

Mariana de Almeida do Nascimento

**CINÉTICA DE DESINFECÇÃO VIRAL EM ÁGUA DE
CONSUMO HUMANO MEDIANTE EXPOSIÇÃO AO CLORO,
UTILIZANDO COMO MODELO O ADENOVÍRUS
RECOMBINANTE.**

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

Orientadora: Prof. Dr^a. Célia Regina Monte Barardi

Florianópolis
2014

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

Nascimento, Mariana de Almeida do
CINÉTICA DE DESINFECÇÃO VIRAL EM ÁGUA DE CONSUMO HUMANO
MEDIANTE EXPOSIÇÃO AO CLORO, UTILIZANDO COMO MODELO O
ADENOVÍRUS RECOMBINANTE. / Mariana de Almeida do
Nascimento ; orientadora, Célia Regina Monte Barardi -
Florianópolis, SC, 2014.
135 p.

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

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Adenovírus
recombinante. 3. Desinfecção por cloro. 4. Cultura
celular. 5. Água filtrada. I. Barardi, Célia Regina Monte.
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

Mariana de Almeida do Nascimento

**CINÉTICA DE DESINFECÇÃO VIRAL EM ÁGUA DE
CONSUMO HUMANO MEDIANTE EXPOSIÇÃO AO CLORO,
UTILIZANDO COMO MODELO O ADENOVÍRUS
RECOMBINANTE.**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação de Biotecnologia e Biociências.

Florianópolis, 21 de Fevereiro de 2014.

Prof. Marcelo Maraschin, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Célia Regina Monte Barardi, Dr.^a
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Maurício Sens, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Maria Inês Zanoli Sato, Dr.^a
CETESB

Prof.^a Maria Elisa Magri, Dr.^a
Universidade Federal de Lavras

Dedico este trabalho ...

*... a Deus e ao meu Anjo da Guarda que abrem sempre o meu caminho
com a sua luz.*

*... a minha família e ao meu amor Álvaro pelo exemplo, apoio,
companheirismo, compreensão e amor de sempre.*

AGRADECIMENTOS

*“Nenhuma história de vida é escrita sem a presença de
mãos amigas que se estendem em nossa direção”*

(autor desconhecido)

Agradeço primeiramente a Deus e ao meu Anjo da Guarda que estão sempre ao meu lado, iluminam o meu caminho e acrescentam beleza aos meus dias.

A minha família e ao meu amor Álvaro, pelo apoio, companheirismo, compreensão e amor de sempre, e por serem os melhores exemplos de generosidade e honestidade que alguém poderia ter.

A minha querida orientadora Célia, por me introduzir no mundo científico, por sempre acreditar em mim, pela orientação todos esses anos e pela oportunidade de tornar este trabalho possível! Muito obrigada!

Aos colegas do Laboratório de Virologia Aplicada, obrigada pela convivência, amizade, conselhos, ensinamentos compartilhados e “co-orientações internas”! Tenho certeza que conquistei amizades para a vida toda.

A querida Maria Elisa, pela valiosa ajuda, disponibilidade e por me mostrar que os cálculos, fórmulas e modelos não são tão assustadores quanto possam parecer! Muito obrigada por tudo!

Aos laboratórios vizinhos, pela prontidão em ajudar, emprestar materiais e especialmente ao LAMEB, pelo auxílio em inúmeras análises realizadas.

Ao professor Maurício Petrucio e aos seus alunos do Laboratório de Ecologia de Águas Continentais, pelo auxílio com as análises de nutrientes das amostras, bem como pelo empréstimo da Sonda Multiparâmetros.

A CASAN, especialmente ao Rafael Prim, pela prontidão em ajudar nas coletas das amostras e todo suporte necessário no diálogo com a Companhia, e a disponibilização de informações. Obrigada por tudo!

Ao professor Carlos Zanetti pela possibilidade da realização do Estágio de Docência sob sua supervisão, pela maravilhosa experiência, pelo privilégio de ter acompanhado as suas aulas e por compartilhar conosco as suas filosofias de vida, princípios e reflexões. Muito obrigada!

As minhas amadas amigas pela sincera amizade, e aquelas que mesmo acompanhando a distância o desenvolvimento deste trabalho me apoiaram, incentivaram e estão sempre em meus pensamentos!

Aos membros da banca pela disponibilidade, por avaliarem e melhorarem a qualidade deste trabalho com as valiosas sugestões.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, pela concessão da bolsa de Mestrado, ao CNPq pelo apoio financeiro e à Universidade Federal de Santa Catarina.

E a todos que participaram e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

No Brasil, a Portaria MS 2.914/2011 exige a ausência de coliformes totais e *E. coli* na água tratada, entretanto é fundamental que o tratamento seja eficiente para todos os microrganismos patogênicos. A desinfecção nas Estações de Tratamento de Água (ETA) é comumente realizada com cloro. O adenovírus recombinante (rAdV) expressa proteína verde fluorescente (GFP) quando se replica nas células HEK 293A, e foi escolhido, como um modelo para avaliar a eficiência de desinfecção em amostras de água filtradas de duas ETAs (Lagoa do Peri (pH 6.9) e Morro dos Quadros (pH 6.5)), a 15°C e 20°C e com 0,2 mg/L e 0,5 mg/L de cloro livre. O tampão livre de demanda de cloro (BDF) (pH 6.9 e 8.0) foi utilizado como controle. As amostras foram caracterizadas físico-quimicamente e quanto ao padrão bacteriológico. A partir da curva da expressão da GFP, foi escolhido o período de 24h pós-infecção para os ensaios de citometria de fluxo (FACS) e microscopia de fluorescência (MF). Após padronizadas, as técnicas apresentaram como limite de detecção a diluição viral de 10^{-4} (FACS) e 10^{-6} (MF), sendo a MF escolhida para averiguar a inativação de rAdV por cloro. A técnica de qPCR foi escolhida como método molecular. O tempo necessário para inativar $4\log_{10}$ de rAdV foi menor que 1 min (para 0,2 mg/L e 0,5 mg/L de cloro livre), utilizando MF, com exceção do BDF pH 8.0 (acima de 2,5 min para $4\log_{10}$). O pH (6,5, 6,9 e 8.0) exerceu grande influência na eficiência de desinfecção. O ensaio de qPCR não forneceu informações a respeito de rAdV inativado. Os dados foram modelados (Chick-Watson) e observado que os valores de Ct para inativação de $4\log_{10}$ foi menor que 0,25 para todas as condições experimentais, com exceção do BDF pH 8.0, com Ct acima de 1,249. Os valores de Ct são comparáveis aos reportados na literatura e menores do que os recomendados pela EPA. O modelo demonstrou ter se ajustado bem às condições experimentais realizadas e observadas. Também foram coletadas amostras de água tratada das ETAs (na saída da ETA e na rede de distribuição) e avaliado para coliformes totais, *E. coli* e adenovírus humano (HAdV), que foi detectado na rede de distribuição da ETA Morro dos Quadros ($2,75 \cdot 10^3$ UFP/L). Finalmente, foi possível comprovar que os adenovírus são rapidamente inativados em águas superficiais tratadas com cloro e que os adenovírus recombinantes mostraram-se bons modelos para esta avaliação.

Palavras-chave: Adenovírus recombinante, cloro, GFP, água filtrada, desinfecção, cultura celular.

ABSTRACT

In Brazil, the MS 2.914/2011 ordinance requires the absence of total coliforms and *E. coli* in treated water, however it is essential that water treatment is effective for all pathogens. Disinfection in Water Treatment Plants (WTP) is commonly performed with chlorine. The recombinant adenovirus (rAdV) expresses green fluorescent protein (GFP) when replicates in HEK 293A cells, and was chosen as a model to evaluate the efficiency of disinfection in filtered water samples from two WTP (Lagoa do Peri (pH 6.9) and Morro dos Quadros (pH 6.5)) under 15 ° C and 20 ° C with 0.2 mg/L and 0.5 mg/L free chlorine. Buffered demand free (BDF) (pH 6.9 and 8.0) was used as control. The samples were characterized physico-chemically as well for bacteriological standards. From curve of GFP expression, the 24-hour period post-infection for flow cytometry assays (FACS) analysis and fluorescence microscopy (FM) was selected. After standardized, techniques showed a detection limit for viral dilution of 10^{-4} (FACS) and 10^{-6} (FM) and FM was selected to investigate the decay of rAdV by chlorine. qPCR technique was employed as a molecular method. The time required to inactivate $4\log_{10}$ of rAdV was less than 1 min (for 0.2 mg/L and 0.5 mg/L) using FM, except for BDF pH 8.0 (up to 2.5 min for $4\log_{10}$). The pH (6.5, 6.9 and 8.0) had a great influence on the efficiency of disinfection. The qPCR assay was not able to provide information regarding rAdV inactivated. The data were modeled (Chick-Watson) and observed that the Ct values for inactivation of $4\log_{10}$ was less than 0.25 for all experimental conditions, except for the BDF pH 8.0, with Ct over 1.249. The Ct values are comparable to those reported in the literature and smaller than those recommended by EPA. The model proved to have adjusted well to the experimental conditions used and observed. Samples of treated water from WTP (at the output of WTP and the distribution network) were evaluated for total coliforms, *E. coli* and human adenovirus (HAdV), which was detected in the distribution network of WTP Morro dos Quadros ($2,75.10^3$ UFP/L). Finally, it was possible to prove that adenoviruses were rapidly inactivated in surface water treated with chlorine and that recombinant adenovirus proved to be good models for this evaluation.

Keywords: Recombinant adenovirus, chlorine, GFP, filtered water, disinfection, cell culture.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Distribuição de ácido hipocloroso e íon hipoclorito *versus* pH (AWWA,2006).....29
- Figura 2:** Localização da ETA Morro dos Quadros na grande Florianópolis, município de Palhoça (A), em destaque (B) e as instalações da ETA Morro dos Quadros (C).....32
- Figura 3:** Localização da ETA Lagoa do Peri em destaque no sul de Florianópolis (A) no Parque Municipal da Lagoa do Peri (B) e as instalações da ETA Lagoa do Peri (C).....33
- Figura 4:** Fluxograma geral do delineamento experimental deste trabalho.....45
- Figura 5:** Local de coleta da ETA Lagoa do Peri: Água filtrada coletada na torneira do laboratório da companhia de saneamento..... 46
- Figura 6:** Local de coleta da ETA Morro dos Quadros: Água coletada após filtragem ascendente.....47
- Figura 7:** Curva da expressão da GFP (excitação/emissão: 395/508 nm), com células HEK 293A infectadas com rAdV nos MOIs de 0,01, 0,1, 0,5, 1 e 10 e controle celular.....63
- Figura 8:** Histograma demonstrativo do limite de sensibilidade da citometria de fluxo do estoque viral diluído em meio de cultura celular. Controle celular (A), diluição 10^{-1} do estoque viral (B), diluição 10^{-2} do estoque viral (C), diluição 10^{-3} do estoque viral (D), diluição 10^{-4} do estoque viral (E), diluição 10^{-5} do estoque viral (F) e sobreposição dos histogramas A, B, C, D, E e F (G).....64
- Figura 9:** Demonstrativo da microscopia de fluorescência de células infectadas com rAdV. $8,3 \times 10^5$ UFF/mL (A), $8,3 \times 10^4$ UFF/mL (B), $8,3 \times 10^3$ UFF/mL (C) e controle celular (D). Aumento de 40x.66
- Figura 10:** Detecção de rAdV através das técnicas de citometria de fluxo (diluição máxima de 10^{-4}) e microscopia de fluorescência (diluição máxima de 10^{-6})66

Figura 11: Demanda de cloro livre do estoque viral e curva de decaimento de cloro livre nas amostras de água da ETA Morro dos Quadros e ETA Lagoa do Peri com 0,2 mg/L e 0,5 mg/L de cloro livre.....68

Figura 12: Estabilidade viral ao longo do tempo nas matrizes ETA Lagoa do Peri, ETA Morro dos Quadros, tampão BDF pH 6.9 e 8.0 à 20°C, avaliada por microscopia de fluorescência e qPCR69

Figura 13: Demonstração do ensaio de microscopia de fluorescência das células HEK 293A infectadas com rAdV. Controle positivo (tempo 0) (A), redução aproximada de $2\log_{10}$ (B), $3\log_{10}$ (C) e $4\log_{10}$ (D) (Aumento de 100x).70

Figura 14: Curva de decaimento de rAdV em tampão BDF com pH 8.0 a 20°C, submetido a concentrações de 0,2 mg/L e 0,5 mg/L de cloro livre, por qPCR e microscopia de fluorescência (MF).71

Figura 15: Curva de decaimento de rAdV em tampão BDF com pH 6.9 a 20°C, submetido a concentrações de 0,2 mg/L e 0,5 mg/L de cloro livre, por qPCR e microscopia de fluorescência (MF).71

Figura 16: Curva de decaimento de rAdV na amostra de água ETA Lagoa do Peri (pH 6.9) a 20°C (A) e 15°C (B), submetido a concentrações de 0,2 mg/L e 0,5 mg/L de cloro livre, por qPCR e microscopia de fluorescência (MF).72

Figura 17: Curva de decaimento de rAdV na amostra de água ETA Morro dos Quadros (pH 6.5) a 20°C (A) e 15°C (B), submetido a concentrações de 0,2 mg/L e 0,5 mg/L de cloro livre, por qPCR e microscopia de fluorescência (MF).....73

Figura 18: Valores de Ct observados para decaimento de rAdV em tampão BDF com pH 8.0 a 20°C por microscopia de fluorescência.....74

Figura 19: Valores de Ct observados para decaimento de rAdV em tampão BDF com pH 6.9 a 20°C por microscopia de fluorescência.....76

Figura 20: Valores de Ct observados para decaimento de rAdV na amostra de água ETA Lagoa do Peri (pH 6.9) a 20°C por microscopia de fluorescência.....77

Figura 21: Valores de Ct observados para decaimento de rAdV na amostra de água ETA Lagoa do Peri (pH 6.9) a 15°C por microscopia de fluorescência.....78

Figura 22: Valores de Ct observados para decaimento de rAdV na amostra de água ETA Morro dos Quadros (pH 6.5) a 20°C por microscopia de fluorescência.....79

Figura 23: Valores de Ct observados para decaimento de rAdV na amostra de água ETA Morro dos Quadros (pH 6.5) a 15°C por microscopia de fluorescência.....80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos das amostras de água filtrada da ETA Lagoa do Peri e ETA Morro dos Quadros. ETA Lagoa do Peri: coleta realizada 06/02/2013. ETA Morro dos Quadros: coleta realizada 02/08/2013.....	61
Tabela 2: Média do número e porcentagem de células fluorescentes do estoque viral diluído em meio de cultura celular e o limite de sensibilidade da citometria de fluxo.....	65
Tabela 3: Valores de Ct observados em duplicata para decaimento de rAdV no tampão BDF pH 8.0 a 20°C, por microscopia de fluorescência.....	75
Tabela 4: Valores de Ct observados em duplicata para decaimento de rAdV no tampão BDF pH 6.9 a 20°C, por microscopia de fluorescência.....	76
Tabela 5: Valores de Ct observados em duplicata para decaimento de rAdV na amostra de água ETA Lagoa do Peri a 20°C, por microscopia de fluorescência.	77
Tabela 6: Valores de Ct observados em duplicata para decaimento de rAdV na amostra de água ETA Lagoa do Peri a 15°C, por microscopia de fluorescência.	78
Tabela 7: Valores de Ct observados em duplicata para decaimento de rAdV na amostra de água ETA Morro dos Quadros a 20°C, por microscopia de fluorescência.	79
Tabela 8: Valores de Ct observados em duplicata para decaimento de rAdV na amostra de água ETA Morro dos Quadros à 15°C, por microscopia de fluorescência.	80
Tabela 9: Valor de k' (taxa de decaimento de cloro livre), k (taxa de inativação viral) e R^2 ($\ln(N/N_0)$ observado \times $\ln(N/N_0)$ modelo de Chick-Watson) determinados pelo modelo de Chick-Watson para cada condição experimental.	81

Tabela 10: Valores de Ct para inativação de rAdV por cloro livre determinado pelo modelo de Chick-Watson para cada condição experimental.82

