Reservatórios e Sistemas de Água*.

CEQA - Associação Portuguesa de Distribuição e Drenagem de Águas. (2009). *Guia APDA - Lavagem e Desinfeção de Reservatórios de Água para Consumo*. APDA / Apoio SMAS Almada.

Chen, P. F., Zhang, R. J., Huang, S. Bin, Shao, J. H., Cui, B., Du, Z. L., Xue, L., Zhou, N., Hou, B., & Lin, C. (2020). UV dose effects on the revival characteristics of microorganisms in darkness after UV disinfection: Evidence from a pilot study. *Science of the Total Environment*, *713*, 136582. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136582

Deborde, M., & Gunten, U. (2008). Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment-Kinetics and mechanisms: A critical review. *Water Research*, *42*(1–2), 13–51. https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.07.025

Diário da República, 1.ª série — N.º 164 — 27 de Agosto de 2007, (2007).

Diário da República, 1.ª série — N.º 235 — 7 de dezembro de 2017, (2017).

Dimapilis, E. A. S., Hsu, C. S., Mendoza, R. M. O., & Lu, M. C. (2018). Zinc oxide nanoparticles for water disinfection. *Sustainable Environment Research*, *28*(2), 47–56. https://doi.org/10.1016/j.serj.2017.10.001

Ding, W., Jin, W., Cao, S., Zhou, X., Wang, C., Jiang, Q., Huang, H., Tu, R., Han, S. F., & Wang, Q. (2019). Ozone disinfection of chlorine-resistant bacteria in drinking water. *Water Research*, *160*, 339–349. https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.014

Ersoy, Z. G., Dinc, O., Cinar, B., Gedik, S. T., & Dimoglo, A. (2019). Comparative evaluation of disinfection mechanism of sodium hypochlorite, chlorine dioxide and electroactivated water on Enterococcus faecalis. *Lwt*, *102*, 205–213. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.041

European Chemicals Agency. (n.d.-a). *Biocidal Products Regulation*. Retrieved June 2, 2020, from https://echa.europa.eu/regulations/biocidal-products-regulation/understanding-bpr

European Chemicals Agency. (n.d.-b). *Information on biocides*. Retrieved June 2, 2020, from https://echa.europa.eu/pt/substance-information/-/substanceinfo/100.020.655

European Chemicals Agency. (n.d.-c). *Substance Information (ethylenedioxy)dimethanol*. Retrieved June 12, 2020, from https://echa.europa.eu/pt/substance-information/-/substanceinfo/100.020.655

Ferreira, W. F. C., Sousa, J. C. F. de, & Lima, N. (2010). *Microbiologia* (LIDEL).

Genoinseq. (2020). *Proposta Genoinseq* (pp. 1–9).

Grisp. (n.d.). *GRS Genomic DNA Kit - Bacteria*. Retrieved July 7, 2020, from https://grisp.pt/produto/grs-genomic-dna-kit-bacteria/

He, G., Zhang, T., Zheng, F., Li, C., Zhang, Q., Dong, F., & Huang, Y. (2019). Reaction of fleroxacin with chlorine and chlorine dioxide in drinking water distribution systems: Kinetics, transformation mechanisms and toxicity evaluations. *Chemical Engineering Journal*, *374*, 1191–1203. https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.06.022

Homem, V. (2018). Product chemistry and technology. In *Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto* (pp. 16–34).

Hua, G., & Reckhow, D. A. (2007). Comparison of disinfection byproduct formation from chlorine and

alternative disinfectants. *Water Research*, *41*(8), 1667–1678. https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.01.032

Jo, H. Y., Tango, C. N., & Oh, D. H. (2018). Influence of different organic materials on chlorine concentration and sanitization of slightly acidic electrolyzed water. *Lwt*, *92*, 187–194. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.028

Li, Q., Xia, P. F., Tao, Z. Y., & Wang, S. G. (2017). Modeling biofilms in water systems with new variables: A review. *Water (Switzerland)*, *9*(7), 1–12. https://doi.org/10.3390/w9070462

Li, X., Cai, M., Wang, L., Niu, F., Yang, D., & Zhang, G. (2019). Evaluation survey of microbial disinfection methods in UV-LED water treatment systems. *Science of the Total Environment*, *659*, 1415–1427. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.344

Liu, L., Xing, X., Hu, C., Wang, H., & Lyu, L. (2019). Effect of sequential UV/free chlorine disinfection on opportunistic pathogens and microbial community structure in simulated drinking water distribution systems. *Chemosphere*, *219*, 971–980. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.067