Tabela 11: Análises das amostras de água tratada coletadas na saída da ETA Lagoa do Peri e ETA Morro dos Quadros e em um ponto na rede de distribuição de cada uma, quanto à viabilidade de HAdV, concentração de cloro livre (mg/L) e presença de coliformes totais e *E. coli*.84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- μ S** Microsiemens (unidade da condutividade elétrica)
A549 Células epiteliais de carcinoma de pulmão humano
ABES Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental
ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BDF Tampão livre de demanda de cloro
C(t) Concentração de cloro livre no tempo t
C₀ Concentração de cloro livre no tempo 0
CASAN Companhia Catarinense de Águas e Saneamento
CCL Lista de Candidatos a Contaminantes
cDNA DNA complementar
CG Cópias genômicas
Cl⁻ Íon cloreto
Cl₂ Cloro
ClO Cloro gasoso
CO₂ Gás carbônico
Ct Tempo de contato
DMEM ↑**G** Meio Mínimo Essencial Dulbecco com sais de Eagle's alta glicose
DMEM Meio Mínimo Essencial Dulbecco com sais de Eagle's
DPD N,N-dietil-p-fenilenediamina
E1 (E1A e E1B) Genes de expressão precoce
ECP Efeito citopático
ETA Estação de Tratamento de Água
FACS Citometria de Fluxo
FDA Filtração Direta Ascendente
FDD Filtração Direta Descendente
GFP Proteína Verde Fluorescente
H⁺ Íon hidrogênio
HAdV Adenovírus
HEK 293A Linhagem celular de rim embrionário humano
HOCI Ácido hipocloroso
IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
k Taxa constante de inativação
k' Taxa constante de decaimento de cloro livre
LIMA Laboratório Integrado de Meio Ambiente
Ln Logaritmo natural
MEM Meio Mínimo Essencial com sais de Eagle's
MF Microscopia de Fluorescência
MOI Multiplicidade de Infecção

MS Ministério da Saúde
n Coeficiente de diluição
N Concentração de vírus viáveis no tempo t
N₀ Concentração de vírus viáveis no tempo 0
NCl₃ Tricloramina
NH₂Cl Monocloramina
NH₃ Amônia
NHCl₂ Dicloramina
nm Nanômetros
NMP Número Mais Provável
NO₂⁻ Nitrito
NO₃⁻ Nitrato
OCl⁻ Íon hipoclorito
OMS Organização Mundial da Saúde
pb Pares de Bases
PBS Tampão Fosfato Salino
PCR Reação em Cadeia da Polimerase
PMISB Plano Municipal de Saneamento Básico
PSA Penicilina, Estreptomicina e Anfotericina
qPCR PCR quantitativo (em tempo real)
rAdV Adenovírus recombinante
SFB Soro fetal bovino
THM Trihalometanos
UFF Unidade Formadora de Foco
UFP Unidade Formadora de Placa
UN Nações Unidas
UNICEF Fundo das Nações Unidas para a Infância
URF Unidade Relativa de Fluorescência
USEPA Agência Norte Americana de Proteção do Meio Ambiente
uT Unidade de Turbidez (unidade do parâmetro de turbidez)
UV Radiação Ultravioleta

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO	25
1.1. Saneamento e Saúde.....	25
1.2. Tratamento de Água: Desinfecção por cloro.....	26
1.3. Cloro residual livre: Ácido hipocloroso e Íon hipoclorito.....	28
1.4. Estações de Tratamento de Água.....	29
1.4.1. ETA Morro dos Quadros	30
1.4.2. ETA Lagoa do Peri.....	32
1.5. Regulamentação sobre o tempo de contato (<i>Ct</i>)	33
1.6. Vírus entéricos.....	34
1.6.1. Adenovírus humanos (HAdV).....	35
1.6.1.1. Adenovírus humano recombinante (rAdV).....	38
1.7. Métodos de concentração e detecção viral.....	38
2. HIPÓTESE	41
3. OBJETIVOS	43
3.1. Objetivo Geral	43
3.2. Objetivos Específicos	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1. Coletas de água	46
4.1.1. Coleta de água filtrada para os ensaios de desinfecção por cloro.....	46
4.1.2. Coleta e concentração de água tratada	47
4.2. Avaliação dos parâmetros físico-químicos.....	48
4.3. Análise de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	49
4.4. Preparação do estoque viral de rAdV para as sementeiras nas águas	49
4.5. Purificação do fluido viral de adenovírus recombinante (rAdV).....	50
4.6. Ensaio de citotoxicidade.....	51
4.7. Curva da expressão da GFP.....	52
4.8. Avaliação da infecciosidade viral por cultura celular.....	53
4.8.1. Ensaio de Citometria de Fluxo (FACS).....	53
4.8.2. Microscopia de Fluorescência (MF).....	54
4.9. Limite de sensibilidade e influência da amostra nas metodologias de cultura celular	54
4.10. Extração do material genético viral.....	55

4.11. Detecção e quantificação de cópias genômicas por PCR em tempo real (qPCR).....	55
4.12. Reagentes e preparo da vidraria.....	56
4.13. Desinfecção viral em águas tratadas com cloro	56
4.13.1. Curva de decaimento de cloro livre nas matrizes.....	57
4.13.2. Demanda de cloro livre e curva de decaimento de cloro livre com estoque viral.....	57
4.13.3. Controle positivo	58
4.13.4. Decaimento viral por cloro livre.....	58
4.14. Ensaio de Formação de Placa de Lise.....	58
4.15. Modelagem da cinética de desinfecção	59
4.16. Análises estatísticas.....	60
5. RESULTADOS	61
5.1. Parâmetros Físico-Químicos da amostra de água da ETA Lagoa do Peri e ETA Morro dos Quadros.....	61
5.2. Análise de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	61
5.3. Título do rAdV purificado	62
5.4. Citotoxicidade da amostra.....	62
5.5. Curva da expressão da GFP.....	62
5.6. Limite de sensibilidade e influência da amostra nas metodologias de cultura celular	63
5.6.1. Citometria de Fluxo.....	63
5.6.2. Microscopia de fluorescência.....	65
5.7. Desinfecção viral em águas tratadas com cloro	67
5.7.1. Ensaio de decaimento de cloro livre nas matrizes.....	67
5.7.2. Demanda de cloro livre do estoque viral e curva de decaimento de cloro livre.....	67
5.7.3. Controle positivo	68
5.7.4. Decaimento viral por cloro livre.....	69
5.8. Modelagem da cinética de desinfecção.....	79
5.9. Avaliação das amostras de água tratadas quanto à viabilidade de HAdV, concentração de cloro livre e colimetria.....	83
6. DISCUSSÃO.....	85
7. SUMÁRIO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS.....	97
8. CONCLUSÃO GERAL.....	99
9. REFERÊNCIAS.....	101
10. APÊNDICES	117

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1. Saneamento e Saúde

É mundialmente aceito que saneamento e água potável são essenciais para a vida, dignidade e desenvolvimento humano (WHO; UN, 2012). O último relatório da OMS & UNICEF sobre o progresso no saneamento e distribuição de água potável apontou que, em 2011, 2,5 bilhões de pessoas não tinham acesso às instalações sanitárias adequadas. Destas, 761 milhões usavam instalações públicas ou compartilhadas, outras 693 milhões utilizavam instalações sem o padrão mínimo de higiene, enquanto um bilhão de pessoas (cerca de 15% da população mundial) ainda pratica a defecação a céu aberto. Além disso, cerca de 768 milhões de pessoas não tem acesso à fonte de água potável (WHO; UNICEF, 2013).

Considerando que o serviço de saneamento compreende (1) abastecimento de água por rede pública, (2) esgotamento sanitário por rede pública ou por sistema de saneamento individualizado e (3) coleta de lixo, o poder público na gestão das condições de vida da população brasileira ofereceu em 2008 a 58,9 % dos domicílios urbanos e a somente 5,8 % dos domicílios rurais o acesso ao serviço de coleta de esgoto (IBGE, 2010).

Entretanto, a coleta de esgoto não significa que este dejetos depois de coletado seja tratado, o que revela que o sistema público atualmente é insuficiente para atender à demanda populacional. Em contrapartida, o percentual de água distribuída que não recebe nenhum tipo de tratamento é de somente 7,1% (IBGE, 2011). Apesar da problemática de acesso ao serviço de tratamento de esgoto ser muito grande, a falta de acesso à água potável provoca impactos significativos na saúde da população.

Como consequência deste cenário, os principais problemas ambientais advindos da falta de saneamento ou saneamento inadequado podem ser aqui listados: poluição/contaminação na captação de água para o abastecimento humano, poluição de rios/lagos/lagoas/aquíferos, doenças, erosão acelerada, assoreamento e inundações frequentes (IBGE, 2011).

Quanto à problemática em relação à saúde pública, bilhões de pessoas se expõem ao risco de doenças relacionadas à falta de água potável, saneamento inadequado e baixa higiene, principalmente no que se refere à diarreia, que em 2011, matou 2 milhões de pessoas e causou 4 bilhões de episódios de enfermidades (WHO; UN, 2012). De modo

geral, 88% das mortes por diarreia são atribuídas à falta de saneamento, visto que estudos têm associado que melhorias nas instalações sanitárias reduzem a incidência de diarreia em torno de 36% (WHO; UNICEF, 2009). Atualmente os vírus entéricos são considerados os principais agentes causais de doenças de veiculação hídrica, responsáveis por 30 a 90% das gastroenterites no mundo (BOSCH et al., 2008).

No Brasil, a Portaria do Ministério da Saúde 2.914/2011 estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Dentre os padrões microbiológicos, há *exigência* na avaliação de *Escherichia coli* ou coliformes termotolerantes, com sua ausência em 100 mL na água tratada e somente a *recomendação* para avaliação dos vírus entéricos no manancial de abastecimento de água (ANVISA, 2011).

Neste contexto, a Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental (ABES) propõe a realização obrigatória de pesquisa para os vírus entéricos (ABES, 2010), uma vez que diversos estudos indicam maior labilidade das bactérias se comparadas aos vírus, quanto à interferência dos fatores ambientais, como a radiação solar, e aos processos de tratamento de água (THURSTON-ENRIQUEZ *et al.*, 2003; HUSMAN *et al.*, 2009; SINCLAIR; JONES; GERBA, 2009), além de haver uma baixa correlação da presença de bactérias com outros patógenos (CONTRERAS-COLL *et al.*, 2002; HORMAN *et al.*, 2004). Desta forma, é extremamente importante que o tratamento de água destinada ao consumo humano seja eficiente para todos os microrganismos patogênicos presentes no manancial de abastecimento, e não somente para os padrões bacteriológicos.

1.2. Tratamento de Água: Desinfecção por cloro

Em meados de 1880 com a Teoria da “Doença dos Germes”, pensava-se que os maus odores eram responsáveis pela transmissão de doenças, logo o controle desses odores limitaria a propagação de doenças e a primeira aplicação do cloro foi utilizada com esse objetivo (BAYLIS, 1935 *in*: AWWA, 2006). Em 1902 a Bélgica iniciou o primeiro uso *contínuo* do cloro para desinfecção de água, que tinha como objetivo facilitar a coagulação e tornar a água biologicamente segura. A prática então foi declarada segura para a saúde pública e esta ação promoveu uma rápida extensão para o abastecimento público de água para outras cidades no mundo (AWWA, 2006).

Relata-se que os sistemas de distribuição de água dos Estados Unidos da América nos anos de 1800 eram responsáveis por disseminar regularmente doenças de veiculação hídrica, como febre tifoide, disenteria e cólera, com 25.000 mortes por febre tifoide em 1900. Após o início do uso do cloro como desinfetante, ocorreu uma abrupta diminuição no número de casos, com menos de 20 mortes em 1960 (LAUBUSCH, 1964 *in*: AWWA, 2006), e o mesmo padrão de diminuição pode ser observado para os outros microrganismos. Desta forma, o cloro emergiu como desinfetante de escolha primária pela sua efetividade, eficiência, economia de operação, conveniência e persistência de cloro residual (AWWA, 2006).

Na Holanda, em meados de 1970, Rook identificou que a reação do cloro com os materiais orgânicos: ácido húmico e ácido fúlvico (derivados do crescimento vegetativo, encontrados no escoamento de agricultura, aquíferos e em vegetação natural) dissolvidos na água produzia uma classe de compostos chamados trihalometanos (THM) (CONNELL, 1996 *in*: AWWA, 2006). Posteriormente, os THM foram identificados como possíveis agentes causais de doenças no fígado, rins, sistema nervoso central, assim como agente causador de câncer. Esta descoberta em água de consumo levantou preocupações sobre a cloração (RICHARDSON; TERNES, 2005; AWWA, 2006; KRASNER *et al.*, 2006).

No entanto, discute-se que pode haver mais riscos do que benefícios em substituição do cloro por outros agentes de desinfecção, uma vez que a incidência de doenças transmitidas pela água diminuiu significativamente após a aplicação de cloro tornar-se um procedimento de rotina para desinfecção da água (MEYER, 1994).

Desta forma, pesquisadores iniciaram investigações a respeito das concentrações de THM consideradas aceitáveis e os métodos para reduzir ou prevenir a sua formação, o que gerou dados suficientes para nortear os órgãos regulatórios na Europa e América do Norte a chegarem a um consenso sobre formas de minimizar a formação de THM. Desta forma, a USEPA estabeleceu valores máximos aceitáveis de THM de 0,08 mg/L (USEPA, 2010), enquanto no Brasil a portaria do MS 2.914/2011 estabelece o valor de 0,1 mg/L (ANVISA, 2011).

As principais medidas adotadas para minimizar a formação de THM são: (1) clarificação da água por coagulação, decantação e filtração na Estação de Tratamento de Água, que ao reduzir a turbidez da água também remove os compostos orgânicos precursores de THM; (2) monitoramento periódico da concentração de precursores de THM no manancial, indicando medidas de controle a serem tomadas

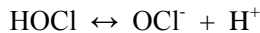
previamente; (3) oxidação dos precursores de THM, com adição de dióxido de cloro, ozônio, permanganato de potássio, radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio; (4) adsorção em carvão ativado em pó ou granular, que remove tanto os precursores quanto os THM e (5) aeração, removendo os THM formados (MEYER, 1994; USEPA, 2002).

1.3. Cloro residual livre: Ácido hipocloroso e Íon hipoclorito

O cloro (Cl_2) quando adicionado a uma água quimicamente pura se dissocia em ácido hipocloroso (HOCl), íons hidrogênio (H^+) e cloreto (Cl^-):



Uma vez formado o ácido hipocloroso (HOCl) o mesmo se dissocia rapidamente em íon hipoclorito (OCl^-) e íon hidrogênio (H^+) (AWWA, 2006):



O ácido hipocloroso (HOCl) e o íon hipoclorito (OCl^-) são conhecidos como as formas de cloro residual livre (DEGRÉMONT, 1979 *in*: AWWA, 2006). A distribuição de HOCl e OCl^- é dependente do pH, como demonstrado na Figura 1.

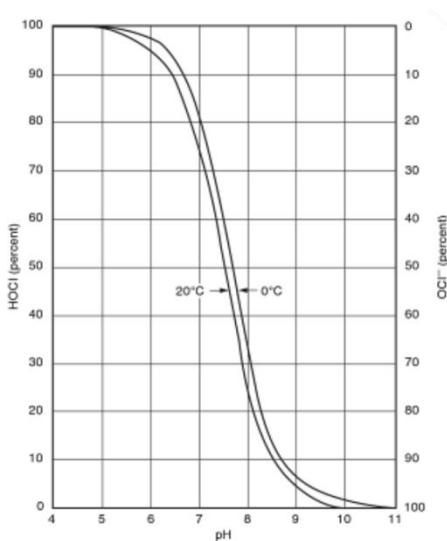


Figura 1. Distribuição de ácido hipocloroso e íon hipoclorito *versus* pH (AWWA, 2006).

As formas de cloro residual livre (HOCl e OCl^-) apresentam diferenças significativas em sua reatividade, e por isso pode-se concluir que a eficiência no processo de desinfecção varia dependendo do pH da água (MEYER, 1994; KRASNER *et al.*, 2006). O HOCl desinfeta cerca de 100 vezes mais rápido e oxida compostos que o OCl^- não faria, apesar de ser consumido em maior taxa. Desta forma, quando o HOCl é consumido o OCl^- age como um tampão adicionando mais HOCl , reequilibrando a equação (AWWA, 2006).

A eficiência germicida do HOCl em relação ao OCl^- é principalmente atribuída a (1) sua carga neutra, que permite à molécula maior facilidade de penetrar em superfícies de carga negativa (bactérias e vírus), (2) pela forte capacidade de oxidação, (3) pela interação com as proteínas do capsídeo e (4) pela interação com ácidos nucleicos (MEYER, 1994; CHEREMISINOFF, 2002; NUANUALSUWAN; CLIVER., 2003; PAGE; SHISLER; MARINÁS, 2010).

1.4. Estações de Tratamento de Água

O processo de tratamento de água convencionalmente envolve as seguintes etapas (USEPA, 2004):

- i) **Coagulação:** A água bruta recebe a adição de Sulfato de Alumínio ou outros agentes coagulantes, que leva à formação de flocos que atraem as partículas de sujeira;
- ii) **Decantação:** Nesta etapa, o peso dos flocos provoca a decantação dos mesmos, facilitando a retirada de matéria orgânica e metais da água e a água clarificada segue para filtração;
- iii) **Filtração:** A água passa por filtros compostos por camadas de carvão, antracito e pedregulho, com objetivo de retirar partículas ainda menores;
- iv) **Desinfecção:** Nesta etapa, ocorre a adição de cloro ou outro desinfetante, utilizada para eliminar microrganismos presentes na água. Além disso, no mesmo compartimento ocorre a adição de flúor e correção do pH da água;
- v) **Estocagem:** A água permanece em um reservatório onde fica em contato com o desinfetante por mais tempo e em seguida é distribuída à população.

O abastecimento de água potável do município de Florianópolis é gerenciado pela concessionária CASAN - Companhia Catarinense de Águas e Saneamento, com sistemas de Estações de Tratamento de Água (ETA) denominadas Sistema Norte, Costa Sul-Leste e Integrado da Grande Florianópolis (PMISB, 2011).

Os produtos químicos utilizados nas ETAs são o Sulfato de Alumínio, para promover coagulação de matéria orgânica e inorgânica, o Cloro gasoso (ClO) como desinfetante, o fluossilicato de sódio e o ácido fluossilícico com a finalidade de fluoretação da água e cal hidratada para correção de pH (CASAN 2011, 2012).

1.4.1. ETA Morro dos Quadros

A ETA Morro dos Quadros está localizada no município de Palhoça, está incluída no Sistema Integrado da Grande Florianópolis e utiliza como mananciais de abastecimento o Rio Vargem do Braço (ou Rio Pilões) e o Rio Cubatão do Sul (figura 2).

O Rio Pilões é o principal manancial que abastece esta ETA, tem a sua captação em Santo Amaro da Imperatriz, na Unidade de Conservação da Serra do Tabuleiro e é considerado um manancial com pouco impacto antrópico. Em períodos de estiagem, o Rio Cubatão do Sul cuja captação é em Palhoça, é utilizado como alternativa visto que esta água tem característica de cor e turbidez mais elevada do que o Rio Pilões (CASAN, 2012).

Esta ETA tem capacidade de filtrar 2.400 L/s e abastece cerca de 700.000 habitantes das cidades de Santo Amaro da Imperatriz, Palhoça, São José, Biguaçu e parte de Florianópolis (CASAN, 2012).

Como característica diferencial, a ETA Morro dos Quadros utiliza a tecnologia de Filtração Direta Ascendente (FDA). Os filtros ascendentes são constituídos por uma camada espessa de areia (cerca de 2 metros de espessura) colocado sobre uma camada suporte de seixos rolados (cerca de 60 centímetros) e a água escoar no sentido de baixo para cima. Neste sistema, a água coagulada não necessita da Decantação, já que esta etapa se realiza satisfatoriamente no próprio meio filtrante: à medida que a água coagulada atravessa o meio, as impurezas vão sendo parcialmente retidas e em parte deslocadas sob a forma de flocos, de uma subcamada para a seguinte, onde ocorre retenção e um novo deslocamento parcial (CASAN, 2012).

A principal limitação da FDA é o tratamento de águas com elevados teores de sólidos, que podem fazer com que os filtros fiquem bloqueados rapidamente. Nesses casos, a necessidade de lavagem dos filtros pode tornar-se muito frequente e exige monitoramento constante da qualidade da água (CASAN, 2012).



Figura 2. Localização da ETA Morro dos Quadros na grande Florianópolis, município de Palhoça (A), em destaque (B) e as instalações da ETA Morro dos Quadros (C).

1.4.2. ETA Lagoa do Peri

A ETA Lagoa do Peri está incluída no Sistema Costa Sul-Leste e utiliza como manancial a Lagoa do Peri. Está localizada na parte sudeste da Ilha de Santa Catarina, inserida no Parque Municipal da Lagoa do Peri (figura 3). Este corpo d'água se constitui no maior manancial de água doce da Ilha de Santa Catarina, possui um volume de $21,2 \times 10^6 \text{ m}^3$, uma área superficial de $5,7 \text{ km}^2$, com profundidade máxima de 11,0 metros e profundidade média de 4,2 metros (PMISB, 2011; FONTES *et al.*, 2013).

Além de ser utilizado como manancial de abastecimento, também é usufruído de forma recreacional, visitada principalmente nos meses de verão por moradores e turistas.

A ETA Lagoa do Peri possui capacidade de filtrar 200 L/s e abastece cerca de 110.000 habitantes de Florianópolis, incluindo o sul da ilha, Lagoa da Conceição e Barra da Lagoa (CASAN, 2011).

Possui somente as etapas de Coagulação, Filtração e Desinfecção, visto que a filtração é feita pela tecnologia de Filtração Direta Descendente (FDD) (água escoo no sentido de cima para baixo), que dispensa a etapa de Decantação. Essa forma de tratamento é

empregada para águas com baixa turbidez, e também é um método de escolha principalmente pela diminuição de custos (infraestrutura, operação e manutenção, reagentes coagulantes, energia elétrica) e produz menor volume de lodo (CASAN, 2011).

A principal limitação da FDD é o tratamento de águas com elevados teores de sólidos, exigindo monitoramento constante da qualidade da água (CASAN, 2011).

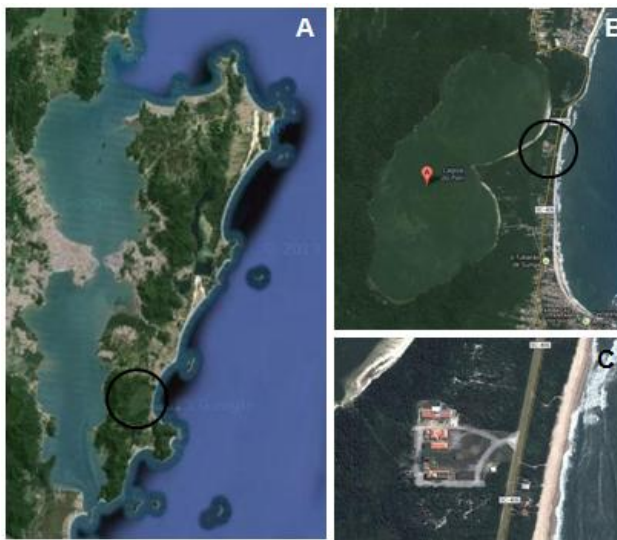


Figura 3. Localização da ETA Lagoa do Peri em destaque no sul de Florianópolis (A) no Parque Municipal da Lagoa do Peri (B) e as instalações da ETA Lagoa do Peri (C).

1.5. Regulamentação sobre o tempo de contato (Ct)

Em 1991, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (USEPA) publicou o *Manual de Orientação para Cumprimento de Requisitos de filtração e desinfecção para sistemas públicos de água que utilizam fontes de água superficial*, preconizando que os vírus entéricos devem ser removidos ou inativados em $4\log_{10}$ (99,99%) por filtração e/ou desinfecção. Nesta mesma publicação, recomenda-se valores de Tempo de Contato - Ct (concentração do desinfetante (mg/L) X tempo (min)) de 4, 6 e 8 para alcançar uma

inativação de $2\log_{10}$, $3\log_{10}$, e $4\log_{10}$, respectivamente utilizando cloro livre a 5°C e pH de 6 a 9 (USEPA, 1991).

Entretanto, os valores estabelecidos por este manual foram baseados em estudos utilizando o vírus da hepatite A em tampão livre de demanda de cloro, sob temperatura de 5°C . Como a qualidade da água pode afetar significativamente a eficácia de desinfecção por cloro (KAHLER *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011), não está claro se esses valores de *Ct* recomendados pelo manual são suficientes para inativação de outros patógenos virais em fontes de águas superficiais, realmente utilizadas para desinfecção e posterior consumo humano.

1.6. Vírus entéricos

Os vírus entéricos encontram-se distribuídos em todo planeta e são conhecidos por causarem um grande número de doenças, entre elas as gastroenterites, meningites, miocardites, pneumonias, paralisias e hepatites infecciosas (KOCWA-HALUCH, 2001).

Estão associados com baixa higiene e condições sanitárias precárias e são disseminados via esgoto tratado ou não tratado, pelo despejo de dejetos animal ou diretamente de humanos ou animais (WYN-JONES *et al.*, 2011) que, de alguma forma, entram em contato com corpos d'água. Este corpo d'água se utilizado como local de recreação, manancial de abastecimento, fonte de irrigação de plantas ou ainda como local de cultivo de moluscos, pode acometer indivíduos suscetíveis, iniciando um novo ciclo de infecção e propagação viral.

Os vírus entéricos são formados basicamente por material genético (DNA ou RNA) envolto por uma camada de proteínas, chamada de capsídeo. A ausência de um envelope lipídico os torna mais resistentes às condições adversas do ambiente, visto que vírus envelopados possuem ancorado nesse as proteínas de interação vírus-célula hospedeira, e uma vez degradado esse envelope, o vírus perde a capacidade de infecção. Desta forma, possuir o capsídeo como envoltório externo permite maior resistência às condições adversas do ambiente (degradação por nucleases, umidade, pH, radiação UV e temperatura), conservando tanto as proteínas de interação com a superfície da célula hospedeira como o material genético viral (RODRÍGUEZ; PEPPER; GERBA, 2009).

A literatura reporta que os vírus entéricos podem sobreviver no ambiente numa ampla gama de pH e por extensos períodos, chegando a 130 dias em água do mar (JIANG; NOBLE; CHUI, 2001), 120 dias em água doce e esgoto, até 100 dias em solo (USEPA, 1992) e 300 dias para

adenovírus em água superficial (RIGOTTO *et al.*, 2011). Ainda, é descrito que a associação com partículas sólidas no ambiente aumenta a estabilidade dos vírus entéricos por protegê-lo de enzimas e outros fatores degradantes (GANTZER *et al.*, 1998; MESCHKE; SOBSEY, 1998; BOSCH, 2007). Sabe-se que esses períodos superam o reportado para coliformes fecais e outros indicadores bacterianos em ambientes similares (MELNICK; GERBA, 1989).

Além disso, os vírus entéricos são geralmente mais resistentes ao tratamento convencional de águas por cloração e filtração do que as bactérias enteropatogênicas (JIANG; NOBLE; CHUI, 2001; FUJIOKA; YONEYAMA, 2002) e não há potencial de replicação dos mesmos nesse ambiente, visto que os vírus são parasitas celulares obrigatórios, permanecendo no ambiente na mesma quantidade que quando excretados. Desta forma, os vírus entéricos possuem potencial de serem usados como indicadores de qualidade da água (FONG; LIPP, 2005).

Posterior à infecção, os vírus entéricos replicam-se inicialmente no trato gastrointestinal e são comumente excretados em altas concentrações nas fezes, de 10^5 a 10^{11} partículas virais por grama de fezes (BOSCH, 1998), sendo então capazes de disseminar-se pelo ambiente. Os surtos ocorrem ocasionalmente em indivíduos suscetíveis, como em crianças e imunodeficientes, e a dose infectante necessária para iniciar uma infecção é extremamente baixa (HAAS *et al.*, 1993; LINDESMITH *et al.*, 2003).

1.6.1. Adenovírus humanos (HAdV)

Os adenovírus humanos (HAdV) pertencem à família Adenoviridae, gênero *Mastadenovirus*, que contém 57 sorotipos (KING *et al.*, 2011) divididos em seis espécies (A-F), de acordo com a similaridade da sequência de DNA, por padrão de hemaglutinação e pela neutralização por anticorpos (NEMEROW *et al.*, 2008).

As características estruturais se referem à ausência de envelope lipídico, capsídeo de simetria icosaédrica composto por proteínas *hexon* e *penton*. Nesse último, são projetadas fibras responsáveis pela interação com a célula hospedeira. O material genético viral é composto por DNA de fita dupla não segmentado (26 a 45 Kb) associado a proteínas e o tamanho médio da partícula viral é de 90 nm (WOLD; HORWITZ *in*: KNIPE; HOWLEY, 2007).

O genoma dos HAdV é composto por 5 genes de expressão precoce (E1A, E1B, E2, E3 e E4), 3 genes de expressão de início retardada (IX, IVa2 e E2 *late*) e uma região gênica de expressão tardia, a

qual é processada para gerar 5 famílias de mRNA (L1, L2, L3, L4 e L5), relacionados com a expressão e montagem de proteínas do capsídeo viral. As funções dos genes de expressão precoce estão descritas em Wold e Horwitz (WOLD; HORWITZ *in*: KNIPE; HOWLEY, 2007) e podem ser sumarizadas da seguinte maneira:

- E1A: codifica para duas proteínas que ativam a transcrição e induzem a célula hospedeira a entrar na fase S do ciclo celular (fase de duplicação do material genético);
- E1B: codifica para duas proteínas que são responsáveis por bloquear a apoptose na célula infectada;
- E2: codifica para três proteínas com função na replicação do DNA viral;
- E3: codifica para proteínas que modulam a resposta imune do hospedeiro à infecção;
- E4: codifica para proteínas relacionadas à regulação da transcrição, tradução e exportação do mRNA do núcleo, além de modular a replicação do DNA e apoptose.

Após adsorção na célula hospedeira via interação fibra viral e receptor celular CAR (receptor de Coxsackievirus-Adenovirus), o adenovírus é internalizado via endocitose e é transportado até o núcleo celular, local onde o DNA é liberado, iniciando o processo de replicação viral (WOLD; HORWITZ *in*: KNIPE; HOWLEY, 2007; NEMEROW *et al.*, 2008).

Atualmente, são reconhecidos como agentes etiológicos causadores de múltiplas doenças, como infecções gastrointestinais, genitais, no trato respiratório, no globo ocular e no sistema nervoso central (WOLD; HORWITZ *in*: KNIPE; HOWLEY, 2007). Entretanto, sabe-se que todos os sorotipos podem ser excretados via fezes sem, no entanto, desenvolver quadro de gastroenterite (inclusive em casos assintomáticos), em concentrações na ordem de até 10^{11} partículas virais por grama de fezes, sendo esta a principal via de transmissão do vírus (FARTHING, 1989 *in*: FONG; LIPP, 2005). Além disso, podem ser transmitidos via inalatória (aerossóis) e contato pessoa-pessoa (JIANG; NOBLE; CHUI, 2001).

Desta forma, o HAdV pode entrar em contato com o ambiente por meio de dejetos e secreções humanas sem o devido tratamento e provocar a infecção em um indivíduo suscetível.