Lundov, M. D., Kolarik, B., Bossi, R., Gunnarsen, L., & Johansen, J. D. (2014). Emission of isothiazolinones from water-based paints. *Environmental Science and Technology*, *48*(12), 6989–6994. https://doi.org/10.1021/es500236m

Matoh, L., Žener, B., Korošec, R. C., & Štangar, U. L. (2019). Photocatalytic water treatment. *Nanotechnology in Eco-Efficient Construction*, 675–702. https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102641-0.00027-x

Meyer, S. T. (1994). O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. *Cadernos de Saúde Pública*, *10*(1), 99–110. https://doi.org/10.1590/s0102-311x1994000100011

Nogueira, J. L. (2008). *Noções Básicas de Tintas e Vernizes*. 1ª edição. Ed.Autor. Porto.

Nyangaresi, P. O., Qin, Y., Chen, G., Zhang, B., Lu, Y., & Shen, L. (2018). Effects of single and combined UV-LEDs on inactivation and subsequent reactivation of E. coli in water disinfection. *Water Research*, *147*, 331–341. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.014

Obidi, O. F., Aboaba, O. O., Makanjuola, M. S., & Nwachunkwu, S. C. U. (2009). *Microbial evaluation and deterioration of paints and paint-products*. *30*, 735–740.

Ofori, I., Maddila, S., Lin, J., & Jonnalagadda, S. B. (2018). Chlorine dioxide inactivation of

Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus in water: The kinetics and mechanism. *Journal of Water Process Engineering*, *26*, 46–54. https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.09.001

Padhi, R. K., Subramanian, S., Mohanty, A. K., & Satpathy, K. K. (2019). Comparative assessment of chlorine reactivity and trihalomethanes formation potential of three different water sources. *Journal of Water Process Engineering*, *29*, 100769. https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.02.009

Regulamento (UE) N.º 528/2012 de 22 de maio de 2012 relativo à disponibilização no mercado e à utilização de produtos biocidas, L167 (2012). http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:167:0001:0123:PT:PDF

Poulsen, S., Hansen, S. L., Vedel, M., Kofoed, W., & Schjøth-Eskesen, J. (2018). *Reducing biocide concentrations for preservation of water-based paints*.

Priest, F. G. (2008). Bacillus. In *Biotechnology: Second, Completely Revised Edition* (Vols. 1–12, pp. 367–400). Wiley-VCH Verlag GmbH. https://doi.org/10.1002/9783527620999.ch11

PubChem. (n.d.-a). *(Ethylenedioxy)dimethanol - C4H10O4*. Retrieved June 12, 2020, from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethylenedioxy_dimethanol

PubChem. (n.d.-b). *3(2H)-Isothiazolone (Compound)*. Retrieved May 6, 2020, from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/96917#section=Structures

Ray, C., & Jain, R. (2014). Disinfection Systems. *Low Cost Emergency Water Purification Technologies*, 55–86. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-411465-4.00004-4

Ribeiro, M., Simões, L. C., & Simões, M. (2019). Biocides. *Encyclopedia of Microbiology*, 478–490. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.12118-1

Santos, B. H. C. (2010). *Dissertação de Mestrado em Ciências - Biological role of pyrimidine dimers in human cells irradiated with UVA radiation*. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Silva, V., Silva, C., Soares, P., Garrido, E. M., Borges, F., & Garrido, J. (2020). Isothiazolinone biocides: Chemistry, biological, and toxicity profiles. *Molecules*, *25*(4). https://doi.org/10.3390/molecules25040991

SIMDOURO. (n.d.). *Tratamento da Água*. Retrieved June 11, 2020, from https://www.simdouro.pt/dados.php?ref=tratamento-agua

Tintas Barbot. (n.d.). Retrieved March 5, 2020, from https://barbot.pt/

Vaz-Moreira, I., Egas, C., Nunes, O. C., & Manaia, C. M. (2013). Bacterial diversity from the source to the tap: A comparative study based on 16S rRNA gene-DGGE and culture-dependent methods. *FEMS Microbiology Ecology*, *83*(2), 361–374. https://doi.org/10.1111/1574-6941.12002

Vaz-Moreira, I., Nunes, O. C., & Manaia, C. M. (2014). Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: Searching the links with the human microbiome. *FEMS Microbiology Reviews*, *38*(4), 761–778. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12062

Wang, J., Sui, M., Yuan, B., Li, H., & Lu, H. (2019). Inactivation of two Mycobacteria by free chlorine: Effectiveness, influencing factors, and mechanisms. *Science of the Total Environment*, *648*, 271–284. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.451

Wang, X., Hu, X., Wang, H., & Hu, C. (2012). Synergistic effect of the sequential use of UV irradiation and chlorine to disinfect reclaimed water. *Water Research*, *46*(4), 1225–1232. https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.12.027

WHO. (2017). *Guidelines for Drinking-water Quality, Fourth Edition Incorporating the First Addendum*.