HAdV tem sido indicado como potencial marcador de contaminação humana fecal na água (FONG; LIPP, 2005; HUNDESA *et*

al., 2006; CALGUA *et al.*, 2008; WYN-JONES *et al.*, 2011; WYER *et al.*, 2012), devido principalmente:

- À natureza do seu genoma DNA dupla fita:
 - Que promove maior resistência à degradação ambiental, como radiação UV, temperatura, variação de pH e ao processo biológico de tratamento de esgoto (PINA *et al.*, 1998; CARTER, 2005; FONG; LIPP, 2005).
 - A variação genética não é tão extensa como vírus de genoma RNA e por esse motivo, o uso de técnicas moleculares (como Reação em Cadeia do Polimerase (PCR)) para detecção de HAdV não é prejudicada como quando pesquisados vírus de RNA (ENRIQUEZ; HURST; GERBA, 1995; THURSTON-ENRIQUEZ *et al.*, 2003; HIJNEN; BEERENDONK; MEDEMA *et al.*, 2006).
- Ter sido isolado em diversos ambientes, como em água de consumo humano (FONG; LIPP, 2005; VAN-HEERDEN *et al.*, 2005; RIGOTTO *et al.*, 2010; VERHEYEN *et al.*, 2009; GARCIA *et al.*, 2012), em águas recreacionais (MIAGOSTOVICH *et al.*, 2008; SINCLAIR; JONES; GERBA, 2009; FONGARO *et al.*, 2012), em águas poluídas (PINA *et al.*, 1998; LAVERICK *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004; MIAGOSTOVICH *et al.*, 2008; WONG *et al.*, 2009; RIGOTTO *et al.*, 2010; MORESCO *et al.*, 2012) e também associado com surtos de doenças em piscinas (PAPAPETROPOLOU; VANTARAKIS, 1995; HARLEY *et al.*, 2001).
- Ser mais prevalente que outros vírus entéricos (WONG *et al.*, 2009; WYN-JONES *et al.*, 2011; FONGARO *et al.*, 2012; GARCIA *et al.*, 2012; MORESCO *et al.*, 2012).

Igualmente, a atual lista de microrganismos candidatos a marcadores de contaminação do ambiente aquático (CCL3) elaborada pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (USEPA) - a qual lista os contaminantes que não são atualmente sujeitos a nenhuma regulamentação e que são previstos de ocorrer em sistemas públicos de água, requerendo desta forma regulamentação de leis para assegurar a qualidade da água de consumo - considera o adenovírus

como um contaminante emergente de alta prioridade presente em água de consumo, candidato a parâmetro de contaminação do ambiente aquático (USEPA, 2009).

1.6.1.1. Adenovírus humano recombinante (rAdV)

O papel funcional das proteínas codificadas pela região E1A foi descoberta em mutantes para esta região, os quais conseguiam se replicar em células humanas transformadas que expressavam E1A e E1B (HEK 293), mas falhavam em acumular mRNA de expressão precoce em células HeLa, incapazes de complementar o defeito do vírus mutante. Quando comparado com o vírus selvagem, a quantidade acumulada de mRNA de expressão precoce era reduzida e ocorria somente após um longo atraso (GRAHAM, 1977). Após a descoberta funcional da região E1A, entendeu-se que estas proteínas atuavam aumentando a taxa de transcrição do mRNA (NEVINS, 1981).

O adenovírus humano recombinante (rAdV) utilizado neste trabalho pertence ao sorotipo 5 e possui como característica a seguinte modificação: no seu genoma a região que compreende o gene E1 (E1A e E1B) foi excisada e ali foi incorporado o gene da proteína verde fluorescente (GFP: *green fluorescent protein*). Por esse motivo, a replicação viral só é possível de ocorrer de forma eficiente na linhagem celular HEK 293A, transformada geneticamente para expressar a proteína viral E1 (E1A e E1B), sendo desta forma permissivas e suscetíveis ao rAdV.

Portanto, quando rAdV viáveis se replicam, a GFP é transcrita juntamente com o genoma do vírus, emitindo uma coloração verde fluorescente à célula infectada. Desta forma, a aplicação deste modelo recombinante permite a simplificação das técnicas de viabilidade viral e diminuição do tempo e do custo laboratorial, visto que não é necessário realizar marcações com anticorpos, permitindo o acompanhamento da replicação viral, por exemplo, diretamente em microscópio de fluorescência ou em citômetro de fluxo (DAN *et al.*, 2010).

1.7. Métodos de detecção viral

A detecção de vírus no ambiente pode ser realizada de acordo com as seguintes abordagens: detecção do genoma viral por técnicas moleculares e a detecção de vírus viáveis por cultura celular.

As técnicas de cultura celular foram amplamente utilizadas para determinar a ocorrência de vírus entéricos no ambiente antes do advento

de técnicas moleculares, que ocorreu no final da década de 1980, e continuam sendo o método de escolha quando objetivo é detectar vírus infecciosos no ambiente (FONG; LIPP, 2005). Exigem a disponibilidade de linhagens celulares específicas para o vírus a ser pesquisado, bem como treinamento pessoal capaz de observar mudanças conformacionais nas células, além de habilidade e práticas antissépticas no decorrer da metodologia. Entretanto, são técnicas demoradas e trabalhosas, levando de dias à semanas para confirmar os resultados, além de terem custos mais elevados do que técnicas moleculares (LIPP; FARRAH; ROSE, 2001) e não são aplicadas a todos os tipos virais, pois dependem da capacidade do vírus infectar e se replicar em células *in vitro* e causar efeito citopático. Da mesma forma, é necessário estar atento à citotoxicidade da amostra que pode provocar dano às células semelhante ao efeito citotóxico que o vírus causa (FONG; LIPP, 2005).

As técnicas moleculares surgiram como uma alternativa, sendo capazes de detectar e identificar de forma mais rápida, com maior sensibilidade, especificidade e menos custosa vírus que não teriam a habilidade de se replicar em cultura de células. De início, é necessário realizar a extração de ácidos nucleicos virais e é extremamente importante remover os restos celulares ou outros inibidores que podem afetar a detecção molecular posterior. Os métodos são baseados na amplificação de porções do genoma viral (reação em cadeia da polimerase – PCR com variações: RT-PCR, qPCR, qRT-PCR) e por isso não são capazes de diferenciar vírus viáveis de não-viáveis quando a porção a ser analisada do genoma não estiver danificada (GIRONES *et al.*, 2010).

2. HIPÓTESE

O presente trabalho de Dissertação foi desenvolvido baseado na seguinte hipótese:

As concentrações de cloro de 0,2 mg/L e 0,5 mg/L aplicadas à águas superficiais filtradas são eficientes na inativação de vírus entéricos, sendo que o adenovírus recombinante constitui-se de um bom modelo para esta avaliação.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a curva de desinfecção viral em água filtrada de duas Estações de Tratamento de Água da grande Florianópolis mediante exposição ao cloro, utilizando como modelo o adenovírus recombinante.

3.2. Objetivos Específicos

1. Caracterizar físico-quimicamente as amostras de água filtrada proveniente da Estação de Tratamento de Água (ETA) Lagoa do Peri e da ETA Morro dos Quadros e os parâmetros bacteriológicos.
2. Padronizar as técnicas de cultura celular (citometria de fluxo e microscopia de fluorescência) para detecção de adenovírus recombinante, assim como estabelecer os limites de detecção e a influência da amostra para cada metodologia;
3. Realizar experimentos de inativação viral por cloro sob diferentes temperaturas, concentrações de desinfetante e origem da matriz amostral;
4. Avaliar a presença e viabilidade de adenovírus humano em amostras de água imediatamente após o tratamento nas duas ETAs e em um ponto na rede de distribuição abastecido por cada Estação, assim como mensurar a concentração de cloro livre e os parâmetros bacteriológicos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O delineamento experimental geral utilizado para realizar este trabalho de dissertação constituiu-se basicamente em duas etapas: (1) experimento de desinfecção de adenovírus recombinante (rAdV) em água filtrada; (2) análise da viabilidade de adenovírus humano (HAoV) em água tratada e podem ser visualizados no fluxograma da figura 4.

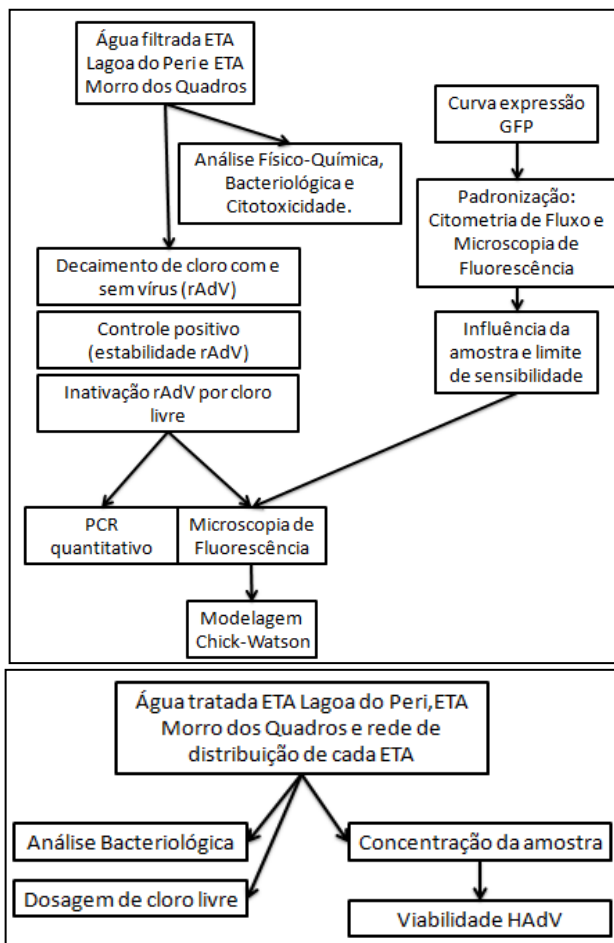


Figura 4. Fluxograma geral do delineamento experimental deste trabalho.

4.1. Coletas de água

4.1.1. Coleta de água filtrada para os ensaios de desinfecção por cloro

Foi coletada uma única amostra de 10 L para os experimentos de desinfecção viral das seguintes matrizes:

1) Amostra de água em tratamento de potabilização proveniente da Estação de Tratamento de Água (ETA) Lagoa do Peri, localizada no Parque Municipal da Lagoa do Peri, em Florianópolis, Santa Catarina. Esta amostra foi coletada imediatamente após a filtração e anteriormente à etapa de desinfecção por cloração (figura 5).

2) Amostra de água em tratamento de potabilização proveniente da Estação de Tratamento de Água (ETA) Morro dos Quadros, localizada no município de Palhoça, Santa Catarina. Esta amostra também foi coletada imediatamente após a filtração e anteriormente à etapa de desinfecção por cloração (figura 6).



Figura 5. Local de coleta da ETA Lagoa do Peri: Água filtrada coletada na torneira do laboratório da companhia de saneamento.



Figura 6. Local de coleta da ETA Morro dos Quadros: Água coletada após filtragem ascendente.

Estas amostras foram aliquotadas em volume de 500 mL e estocadas a -20°C até o uso. Além destas matrizes, também foi utilizado o tampão BDF (“*buffered demand free*” ou água tamponada livre de demanda de cloro), que consiste em água MilliQ adicionada de 0,54 g de Na_2HPO_4 (anidro) e 0,88 g de KH_2PO_4 (anidro) por litro de água deionizada e destilada, livre de cloro, cujo pH foi ajustado para 8,0 ou 6.9 com 1M NaOH. Esta solução, após preparada, foi estocada a 4°C até o uso.

4.1.2. Coleta e concentração de água tratada

Estas amostras foram coletadas com o objetivo de avaliar a qualidade da água tratada no que se refere à viabilidade de HAdV, de coliformes totais e *E. coli*. Para isso foram coletados 4 L de água tratada na ETA Lagoa do Peri e ETA Morro dos Quadros e em um ponto na rede de distribuição abastecido por cada ETA, perfazendo 4 amostras.

As amostras da rede de distribuição foram coletadas em uma torneira da UFSC abastecida pela ETA Morro dos Quadros e em uma residência, abastecida pela ETA Lagoa do Peri. As amostras foram previamente tratadas com tiosulfato de sódio 10%, a fim de inativar o cloro residual livre, realizada a análise de coliformes totais e *E. coli*

(item 4.3) e então submetidas ao processo de floculação para concentração viral conforme descrito por Calgua et al. (2013).

Para tanto, as amostras foram acondicionadas em béqueres de vidro de 2L (2 béqueres/amostra) e então adicionado 1,5g/L de sal marinho (*SeaSalts* - Sigma) e o pH ajustado para pH 3,5 com solução de HCl 1N. Em um dos béqueres, foi adicionada uma suspensão de HAdV (1×10^7 UFP) para avaliar a recuperação viral pela técnica de concentração utilizada, baseada em floculação orgânica. Foi adicionado em cada um dos béqueres 20 mL de uma solução de leite desnatado pH 3,5 (*Pre-flocculated Skimmed Milk PSM*, 0,1% - Difco), preparado em água do mar artificial (1,5g/L *SeaSalts* – Sigma). Durante um período de 8 h de agitação, os flocos de leite fornecem uma superfície de adsorção viral e, após 8 h em repouso, estes flocos sedimentam. O sobrenadante foi aspirado, o precipitado centrifugado a 7000 xg por 30 min a 4°C e o sedimento ressuspense em 10 mL de tampão fosfato (NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , 0,2M, 1:2 v/v, pH 7,5).

Estas amostras concentradas foram submetidas ao ensaio de formação de placa de lise, para verificação do título de HAdV viáveis (conforme descrito em 4.14.).

4.2. Avaliação dos parâmetros físico-químicos

A medida dos parâmetros físico-químicos (temperatura da água, pH e oxigênio dissolvido) foi realizada *in situ*, utilizando Sonda Multiparâmetros (YSI-85). A medida do parâmetro de turbidez das duas amostras ETA Lagoa do Peri e ETA Morro dos Quadros foi realizada no próprio laboratório da concessionária CASAN. Quanto à condutividade, ambas as amostras foram mensuradas no Laboratório Integrado de Meio Ambiente (LIMA) da Universidade Federal de Santa Catarina.

A quantificação do nitrito (NO_2^-) se baseia na reação do mesmo em meio ácido com sulfanilamida e bicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina formando um composto colorido róseo, que é determinado espectrofotometricamente a 543 nm (GOLTERMAN et al., 1978). Em relação ao nitrato (NO_3^-), ele é quantitativamente reduzido a NO_2^- por cádmio amalgamado. Uma vez reduzido, o mesmo é complexado por sulfanilamida e bicloridrato-N-(1-naftil)-etilenodiamida, formando um composto nitrogenado altamente colorido. A quantidade de nitrito originalmente produzido é deduzido do total obtido (MACKERETH; HERON; TALLING, 1978). Quanto à amônia (NH_3), em solução moderadamente alcalina (pH entre 8,0 e 11,5) o radical amônio reage com hipoclorito de sódio formando

monocloramina. Este produto formado em presença de fenol e um excesso de hipoclorito catalizado por nitroprussiato iônico forma o azul de indofenol (KOROLEFF *in*: GRASSHOFF, 1976). Essas análises foram realizadas em parceria com o Laboratório de Ecologia de Águas Continentais, Departamento de Ecologia e Zoologia da Universidade Federal de Santa Catarina, sob coordenação do Prof. Dr. Maurício Mello Petrucio.

4.3. Análise de coliformes totais e *Escherichia coli*

Para este procedimento foram utilizadas as amostras de águas filtradas das ETAs descritas no item 4.1.1., assim como as amostras de águas tratadas provenientes das ETAs, e as amostras de água coletadas na rede de distribuição, descritas no item 4.1.2., as quais foram tratadas previamente com tiosulfato de sódio 10%, com objetivo de inativar o cloro residual livre.

A quantificação de coliformes totais e *Escherichia coli* foi realizada utilizando o kit laboratorial Aquatest Coli – ONPG MUG *Laborclin*.

Cem mililitros das amostras de água entraram em contato com substrato enzimático cromogênicos ONPG (Orto-NitroPhenylGalactopyranoside) e fluorogênico MUG (Methyl-UmbellypherilGlucuronide) e foram divididas em 5 alíquotas de 20 mL. Após incubação por 24 h a 35 ± 2 °C foi observado se houve mudança de coloração para amarelo turvo (quando positivo para coliformes totais) e se havia fluorescência azul quando exposto à luz UV (366 nm) (quando positivo para *Escherichia coli*). O número de tubos positivos foram contabilizados e comparados à tabela do Número Mais Provável (NMP) que o kit disponibiliza, com resultados expressos em NMP/100 mL. Conforme o kit informa, a sensibilidade da metodologia é a partir de 1,1 NMP/100 mL.

4.4. Preparação do estoque viral de rAdV para as sementeiras nas águas

A linhagem celular HEK 293A, derivada de rim embrionário humano, foi cultivada em meio de crescimento Meio Mínimo Essencial Dulbecco com sais de Eagle's (DMEM) (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de HEPES, em garrafas estéreis próprias para o cultivo celular, até atingirem confluência (24 h de cultivo). O meio de crescimento foi então retirado e, para garrafas de

75cm², 1,0 mL de suspensão viral com valores de MOI (razão vírus/célula) entre 3 e 5 foi utilizada para infectar a monocamada celular, em meio de cultura livre de SFB. Após 60 min de incubação para adsorção viral a 37°C e 5% de CO₂, adicionou-se 20 mL de meio de manutenção celular, que consiste do mesmo meio de crescimento, porém adicionado de 2% SFB. As culturas celulares foram acompanhadas e sempre comparadas com um controle celular não infectado para verificação do aparecimento de efeito citopático (ECP).

Diariamente, as células foram observadas em microscópio invertido até apresentarem 100% de ECP, caracterizado por células arredondadas e até mesmo, seu desprendimento da superfície, desagregando-se da monocamada celular. Além disso, as células também foram observadas em microscópio invertido de fluorescência, o que permitiu a visualização das células com fluorescência verde, devido à transcrição e tradução da proteína GFP, indicativo da replicação viral.

As células foram então congeladas a -80°C e descongeladas a 25°C por três vezes para que fossem lisadas e liberassem os vírus que ainda possivelmente estivessem intracelulares. Após, a suspensão viral foi transferida para um tubo e centrifugada a 3.500 xg por 4 min a 4°C para remoção das células e separação do sobrenadante. O sobrenadante foi então utilizado para realizar novas infecções, sempre com valores de MOI entre 3 e 5, com objetivo de aumentar o título viral.

Após algumas passagens, com a observação da redução do período necessário para o início do aparecimento do efeito citopático, caracterizando assim o aumento do título viral, foi realizada a última passagem, utilizando garrafas de cultivo celular de 150 cm². Quando as células se descolavam facilmente da garrafa, o meio de cultivo juntamente com as células foi coletado e centrifugado a 3.500 xg por 15 min. O sobrenadante foi então armazenado a 4°C e utilizou-se 25 mL do mesmo para ressuspender o sedimento celular, que foi submetido a 3 ciclos de congelamento e descongelamento (-80°C/25°C) para liberação de vírus intracelulares. Após centrifugação a 3.500 xg por 15 min, o sobrenadante foi armazenado juntamente com o anterior e submetido ao processo de purificação, conforme descrito no item 4.5.

4.5. Purificação do fluido viral de adenovírus recombinante (rAdV)

A etapa de purificação é essencial em experimentos de desinfecção por cloro livre, visto que é necessário retirar o meio de cultivo celular, o qual contém componentes redutores que consomem o

cloro livre (URAKAMI *et al.*, 2007), impossibilitando a realização de experimentos para avaliar a desinfecção viral.

Após a produção do fluido viral de rAdV, baseado em suas características distintas associadas à superfície, o vírus foi purificado cromatograficamente, utilizando-se o kit comercial Vivapure® AdenoPack™ 500 Sartorius Stedin.

Sucintamente, após a preparação de 500 mL do fluido viral conforme descrito no item 4.4., essa suspensão foi tratada com 12,5 U/mL de Benzonase durante 30 min de incubação a 37°C, que teve por objetivo degradar ácidos nucleicos provenientes de células e de partículas virais degradadas. Em seguida, esta suspensão viral tratada com nuclease foi submetida à filtração (0.45 – 0.2 µm) com vazão de 10-20 mL/min para retirar restos celulares, enzima e ácidos nucleicos digeridos previamente. Após a adição de 56 mL do Tampão de Carregamento 10X (*loading buffer*), esta suspensão foi filtrada a 10 mL/min por um disco de cromatografia que, baseado nas características de superfície do adenovírus, o retém especificamente. Com a utilização do Tampão de Lavagem, o meio residual e as proteínas contaminantes remanescentes foram retiradas e, ao utilizar 10 mL do Tampão de Eluição a uma vazão de 1 mL/min, as partículas virais foram eluídas. A reconcentração foi realizada em um dispositivo Vivaspin 20, centrifugando-se a 6.000 *xg* por 15 min ou até o fluido viral ser concentrado em torno de 1 mL. Com a adição de 9 mL de PBS, o fluido viral final purificado foi alíquotado e estocado a -80°C.

4.6. Ensaio de citotoxicidade

A linhagem celular HEK 293A foi cultivada na concentração de $1,87 \times 10^5$ células/poço em placas de cultura celular de 24 poços por 24 h até atingir confluência, quando então foram inoculadas com 100 µL/poço da amostra (ETA Lagoa do Peri e ETA Morro dos Quadros) pura ou diluída (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64) em meio de cultura DMEM 1X, suplementado com 1% de PSA [(penicilina G (100U/mL), sulfato de estreptomicina (100µg/mL) e anfotericina B (0,025µg/mL)] (Cultilab), em réplicas. Após a inoculação, as células foram mantidas 1 h a 37°C e 5% de CO₂ e em seguida foi adicionado às células o meio de cultura de manutenção, suplementado com 2% de SFB, 1% de PSA e 1% de HEPES.

Após 24h, foram realizadas observações em microscópio invertido, sempre comparando com o controle celular, o qual continha apenas o meio de cultura de manutenção, para verificar possíveis

alterações citológicas. Para confirmar as observações, os meios de cultivos foram aspirados e cada poço corado com a adição de 250 µL do corante preto de naftaleno 0,1% (Sigma), permitindo a melhor observação dos danos provocados ao tapete celular, determinando assim, em qual diluição a amostra deveria ser utilizada nos ensaios subsequentes.

Também em relação às amostras de água tratadas coletadas (item 4.1.2), a linhagem celular A549 (células epiteliais derivadas de carcinoma de pulmão humano e permissivas à maioria dos adenovírus humanos) foi cultivada em meio de crescimento, que consiste em Meio Mínimo Essencial Dulbecco com sais de Eagle's alta glicose (DMEM ↑G), suplementado com 5% de SFB e com 1mM de piruvato de sódio. As células foram propagadas em placas de cultivo celular de 24 poços, na concentração de $2,5 \times 10^5$ células/poço, por 24 h até atingirem confluência, quando então foram inoculadas com 100 µL/poço da amostra pura ou diluída (1:2, 1:4, 1:8) em meio de cultura MEM 1X, suplementado com 1% de PSA, em réplicas. Durante 1 h, as células foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂ e em seguida foi adicionado o meio de cultura de manutenção, suplementado com 2% de SFB e 1% de PSA. As placas foram incubadas sob condição padrão (37°C e 5% de CO₂) e a monocamada celular foi monitorada durante 7 dias. Após este período, também foi realizada a coloração do tapete celular com preto de naftaleno 0,1% e então determinada a diluição a ser utilizada no ensaio de placa de lise para HAdV.

Os seguintes tópicos 4.7, 4.8, 4.9 no que se refere à padronização das metodologias de cultura celular do fluido viral, foram realizados em parceria com o mestrando Lucas Ariel Totaro Garcia, cuja Dissertação de Mestrado encontrava-se em andamento e se refere à aplicação do adenovírus recombinante em água do mar.

4.7. Curva da expressão da GFP

Devido à dinamicidade da replicação viral e pelo fato da expressão da proteína GFP estar diretamente relacionada a essa dinâmica, foi necessário estipular qual período de replicação viral seria mais adequado para detectar a fluorescência da GFP e ainda assegurar o primeiro ciclo de replicação viral, já que períodos de incubação longos permitem que os vírus se repliquem, superestimando dessa forma o título viral e por consequência a avaliação da curva de desinfecção.

Células HEK 293A foram cultivadas em placa de 24 poços na concentração de $1,87 \times 10^5$ células/poço e, após 24 h, quando estavam confluentes, foi adicionado, em triplicatas, 100 μ L de fluido viral nos seguintes MOIs: 10, 1, 0,5, 0,1 e 0,01. Após 1 h a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ foi adicionado 0,65 mL de meio de manutenção por poço (DMEM 1X, 2% SFB, 1% PSA e 1% HEPES). A cada 2h por um período de até 60h, a fluorescência relativa foi mensurada em espectrofotômetro de UV (excitação/emissão: 395/508 nm). Desta forma, com a curva da expressão da GFP devidamente mensurada, foi possível selecionar o melhor período pós-infecção (p.i.) para realizar os experimentos de infecciosidade viral.

4.8. Avaliação da infecciosidade viral por cultura celular

A linhagem celular HEK 293A foi cultivada com meio de crescimento, conforme item 4.4. em placas de 24 ou 48 poços na concentração de $1,87 \times 10^5$ e $1,5 \times 10^5$ células/poço, respectivamente, por 24 h até atingirem confluência. Em seguida, o meio de crescimento foi aspirado e adicionou-se, em triplicatas, 100 μ L de fluido viral ou da amostra a ser testada. Para o fluido viral, 50 μ L de vírus foram diluídos em 450 μ L de DMEM 1X seriadamente até a diluição 10^{-7} . Quanto às amostras, 50 μ L foram diluídos em 450 μ L de DMEM 1X com 1% de PSA seriadamente até a diluição 10^{-7} . No controle celular foi adicionado somente DMEM 1X. Após 1h a 37°C e 5% de CO₂, foi adicionado 0,65 mL e 0,4 mL de meio de manutenção por poço (DMEM 1X, 2% SFB, 1% PSA e 1% HEPES), para placas de 24 e 48 poços, respectivamente.

Após o período de incubação definido pelo ensaio da curva da expressão da GFP (item 4.5.), as células infectadas foram avaliadas por citometria de fluxo (item 4.8.1.) e microscopia de fluorescência (item 4.8.2.).

4.8.1. Ensaio de Citometria de Fluxo (FACS)

O ensaio de infecciosidade do rAdV por citometria de fluxo foi realizado da seguinte forma: após o período de incubação definido pelo ensaio da curva da expressão da GFP (item 4.7.), o sobrenadante foi aspirado e as células removidas da placa de 24 poços por tratamento com tripsina. As triplicatas foram então unidas e transferidas para um microtubo de 1,5 mL, centrifugadas a 3.500 $\times g$ por 3 min e ressuspensas em solução de bloqueio (EDTA 5 mM, preparada em PBS 1X). Nesta etapa, as células foram contadas em contador

automático Countess (Invitrogen) e então transferidas para tubos plásticos próprios para citometria de fluxo (BD Biosciences, San Jose, CA).

A leitura foi realizada em citômetro BD FACSCanto II Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA), analisando-se 50.000 eventos e observando quanto à fluorescência emitida pela GFP viral. Os dados foram analisados em software Flowing. A titulação do rAdV em Unidades Relativas de Fluorescência por mL (URF/mL) foi definido pela seguinte fórmula:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ total de células (Countess)} \times \% \text{ células fluorescentes} \times \text{recíproca da diluição}}{100 \times \text{inóculo (mL)}}$$

4.8.2. Microscopia de Fluorescência (MF)

O ensaio de infecciosidade do rAdV por microscopia de fluorescência foi realizado da mesma forma, após o período de incubação definido pelo ensaio da curva da expressão da GFP (item 4.7.), o sobrenadante celular foi aspirado e a placa de 48 poços foi visualizada diretamente em microscópio de fluorescência invertido. O número de células fluorescentes na maior diluição possível foi contabilizado e o título viral expresso em Unidades Formadoras de Foco (UFF/mL) definido pela seguinte fórmula:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de células fluorescentes (média da duplicata)} \times \text{recíproca da diluição}}{\text{inóculo (mL)}}$$

4.9. Limite de sensibilidade e influência da amostra nas metodologias de cultura celular

Para poder comparar os limites de sensibilidade, foram adotados os mesmos procedimentos nas técnicas de citometria de fluxo e de microscopia de fluorescência. Para isto, em duplicatas, o fluido viral (não purificado) foi diluído diretamente em meio de cultura celular (50 µL de vírus e 450 µL de DMEM 1x) e também nas amostras das ETAs na sua diluição não-citotóxica (225 µL de água, 220 µL de DMEM 1X, 5 µL de PSA e 50 µL de vírus), com objetivo de avaliar se havia alguma influência da amostra de água nas metodologias de viabilidade viral. Foram realizadas diluições seriadas de 10^{-1} até 10^{-8} , e

os ensaios revelados por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência (itens 4.8.1. e 4.8.2.).

4.10. Extração do material genético viral

O material genético viral foi extraído através do kit comercial QIAmp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante, onde a partir de um volume de 200 μ L de amostra, procede-se à extração do material genético viral. Resumidamente, ao adicionar tampão e enzimas, a amostra tem seu material genético retido em uma membrana de sílica. Após sucessivas lavagens, os contaminantes são removidos e o material genético purificado é eluído em um volume final de 60 μ L em tampão de eluição fornecido pelo fabricante.

4.11. Detecção e quantificação de cópias genômicas por PCR em tempo real (qPCR)

Para a detecção e quantificação do número de cópias genômicas de adenovírus recombinante, foi realizado PCR quantitativo (qPCR), utilizando-se o Kit Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), o qual contém a enzima Taq DNA Polimerase, oligonucleotídeos, co-fator enzimático e condições salinas adequadas. Ao kit foram adicionados a sonda TaqMan e os iniciadores específicos (ADF 5'-3' C(AT)TACATGCACATC(GT)C(CG)GG, ADR 5'-3' C(AG)CGGGC(GA)AA(CT)TGCACCAG, Sonda ADP1 5'-3' FAM-CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCCT-TAMRA) descritos por Hernroth et al. (2002), que flanqueiam a região codificante hexon do capsídeo viral, conservada em todos os sorotipos de HAdV, inclusive no rAdV.

Os ensaios de qPCR foram realizados em duplicatas em placas de 96 cavidades (MicroAmp Applied Biosystems). Um volume de 15 μ L da reação de qPCR e 10 μ L de DNA (diluído a 1:10) foi distribuída em cada cavidade da placa, além também de controles negativos e positivos. Em seguida, a placa foi selada com filme óptico (Applied Biosystems) e inserida no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Resumidamente as reações foram feitas nas seguintes condições: 2 min a 50°C e 10 min a 95°C seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 seg., 60°C por 1 min

4.12. Reagentes e preparo da vidraria

Toda a vidraria utilizada nos ensaios foi tornada livre de demanda de cloro por submersão por uma noite em uma solução contendo 100 mg/L de cloro livre. Após esta submersão, a vidraria foi enxaguada em água destilada e deionizada livre de cloro e mantida em estufa a 200°C por 2h. Após este tratamento inicial, somente a submersão em cloro e enxágue foi realizada, não sendo mais feita a secagem em estufa (THURSTON-ENRIQUEZ *et al.*, 2003).

Para todos os experimentos de desinfecção, foi utilizada uma solução a 2,5% de hipoclorito de sódio (2,38 g/L de cloro livre) próprio para desinfecção e tratamento de água (Ministério da Saúde M.S. 3.1862.0001). Para os ensaios de desinfecção, a solução mãe a 100 mg/L era preparada no dia dos ensaios, e uma diluição desta solução mãe era realizada para alcançar a concentração inicial de cloro livre a ser utilizada nos ensaios de desinfecção (0,2 e 0,5 mg/L), sempre em tampão livre de demanda de cloro (BDF).

4.13. Desinfecção viral em águas tratadas com cloro

Os estudos de desinfecção viral foram realizados com concentração de 0,2 mg/L e 0,5 mg/L de cloro livre, visto que a concentração mínima exigida pela Portaria MS 2.914/2011 é de 0,2 mg/L (ANVISA, 2011). As temperaturas elegidas foram de 15°C e 20°C, por representarem a amplitude térmica da água no sul do Brasil no período de inverno e verão (FONTES *et al.*, 2013). Os experimentos com tampão BDF foram realizados somente sob temperatura de 20°C.