Williams, T. M. (2007). The mechanism of action of isothiazolone biocides. *NACE - International Corrosion Conference Series*, *9*(1), 060901–0609017.

Yang, C., Sun, W., & Ao, X. (2020). Bacterial inactivation, DNA damage, and faster ATP degradation induced by ultraviolet disinfection. *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, *14*(1), 1–10. https://doi.org/10.1007/s11783-019-1192-6

Yao, Y., & Habimana, O. (2019). Biofilm research within irrigation water distribution systems: Trends, knowledge gaps, and future perspectives. *Science of the Total Environment*, *673*, 254–265. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.464

Zea, L., McLean, R. J., Rook, T. A., Angle, G., Carter, D. L., Delegard, A., Denvir, A., Gerlach, R., Gorti, S., McIlwaine, D., Nur, M., Peyton, B., Stewart, P. S., Sturman, P., & Velez Justiniano, Y. A. (2020). Potential Biofilm Control Strategies for Extended Spaceflight Missions. *Biofilm*, 100026. https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2020.100026

Zhou, X., Li, Z., Lan, J., Yan, Y., & Zhu, N. (2016). Kinetics of inactivation and photoreactivation of Escherichia coli using ultrasound-enhanced UV-C light-emitting diodes disinfection. *Ultrasonics Sonochemistry*, *35*, 471–477. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.10.028

Zou, X. Y., Lin, Y. L., Xu, B., Cao, T. C., Tang, Y. L., Pan, Y., Gao, Z. C., & Gao, N. Y. (2019). Enhanced inactivation of E. coli by pulsed UV-LED irradiation during water disinfection. *Science of the Total Environment*, *650*, 210–215. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.367

Apêndice A - Heterotróficos totais

Na Tabela A.1 estão presentes os resultados obtidos nos 3 ensaios para os 4 pontos de amostragem, a partir das contagens em placa (UFC/100 mL) para o método das membranas filtrantes, após 6 dias de incubação a 30 ºC.

Tabela A.1 - Resultados das contagens em placa (UFC/100mL) para o método das membranas filtrantes, após 6 dias de incubação, para os 4 pontos de amostragem.

Data da amostragem – Data da contagem em placa	Ponto de amostragem	UFC/100 mL a 30 ºC	Log_{10} UFC/100 mL
10/03/2020 – 16/03/2020	**1**	$1,2 \times 10^5$	5,057
03/07/2020 – 09/07/2020		$3,7 \times 10^4$	4,568
10/07/2020 – 16/07/2020		$2,4 \times 10^4$	4,359
10/03/2020 – 16/03/2020	**2**	$2,7 \times 10^3$	3,431
03/07/2020 – 09/07/2020		$1,2 \times 10^2$	2,057
10/07/2020 – 16/07/2020		< LD[1]	< LD[1]
10/03/2020 – 16/03/2020	**3**	$1,4 \times 10^3$	3,145
03/07/2020 – 09/07/2020		$2,6 \times 10^3$	3,404
10/07/2020 – 16/07/2020		$8,5 \times 10^2$	2,929
10/03/2020 – 16/03/2020	**4**	$2,5 \times 10^3$	3,389
03/07/2020 – 09/07/2020		$1,5 \times 10^3$	3,172
10/07/2020 – 16/07/2020		$5,9 \times 10^2$	2,625

[1] LD (Limite de deteção) = 0,5/100 mL

Na Figura A.1 é possível comparar os resultados obtidos nos 4 pontos de amostragem, ao longo dos 3 ensaios.