Para conseguir observar $4\log_{10}$ de decaimento, o que significa uma eficiência de 99,99% de inativação das partículas virais, foi necessário utilizar um volume de 10 mL de matriz, já que o volume disponível do estoque viral purificado de adenovirus recombinante (rAdV) era limitado a 10 mL. Desta forma, a cada experimento de desinfecção foi adicionado 100 µL de fluido viral em 10 mL de matriz.

Também foram escolhidas as seguintes condições experimentais: ETA Lagoa do Peri a 20°C e 0,2 mg/L e ETA Morro dos Quadros a 20°C e 0,2 mg/L para repetir os ensaios de decaimento viral com 40 mL de matriz, semeando desta forma 400 µL de fluido viral. Esta etapa teve como objetivo observar se os resultados obtidos utilizando 10 mL de água teriam alguma diferença estatística quando comparados com os experimentos realizados com 40 mL, visto que diversos trabalhos reportados na literatura utilizam volume semelhante a

esse (CROMEANS; KAHLER; HILL, 2010; KAHLER *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011).

Todos os experimentos foram realizados em duplicata, com quatro abordagens experimentais:

4.13.1. Curva de decaimento de cloro livre nas matrizes

Matriz e cloro: Béqueres de vidro (previamente tratados conforme item 4.12.) contendo 50 mL de matriz (água filtrada (ETA Lagoa do Peri e ETA Morro dos Quadros) e tampão BDF (pH 8.0 e 6.9)), com concentração de 0,2 e 0,5 mg/L de cloro livre foram mantidos sob agitação magnética constante à temperatura de 20°C.

Em duplicata, foram realizadas pelo menos uma leitura no início (tempo 0s) e outra no final do tempo de desinfecção viral para o tampão BDF, ETA Lagoa do Peri e ETA Morro dos Quadros. Uma alíquota de 10 mL foi retirada a fim de mensurar a concentração de cloro livre ao longo do tempo pelo método do N,N-dietil-p-fenilenediamina (DPD), recomendado pela USEPA, utilizando um aparato de medição de Cloro livre HANNA Instruments (HI 95711). A reação do íon hipoclorito e ácido hipocloroso quando em contato com iodeto de potássio a um pH de 4 ou menor, provoca a liberação de iodo. Uma vez liberado, o iodo reage com N,N-dietil-p-fenilenediamina (DPD), formando um composto rosa proporcional à concentração de cloro livre na amostra (USEPA, 1983).

4.13.2. Demanda de cloro livre e curva de decaimento de cloro livre com estoque viral

Matriz, cloro e vírus: Em dois béqueres de vidro contendo 50 mL de matriz (água filtrada (ETA Lagoa do Peri e ETA Morro dos Quadros) e tampão BDF (pH 8.0 e 6.9)) e concentrações de cloro elegidas (0,2 e 0,5 mg/L de cloro livre), foi adicionado a um deles 100 µL do fluído viral e o experimento conduzido à 20°C, em duplicata.

Foram realizadas pelo menos uma leitura no início (tempo 0s) e outra no final do tempo de desinfecção viral para cada condição experimental, retirando uma alíquota de 10 mL a fim de medir o decaimento de cloro livre ao longo do tempo. A concentração de cloro foi mensurada pelo método do N,N-dietil-p-fenilenediamina (DPD).

4.13.3. Controle positivo

Matriz e vírus. Em béqueres contendo 10 mL de matriz (água filtrada (ETA Lagoa do Peri e ETA Morro dos Quadros) e tampão BDF (pH 8.0 e 6.9)), 100 µL do fluido viral de rAdV purificado foi adicionado e o experimento conduzido à 20°C, em duplicata.

Foram realizadas leituras no início (tempo 0s), após 30 min e após 60 min. As alíquotas retiradas foram mantidas em gelo até o último tempo e analisadas por ensaios de cultura celular (microscopia de fluorescência –item 4.8.2.) e moleculares (qPCR – item 4.11.). Este controle teve por objetivo avaliar se as condições de realização dos experimentos (tempo, composição da matriz, temperatura) provocariam a inativação de rAdV quando submetido aos ensaios de desinfecção.

4.13.4. Decaimento viral por cloro livre

Matriz, cloro e vírus: Em béqueres contendo 10 mL de matriz (tampão BDF ou amostra de água das ETAs) foi semeado 100 µL do fluido viral de rAdV purificado e cloro livre na concentração de 0,2 e 0,5 mg/L a temperaturas de 15°C e 20°C. Em intervalos de tempo especificados, alíquotas de 400 µL foram retiradas e imediatamente entraram em contato com uma solução de tiosulfato de sódio a 10% a fim de bloquear qualquer cloro residual ativo. Após a retirada das amostras, as mesmas foram mantidas em gelo até que o último tempo fosse retirado e então encaminhadas para os ensaios de cultura celular (microscopia de fluorescência – item 4.8.2.) e moleculares (qPCR – item 4.11.).

4.14. Ensaio de Formação de Placa de Lise

O ensaio de formação de placa de lise foi utilizado com objetivo de avaliar a viabilidade de HAdV das amostras de água tratadas, descritas no item 4.1.2, com protocolo adaptado de Cromeans et al. (2008) e Rigotto et al. (2011).

A linhagem celular A549 foi cultivada com meio de crescimento (conforme descrito no item 4.6.) em placas de 6 poços na concentração de 6×10^5 células/poço por 24 h a 37°C e 5% de CO₂, quando atingem a confluência. As amostras de água coletadas e concentradas (conforme descrito no item 4.1.2.) em sua diluição não citotóxica foram tratadas com 1% de PSA e, após lavagem da monocamada celular por 2 vezes com Tampão Fosfato Salina (PBS),

300 µL foram inoculados em triplicatas. Após período de incubação de 1 h a 37°C e 5% de CO₂, os inóculos foram aspirados e 2,5 mL de meio de manutenção ([DMEM†G 2X, 4% de SFB, 0.1mM de piruvato de sódio, 2% de PSA e 25mM MgCl₂] e [0.6 % de Bacto-ágar], 1:1 v/v), foi adicionado em cada poço. As placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 7 dias, o meio de manutenção aspirado e a monocamada celular corada com o corante Cristal Violeta 20%. O limite teórico de sensibilidade desta metodologia é de 1 x 10³ UFP/L. O número de placas formadas foi contabilizado como Unidades Formadoras de Placa/mL (UFP/mL) pela seguinte fórmula:

$\frac{\text{N}^\circ \text{ de placas (média da triplicata)} \times \text{recíproca da diluição}}{\text{inóculo (L)}}$

4.15. Modelagem da cinética de desinfecção

A constante de decaimento de cloro (k') para cada experimento foi calculada em Excel 2007 de acordo com a seguinte equação:

$$C(t) = C_0 \exp(-k' t)$$

onde $C(t)$ e C_0 são a concentração de cloro residual livre (mg/L) no tempo t e no tempo 0, respectivamente, e k' é a taxa constante de decaimento de primeira ordem de cloro livre (min^{-1}).

Em seguida, os valores de inativação viral observado por microscopia de fluorescência (UFF/mL) foram submetidos ao modelo previamente descrito de predição de tempo de contato de Chick-Watson (GYUREK; FINCH, 1998):

$$\text{Ln } N/N_0 = -k/k'n (C_0^n - C_t^n)$$

onde $\text{Ln } N/N_0$ é o logaritmo natural da taxa de sobrevivência (concentração de vírus viáveis no tempo t dividido pela concentração no tempo 0), k é a taxa constante de inativação (min^{-1}) e n é o coeficiente de diluição. Valor de k' de 0.0001 foi adotado quando o decaimento do desinfetante foi considerado desprezível (THURSTON-ENRIQUEZ *et al.*, 2003) e o valor de n foi determinado como 1 (MWH, 2005).

Os valores de Ct (mg/L x min) preditos para inativação viral foram determinados através da multiplicação do tempo (min) e concentração de cloro livre (C_t^n) em cada intervalo de tempo calculada

pelo modelo de Chick-Watson, quando aproximadamente a inativação de $2\log_{10}$, $3\log_{10}$ e $4\log_{10}$ ocorreu, utilizando Microsoft Excel 2007.

4.16. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 5.0 (EUA). Teste de ANOVA, teste t de Student, regressão e correlação linear foram realizadas e reportadas as diferenças significativas para $P < 0.05$. Os gráficos foram plotados no mesmo programa reportado.

Valores de R^2 foram calculados para determinar o ajuste das curvas de inativação observadas às previstas pela modelagem da cinética de desinfecção ($\text{Ln}(N/N_0)$ observado) *versus* $\text{Ln}(N/N_0)$ modelo de Chick-Watson).

5. RESULTADOS

5.1. Parâmetros Físico-Químicos da amostra de água da ETA Lagoa do Peri e ETA Morro dos Quadros

A amostra de água filtrada proveniente da ETA Lagoa do Peri e ETA Morro dos Quadros foi avaliada quanto aos seus parâmetros físico-químicos e de nutrientes e a caracterização pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos das amostras de água filtrada da ETA Lagoa do Peri e ETA Morro dos Quadros. ETA Lagoa do Peri: coleta realizada 06/02/2013. ETA Morro dos Quadros: coleta realizada 02/08/2013.

Parâmetros Físico-Químicos:	ETA Lagoa do Peri	ETA Morro dos Quadros
pH	6,9	6,5
Oxigênio Dissolvido	7,53 mg/L	9,9 mg/L
Turbidez	1,52 uT	0,7 uT
Temperatura	25,3°C	19,1°C
Condutividade	53 µS/cm	24,1 µS/cm
Nitrito (NO ₂ ⁻)	0,56 µg/L	3,98 µg/L
Nitrato (NO ₃ ⁻)	4,34 µg/L	33,32 µg/L
Amônia (NH ₃ ⁺)	16,65 µg/L	34,40 µg/L

5.2. Análise de coliformes totais e *Escherichia coli*

Para a amostra de água filtrada ETA Lagoa do Peri, os 5 tubos após 24 h apresentaram coloração amarelado-turvos, o que significa resultado positivo para coliformes totais, e também fluorescência azul quando exposto à luz UV (referente à positividade de *E. coli*), resultando em valores acima de 8,0 NMP/100 mL de coliformes totais e 8,0 NMP/100 mL de *E. coli*.

Quanto à amostra de água filtrada ETA Morro dos Quadros, 3 tubos após 24 h foram positivos para coliformes totais, o que significa 4,6 NMP/100 mL de coliformes totais. Quanto à *E. coli*, nenhum tubo foi positivo, com valor inferior à 1,1 NMP/100 mL para este parâmetro.

5.3. Título do rAdV purificado

O rAdV purificado foi titulado por microscopia de fluorescência em 9×10^8 UFF/mL e por citometria de fluxo em $2,8 \times 10^{10}$ URF/mL.

5.4. Citotoxicidade da amostra

De acordo com o ensaio de citotoxicidade, somente as amostras das ETAs não diluídas apresentaram efeitos citotóxicos frente às células HEK 293A. Deste modo, foi selecionada a diluição 1:2 da amostra para os ensaios posteriores de análise da influência da amostra nas metodologias de cultura celular (citometria de fluxo e microscopia de fluorescência).

Quanto à linhagem A549 para as amostras de água tratadas, foi selecionada a diluição 1:4 para os ensaios posteriores de placa de lise.

5.5. Curva da expressão da GFP

Ao realizar a curva da expressão da GFP, foi observado em microscópio óptico invertido o início do aparecimento de efeito citopático (ECP) no MOI de 10, 1,0 e 0,5 com 20 h p.i. Depois de 40 h p.i. não haviam mais células aderidas no MOI de 10, enquanto no MOI de 1,0 e 0,5, 100% das células apresentavam ECP.

A figura 6 demonstra a curva da expressão da GFP. A análise estatística demonstrou que no MOI de 10 e 1 houve aumento significativo de fluorescência na transição de 18 h para 20 h, com valor de $P < 0.05$ (figura 7). Deste modo, foi escolhido o tempo pós-infecção de 24 h para realizar os ensaios de infecciosidade viral por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência, assegurando quantidade de expressão da proteína GFP e consequente fluorescência suficiente para detecção, assim como o primeiro ciclo de replicação viral.

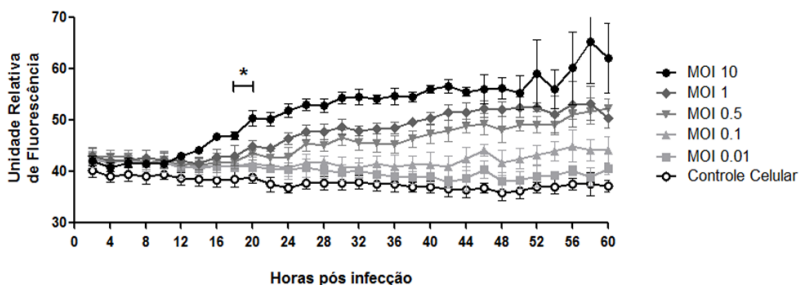


Figura 7. Curva da expressão da GFP (excitação/emissão: 395/508 nm), com células HEK 293A infectadas com rAdV nos MOIs de 0,01, 0,1, 0,5, 1 e 10 e controle celular. Em destaque (*), diferença significativa de fluorescência reportada $P < 0.05$.

5.6. Limite de sensibilidade e influência da amostra nas metodologias de cultura celular

Ao utilizar o mesmo fluído viral com as mesmas condições de diluições, foi possível comparar os métodos e determinar o limite de sensibilidade para as técnicas de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência.

O período de 24 h p.i. foi utilizado para estas técnicas, de acordo com o estabelecido no ensaio da curva da expressão da GFP (item 5.5. e figura 7).

5.6.1. Citometria de Fluxo

Para a citometria de fluxo, a média do título do estoque viral foi de $1,43 \times 10^9$ URF/mL e o limite de detecção ocorreu na diluição 10^{-4} , com valor de $2,15 \times 10^5$ URF/mL (figura 10). Não foi observada diferença estatística significativa entre o fluído viral diluído em meio de cultura celular e fluído viral diluído nas amostras de água das ETAs ($P > 0.05$), demonstrando que as matrizes não interferem nesta metodologia (dados não mostrados).

Como pode ser observado na tabela 2 e figura 8, a diluição 10^{-5} do fluído viral se encontra muito próxima do controle celular, contabilizando 147 células fluorescentes (0,29%). Desta forma, por

questões de sensibilidade, foi considerada a diluição 10^{-4} , com cerca de 10^5 URF/mL, como o limite de detecção da técnica de citometria de fluxo.

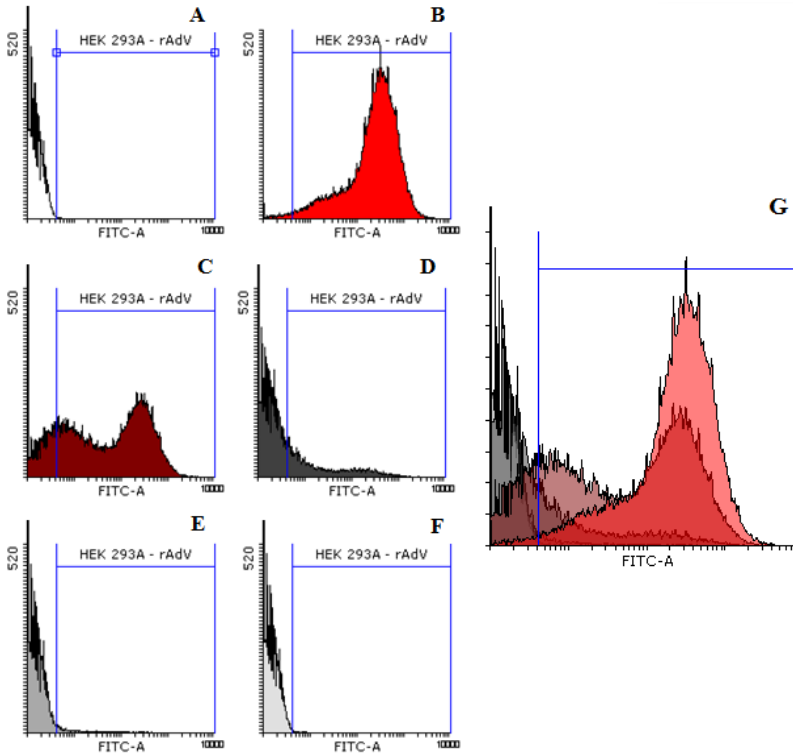


Figura 8. Histograma demonstrativo do limite de sensibilidade da citometria de fluxo do estoque viral diluído em meio de cultura celular. Controle celular (A), diluição 10^{-1} do estoque viral (B), diluição 10^{-2} do estoque viral (C), diluição 10^{-3} do estoque viral (D), diluição 10^{-4} do estoque viral (E), diluição 10^{-5} do estoque viral (F) e sobreposição dos histogramas A, B, C, D, E e F (G).

Tabela 2. Média do número e porcentagem de células fluorescentes do estoque viral diluído em meio de cultura celular e o limite de sensibilidade da citometria de fluxo.

	N° de células fluorescentes	% de células fluorescentes
Controle Celular	35	0,07
Diluição 10⁻¹	49.678	98,16
Diluição 10⁻²	38.745	76,90
Diluição 10⁻³	7.802	15,51
Diluição 10⁻⁴	956	1,90
Diluição 10⁻⁵	147	0,29

5.6.2. Microscopia de fluorescência

Nos ensaios de microscopia de fluorescência, a média do título do estoque viral foi de $8,5 \times 10^7$ UFF/mL. Na figura 9 estão demonstradas as diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} e o limite de detecção ocorreu na diluição 10^{-6} , correspondendo a $8,5 \times 10^1$ UFF/mL (figura 10). Da mesma forma, não foi observada diferença estatística significativa entre o fluído viral diluído em meio de cultura celular e fluído viral diluído nas amostras de água das ETAs ($P > 0.05$), demonstrando novamente que as matrizes não interferem nesta metodologia (dados não mostrados).

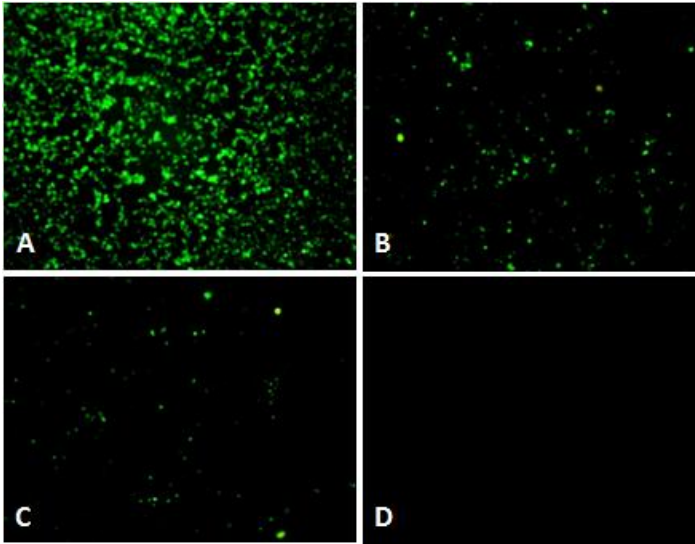


Figura 9. Demonstrativo da microscopia de fluorescência de células infectadas com rAdV. $8,3 \times 10^5$ UFF/mL (A), $8,3 \times 10^4$ UFF/mL (B), $8,3 \times 10^3$ UFF/mL (C) e controle celular (D). Aumento de 40x.

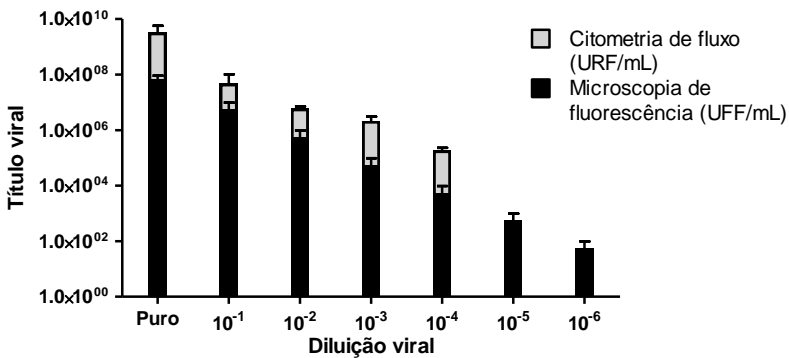


Figura 10. Detecção de rAdV (estoque viral) através das técnicas de citometria de fluxo (diluição máxima de 10^{-4}) e microscopia de fluorescência (diluição máxima de 10^{-6}).

5.7. Desinfecção viral em águas tratadas com cloro

5.7.1. Ensaio de decaimento de cloro livre nas matrizes

O ensaio de decaimento de cloro livre foi realizado em duplicata, com os dois tipos de água filtrada (ETA Lagoa do Peri e ETA Morro dos Quadros), além do tampão BDF (pH 8.0 e 6.9), à temperatura de 20°C, com 0,2 e 0,5 mg/L de cloro livre. As leituras da concentração de cloro livre foram realizadas ao longo do tempo.

Conforme esperado, o tampão livre de demanda de cloro (BDF) não apresentou decaimento do cloro livre, tanto no pH 8.0 quanto no pH 6.9. De maneira geral, as concentrações se mantiveram constantes durante o período de análise, demonstrando não haver decaimento significativo ($P > 0.05$) (dados não mostrados).

5.7.2. Demanda de cloro livre do estoque viral e curva de decaimento de cloro livre

Os experimentos foram realizados em duplicata com os dois tipos de água filtrada (ETA Lagoa do Peri e ETA Morro dos Quadros), além do tampão BDF (pH 8.0 e 6.9), adicionado de estoque viral à temperatura de 20°C, com 0,2 e 0,5 mg/L de cloro livre. Como controle, o mesmo procedimento foi realizado sem adição de vírus (item 5.7.1), e as leituras da concentração de cloro livre foram realizadas ao longo do tempo.

Não foram encontradas diferenças significativas na concentração de cloro livre entre a matriz (tampão BDF pH 8.0 e 6.9 e amostra de água ETA Lagoa do Peri e ETA Morro dos Quadros) e a matriz contendo estoque viral ($P > 0.05$), o que significa que o estoque viral não possui demanda significativa de cloro (figura 11).

Os valores da taxa de decaimento de cloro livre, mesmo que muito baixos, foram utilizados na modelagem de regressão exponencial de Chick-Watson (item 5.8).

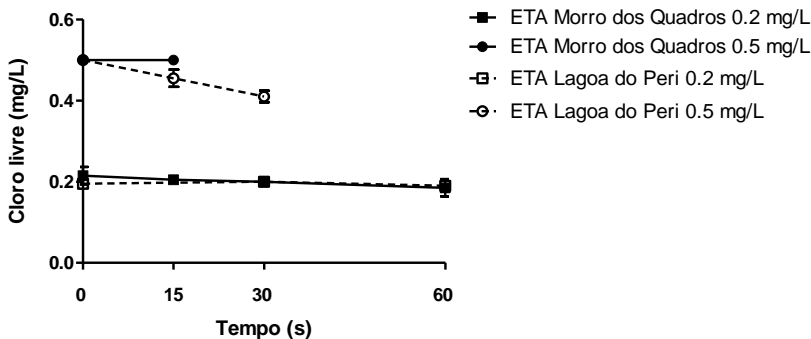


Figura 11. Demanda de cloro livre do estoque viral e curva de decaimento de cloro livre nas amostras de água da ETA Morro dos Quadros e ETA Lagoa do Peri com 0,2 mg/L e 0,5 mg/L de cloro livre.

5.7.3. Controle positivo

O controle positivo foi conduzido em duplicata, com rAdV adicionado em dois tipos de água filtrada (ETA Lagoa do Peri e ETA Morro dos Quadros), além do tampão BDF (pH 8.0 e 6.9), à temperatura de 20°C. A estabilidade viral foi avaliada por microscopia de fluorescência e qPCR.

Em ambas as técnicas, não foram observadas redução logarítmica significativa do estoque viral ao longo do tempo para todas as matrizes analisadas ($P > 0.05$) (figura 12).

Desta forma, qualquer redução logarítmica observada nos experimentos utilizando o cloro livre deveu-se à eficiência germicida deste composto, e não à exposição do vírus a estas condições experimentais (tempo, composição da matriz, temperatura).

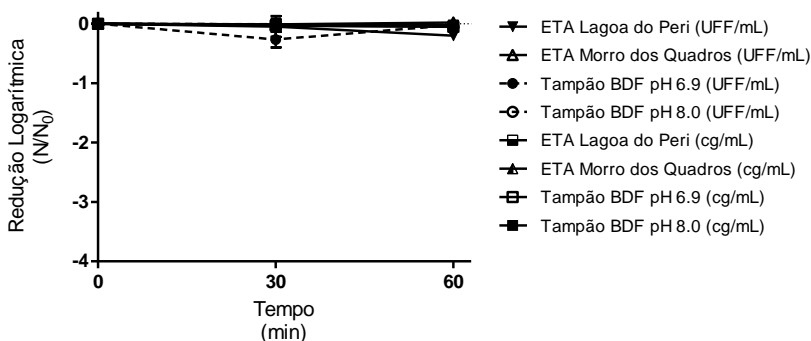


Figura 12. Estabilidade viral ao longo do tempo nas matrizes ETA Lagoa do Peri, ETA Morro dos Quadros, tampão BDF pH 6.9 e 8.0 à 20°C, avaliada por microscopia de fluorescência e qPCR.

5.7.4. Decaimento viral por cloro livre

As reações de desinfecção por cloro livre de rAdV foram realizadas em duplicata e conduzidas nos dois tipos de água filtrada (ETA Lagoa do Peri e ETA Morro dos Quadros), além do tampão BDF (pH 8.0 e 6.9), em duas concentrações de cloro livre (0,2 mg/L e 0,5 mg/L) e sob duas temperaturas (15°C e 20°C). As alíquotas foram analisadas quanto à viabilidade viral (microscopia de fluorescência – item 4.8.2.) e quantificação de cópias genômicas (qPCR – item 4.11.).

Os valores de redução logarítmica foram analisados com base na concentração inicial de vírus imediatamente antes da adição de cloro nas matrizes, dada como N_0 , e pela concentração de vírus em cada alíquota retirada após adição de cloro ao longo do tempo, expressa como N_t . Desta forma, o decaimento logarítmico viral ao longo do tempo foi calculado como: $\text{Log}_{10}(N_t/N_0)$. A inativação viral observada em microscópio de fluorescência está demonstrada na figura 13.

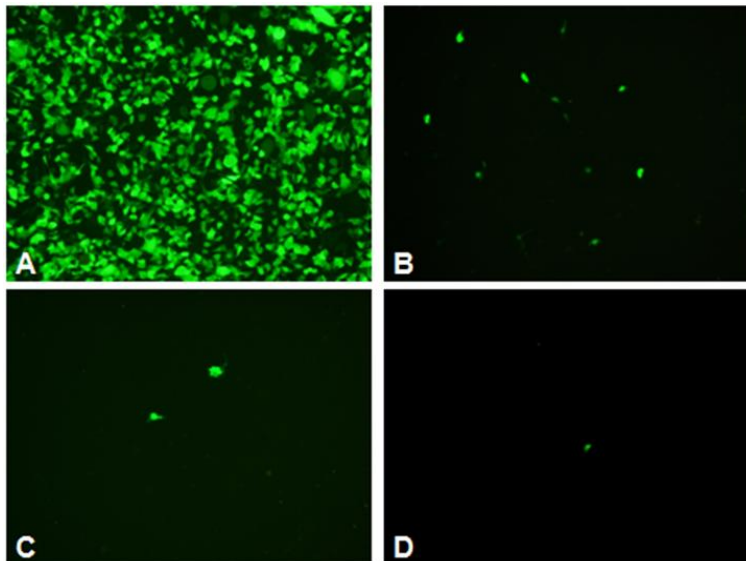


Figura 13. Demonstração do ensaio de microscopia de fluorescência das células HEK 293A infectadas com rAdV. Controle positivo (tempo 0) (A), redução aproximada de $2\log_{10}$ (B), $3\log_{10}$ (C) e $4\log_{10}$ (D) (Aumento de 100x).

A inativação de $4\log_{10}$ de rAdV foi atingida com sucesso para todas as condições experimentais. Com exceção do tampão BDF com pH 8,0, o tempo necessário para inativar $4\log_{10}$ de rAdV foi menor que 1 min, tanto para a concentração de 0,2 mg/L quanto para 0,5 mg/L de cloro livre, utilizando ensaio de viabilidade viral por microscopia de fluorescência (figuras 15, 16 e 17).

Para o tampão BDF pH 8,0, o decaimento se mostrou mais lento, com cerca de 2,5min com 0,5 mg/L de cloro livre para decair $4\log_{10}$, e 5min com 0,2 mg/L de cloro livre para alcançar o mesmo decaimento (figura 14).

A amostra de água ETA Morro dos Quadros (pH 6,5) foi a que apresentou maior eficiência de desinfecção, com tempo de 7s para redução de $4\log_{10}$ com 0,5 mg/L e em torno de 20s com 0,2 mg/L a 20°C (figura 17A).

De maneira geral, a inativação viral foi maior na matriz ETA Morro dos Quadros – pH 6,5 (figura 17), seguido da ETA Lagoa do Peri – pH 6,9, tampão BDF pH 6,9 (figura 15 e 16) e por último tampão BDF pH 8,0 (figura 14). Quando analisada a influência da temperatura, não

foi encontrada diferença significativa entre os experimentos realizados com 20°C e 15°C ($P > 0.05$).

Quanto à técnica de qPCR, a mesma não demonstrou variação significativa ($P > 0.05$) de redução logarítmica entre os tempos analisados para todas as condições experimentais, demonstrando que a análise do genoma viral de rAdV por qPCR são inadequados para observar a inativação viral em ensaios de desinfecção (figuras 14 a 17).

Também não foi encontrada diferença significativa entre as amostras ETA Lagoa do Peri e ETA Morro dos Quadros quanto à concentração de cloro (0.2 mg/L ou 0.5 mg/L) e à temperatura (15°C ou 20°C). Da mesma forma, quando comparadas com o tampão BDF pH 6.9 também não apresentaram diferença significativa, assim como os experimentos conduzidos com 10 mL e 40 mL ($P > 0.05$).

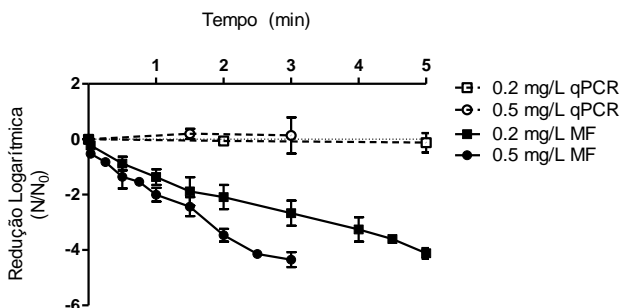


Figura 14. Curva de decaimento de rAdV em tampão BDF com pH 8.0 a 20°C, submetido a concentrações de 0,2 mg/L e 0,5 mg/L de cloro livre, por qPCR e microscopia de fluorescência (MF).

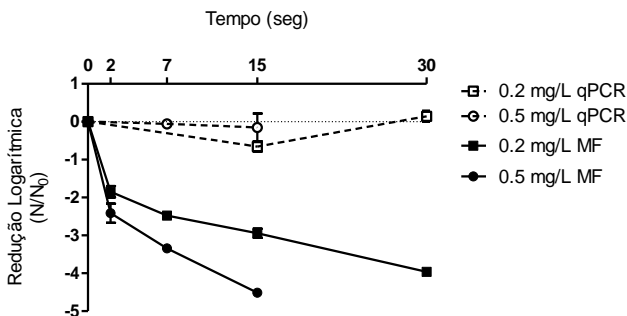


Figura 15. Curva de decaimento de rAdV em tampão BDF com pH 6.9 a 20°C, submetido a concentrações de 0,2 mg/L e 0,5 mg/L de cloro livre, por qPCR e microscopia de fluorescência (MF).