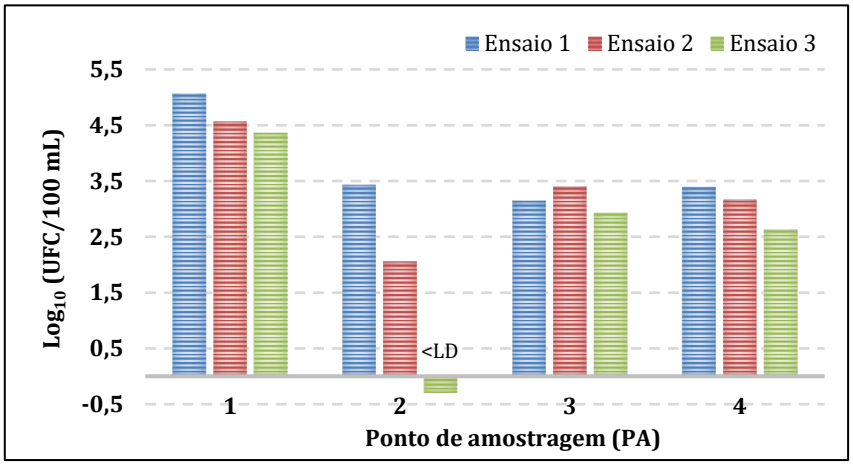


Figura A.1 - Resultados das contagens em placa (UFC/100 mL), após 6 dias de incubação, para os 4 pontos de amostragem.

Apêndice B - Extração de DNA

Na Tabela B.1 encontram-se algumas características do *kit* utilizado para extrair o DNA de todas as amostras.

Tabela B.1 - Características do GRS Genomic DNA Kit Bacteria da Grisp® (Grisp, n.d.).

***GRS Genomic DNA Kit Bacteria* da Grisp®**	
Amostra	0,5-2,0 mL de cultura celular com menos 1×10^9 células (Gram positivas ou Gram negativas)
Componentes	Buffer G+, Lisozima, Proteinase K, Buffer GN, Buffer BL, RNase A, Etanol, Wash Buffer 1 e 2, Elution Buffer
Rendimento esperado	25-30 µg (1×10^9 de *Escherichia coli*) 10-15 µg (1×10^9 de *Bacillus subtilis*)
Formato	Mini coluna de rotação
Tempo de operação	Inferior a 60 minutos
Volume de eluição	30-200 µL

Apêndice C – Quantificação de DNA

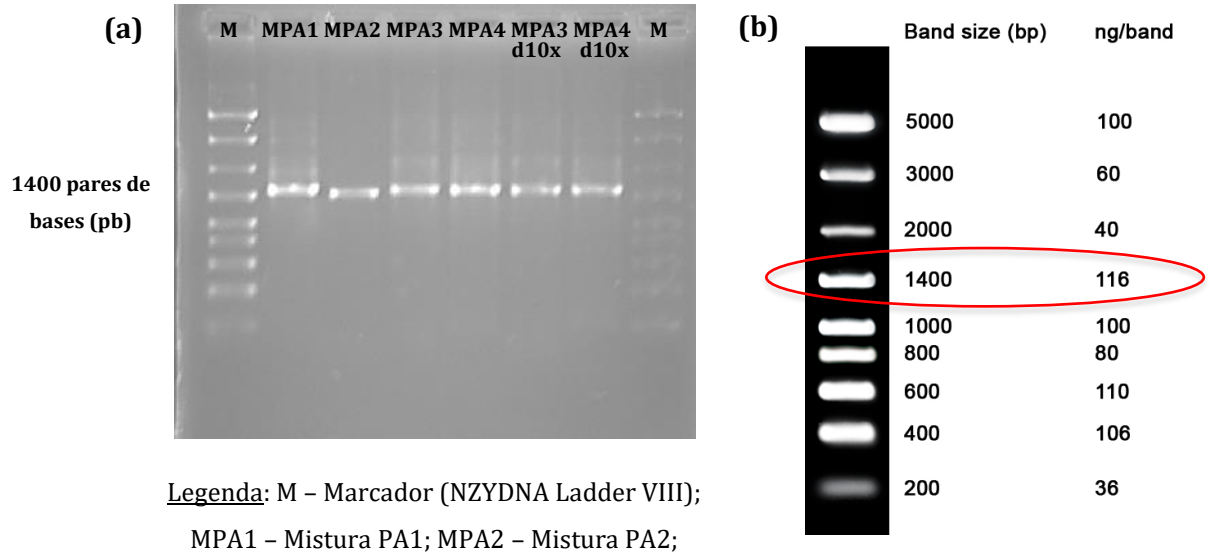
Após a extração de DNA com o auxílio do *GRS Genomic DNA Kit Bacteria* da Grisp[3] foi possível quantificar o DNA presente em cada uma das amostras obtidas (Tabela C.1).

Tabela C.1 - Quantificação das misturas e amostras obtidas em cada um dos ensaios em separado para o ponto de amostragem 1 (PA1), 2 (PA2), 3 (PA3) e 4 (PA4) em termos de µg DNA.mL^{-1}.

Quantificação das amostras (µg DNA.mL^{-1})		
Ensaio 1	PA1 (100mL/A)	5,37
	PA1 (100mL/B)	6,80
	PA2 (100mL/A+B)	26,9
	PA3 (100mL/A)	174,4
	PA4 (10mL/A)	63,8
Ensaio 2	PA1 (100mL/A+B)	5,57
	PA2 (100mL/A+B)	13,0
	PA3 (100mL/A+B)	17,3
	PA4 (100mL/A+B)	23,5
Ensaio 3	PA1 (100mL/A)	10,8
	PA3 (100mL/A+B)	10,4
	PA4 (100mL/A+B)	91,6
MPA1 (*pool* de 3 amostras)		6,08
MPA2 (*pool* de 2 amostras)		19,4
MPA3 (*pool* de 3 amostras)		77,6
MPA4 (*pool* de 3 amostras)		57,9

Apêndice D - Eletroforese em gel

Após amplificação do gene rRNA 16S por PCR, a eletroforese em gel de agarose provocada pela aplicação de uma determinada corrente, permitiu a separação dos fragmentos de DNA, através da migração das partículas no gel. No decorrer da corrida no gel, os fragmentos de DNA carregados negativamente devido aos seus grupos fosfato, moveram-se na direção do elétrodo positivo e os fragmentos de DNA do mesmo tamanho migraram em conjunto formando bandas no gel de agarose. Após a imersão do gel no corante, como o brometo de etídeo, os fragmentos de DNA brilham quando expostos a radiação UV, sendo possível visualizar o DNA presente ao longo da extensão do gel como bandas, cada uma representando um grupo de fragmentos de DNA do mesmo tamanho. Na Figura D.1 (a) está presente a imagem obtida através do *software* Quantity One® como resultado da eletroforese em gel de agarose das amostras obtidas por PCR. O marcador de peso molecular utilizado apresenta diversas bandas com tamanhos entre os 200 e os 5000 pares de bases (pb), tal como se pode verificar na Figura D.1 (b).



Legenda: M – Marcador (NZYDNA Ladder VIII); MPA1 – Mistura PA1; MPA2 – Mistura PA2; MPA3 – Mistura PA3; MPA4 – Mistura PA4; d10x – diluição 10x

Figura D.1 - (a) Eletroforese em gel para as 4 misturas (pool dos diferentes ensaios) e para a diluição x10 da MPA3 e da MPA4; (b) NZYDNA Ladder VIII da Nzytech®.

Desta forma, foi possível inferir, por comparação com o marcador, o tamanho dos fragmentos presentes nas seis amostras analisadas. O fragmento esperado (gene rRNA 16S) apresenta cerca de 1500 pares de bases (pb) no seu comprimento. Assim sendo, por comparação com o marcador anteriormente referido que apresenta uma banda bem definida com um tamanho de 1400 pares de bases (pb), assume-se que foi possível amplificar o fragmento esperado para todas as amostras.

Apêndice E - Taxonomia e diversidade genómica

Nas Tabelas E.1 a E.4 encontra-se a informação retirada da plataforma *EzBioCloud* acerca da abundância relativa das espécies identificadas com base na sequência do gene rRNA 16S, após normalização de todas as amostras.

Tabela E.1 - Abundância relativa das espécies identificadas com base na sequência do gene rRNA 16S na amostra MPA1.

MPA1	
Espécie	**Proporção (%)**
Bacillus megaterium	43,0609
Enhydrobacter aerosaccus	2,6932
Mycobacterium farcinogenes	22,1431
Staphylococcus aureus	15,9801
Staphylococcus saprophyticus	12,687
Não classificado (< 2%)	3,4351

Tabela E.2 - Abundância relativa das espécies identificadas com base na sequência do gene rRNA 16S na amostra MPA2.

MPA2	
Espécie	**Proporção (%)**
Methylobacterium oryzae	96,3929
Mycobacterium farcinogenes	3,116
Não classificado (< 2%)	0,4916

Tabela E.3 - Abundância relativa das espécies identificadas com base na sequência do gene rRNA 16S na amostra MPA3.

MPA3	
Espécie	**Proporção (%)**
Blastomonas natatória	41,5188
Methylobacterium oryzae	5,2536
Mycobacterium farcinogenes	6,1337
Staphylococcus aureus	39,507
Não classificado (< 2%)	7,5868

Tabela E.4 - Abundância relativa das espécies identificadas com base na sequência do gene rRNA 16S na amostra MPA4.

MPA4	
Espécie	**Proporção (%)**
Methylobacterium oryzae	7,5646
Paenibacillus phoenicis	2,8637
Staphylococcus aureus	78,3252
Streptomyces scabiei	8,2809
Não classificado (< 2%)	2,9651