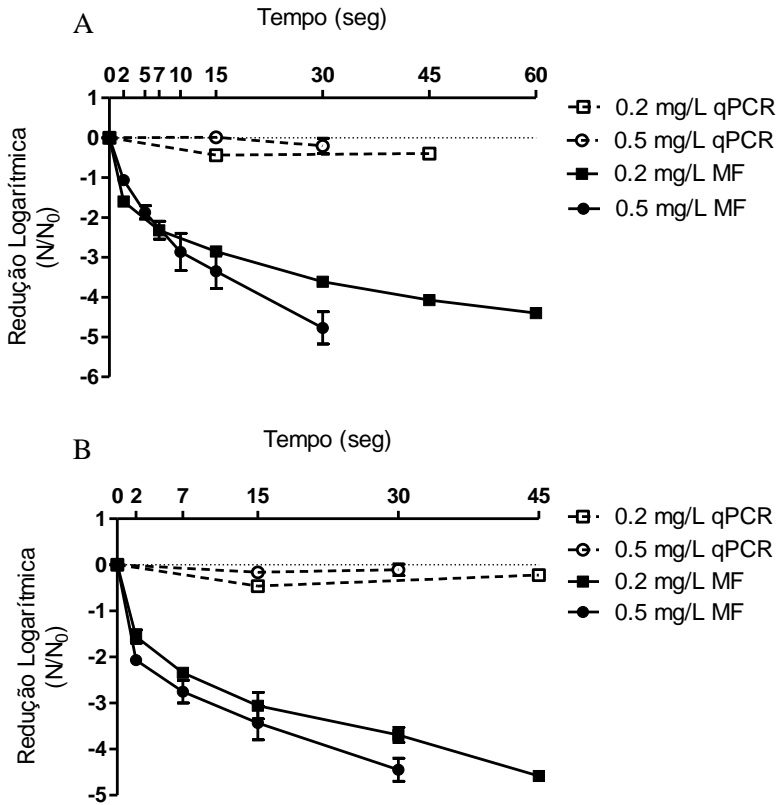


Figura 16. Curva de decaimento de rAdV na amostra de água ETA Lagoa do Peri (pH 6.9) a 20°C (A) e 15°C (B), submetido a concentrações de 0,2 mg/L e 0,5 mg/L de cloro livre, por qPCR e microscopia de fluorescência (MF).

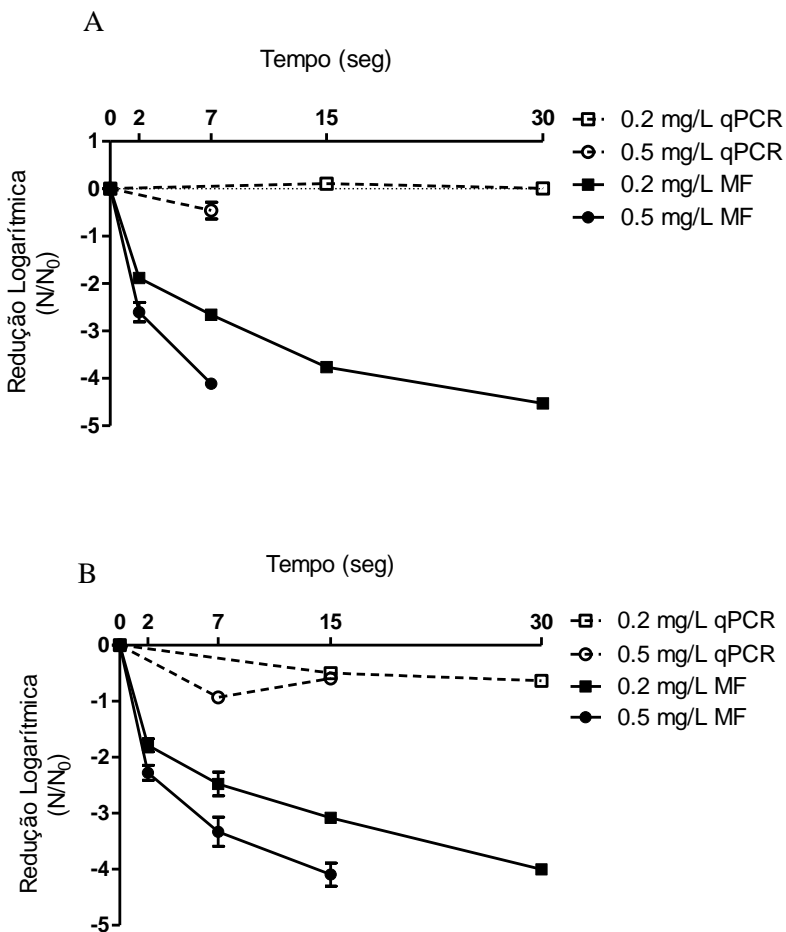


Figura 17. Curva de decaimento de rAdV na amostra de água ETA Morro dos Quadros (pH 6.5) a 20°C (A) e 15°C (B), submetido a concentrações de 0,2 mg/L e 0,5 mg/L de cloro livre, por qPCR e microscopia de fluorescência (MF).

Os valores de Ct observados foram calculados multiplicando a concentração de cloro livre inicial (mg/L) pelo tempo (min) e os gráficos plotados com valores de Ct versus redução logarítmica (Log_{10}

(N_t/N_0) observada no ensaio de infecciosidade viral por microscopia de fluorescência (figuras 18 a 23).

Como pode ser observado, em todos os gráficos ambas as retas (0.5 mg/L e 0.2 mg/L) tem um comportamento muito semelhante, não havendo diferença significativa entre as duas para todas as condições experimentais ($P > 0.05$) (figuras 18 a 23).

De maneira geral, todas as condições experimentais, com exceção do tampão BDF pH 8.0, obtiveram redução de $4\log_{10}$ com valores de Ct menores que 0.25 (tabelas 4 a 8). No caso do tampão BDF pH 8.0, a redução de $4\log_{10}$ ocorreu com valor de Ct aproximado de 1.25 (tabela 3).

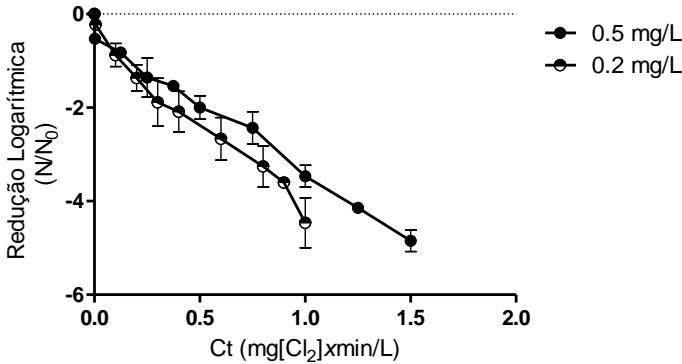


Figura 18. Valores de Ct observados para decaimento de rAdV em tampão BDF com pH 8.0 a 20°C por microscopia de fluorescência.

Tabela 3. Valores de Ct observados em duplicata para decaimento de rAdV no tampão BDF pH 8.0 a 20°C, por microscopia de fluorescência.

Ct (mg[Cl ₂] _x min/L)	Log (N/N ₀) 0.5 mg/L cloro livre		Log (N/N ₀) 0.2 mg/L cloro livre	
	0,0	0,0	0,0	0,0
0,0032	-0,6	-0,45		
0,0064			-0,15	-0,3
0,1			-0,69	-1,12
0,125	NA	-0,82		
0,2			-1,08	-1,65
0,25	-1,78	-0,94		
0,3			-1,37	-2,4
0,375	NA	-1,54		
0,4			-1,65	-2,5
0,5	-2,25	-1,75		
0,6			-2,21	-3,12
0,75	-2,78	-2,09		
0,8			-2,8	-3,7
0,9			NA	-3,6
1,0	-3,23	-3,7	-3,9	-5,0
1,25	NA	-4,14		
1,5	-5,08	-4,61		

*NA: não analisado

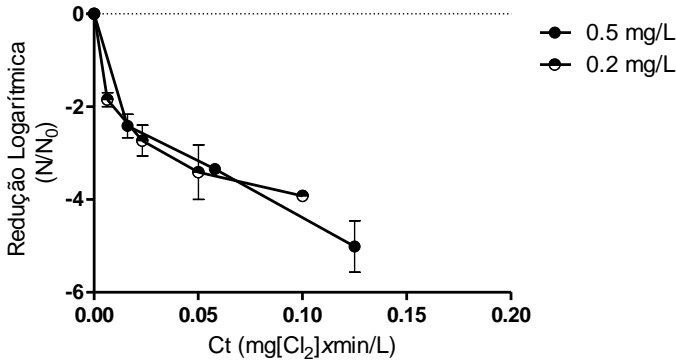


Figura 19. Valores de Ct observados para decaimento de rAdV em tampão BDF com pH 6.9 a 20°C por microscopia de fluorescência.

Tabela 4. Valores de Ct observados em duplicata para decaimento de rAdV no tampão BDF pH 6.9 a 20°C, por microscopia de fluorescência.

Ct (mg[Cl ₂]xmin/L)	Log (N/N ₀)		Log (N/N ₀)	
	0.5 mg/L cloro livre		0.2 mg/L cloro livre	
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,0064			-2,0	-1,7
0,016	-2,16	-2,66		
0,0232			-3,06	-2,4
0,05			-4,0	-2,82
0,058	-3,27	-3,45		
0,1			NA	-3,92
0,125	-4,46	-5,57		

*NA: não analisado

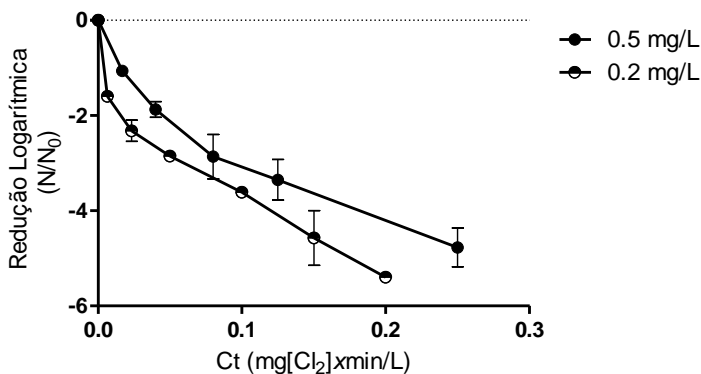


Figura 20. Valores de Ct observados para decaimento de rAdV na amostra de água ETA Lagoa do Peri (pH 6.9) a 20°C por microscopia de fluorescência.

Tabela 5. Valores de Ct observados em duplicata para decaimento de rAdV na amostra de água ETA Lagoa do Peri a 20°C, por microscopia de fluorescência.

Ct (mg[Cl ₂]xmin/L)	Log (N/N ₀) 0.5 mg/L cloro livre		Log (N/N ₀) 0.2 mg/L cloro livre	
	0,0	0,0	0,0	0,0
0,0064			-1,70	-1,49
0,0160	-1,12	-1,0		
0,0232			-2,54	-2,10
0,04	-2,04	-1,71		
0,05			-2,78	-2,92
0,08	-2,40	-3,33		
0,1			-3,67	-3,55
0,125	-2,92	-3,78		
0,15			-5,15	-4,0
0,2			NA	-5,40
0,25	-4,36	-5,18		

*NA: não analisado

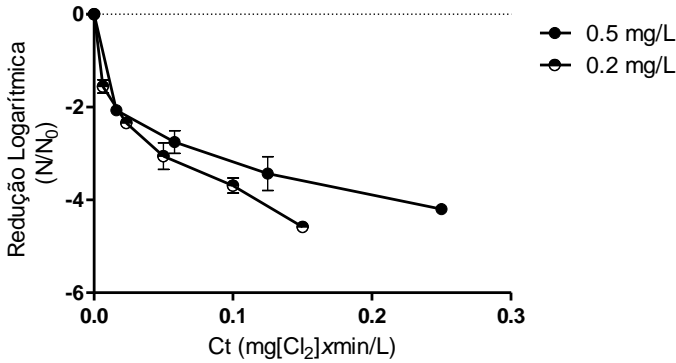


Figura 21. Valores de Ct observados para decaimento de rAdV na amostra de água ETA Lagoa do Peri (pH 6.9) a 15°C por microscopia de fluorescência.

Tabela 6. Valores de Ct observados em duplicata para decaimento de rAdV na amostra de água ETA Lagoa do Peri a 15°C, por microscopia de fluorescência.

Ct ($\text{mg}[\text{Cl}_2] \times \text{min/L}$)	Log (N/N_0)		Log (N/N_0)	
	0.5 mg/L cloro livre		0.2 mg/L cloro livre	
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,0064			-1,41	-1,70
0,016	-2,15	-1,98		
0,0232			-2,39	-2,30
0,05			-3,34	-2,77
0,058	-3,0	-2,51		
0,1			-3,53	-3,85
0,125	-3,79	-3,07		
0,15			-4,64	-4,52
0,25	NA	-4,20		

*NA: não analisado

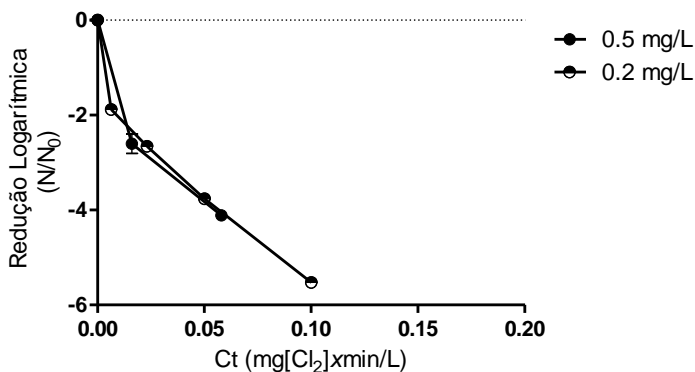


Figura 22. Valores de Ct observados para decaimento de rAdV na amostra de água ETA Morro dos Quadros (pH 6.5) a 20°C por microscopia de fluorescência.

Tabela 7. Valores de Ct observados em duplicata para decaimento de rAdV na amostra de água ETA Morro dos Quadros a 20°C, por microscopia de fluorescência.

Ct (mg[Cl ₂]xmin/L)	Log (N/N ₀) 0.5 mg/L cloro livre		Log (N/N ₀) 0.2 mg/L cloro livre	
	0,0	0,0	0,0	0,0
0,0064			-1,97	-1,79
0,016	-2,40	-2,81		
0,0232			-2,70	-2,61
0,05			-3,84	-3,68
0,058	-4,22	-4,0		
0,1			-5,49	-5,56

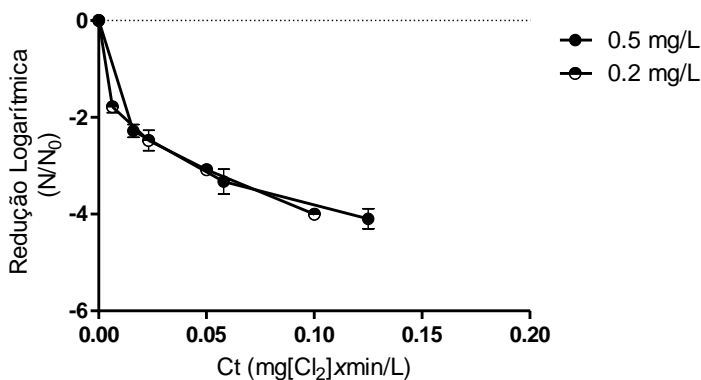


Figura 23. Valores de Ct observados para decaimento de rAdV na amostra de água ETA Morro dos Quadros (pH 6.5) a 15°C por microscopia de fluorescência.

Tabela 8. Valores de Ct observados em duplicata para decaimento de rAdV na amostra de água ETA Morro dos Quadros à 15°C, por microscopia de fluorescência.

Ct (mg[Cl ₂]xmin/L)	Log (N/N ₀) 0,5 mg/L cloro livre		Log (N/N ₀) 0,2 mg/L cloro livre	
	0,0	0,0	0,0	0,0
0,0064			-1,67	-1,90
0,016	-2,15	-2,41		
0,0232			-2,27	-2,69
0,05			-3,03	-3,13
0,058	-3,07	-3,59		
0,1			-4,03	-3,98
0,125	-4,30	-3,89		

5.8. Modelagem da cinética de desinfecção

Foram realizadas as modelagens de acordo com o modelo previamente descrito de predição de tempo de contato de Chick-Watson, e os parâmetros de k' (taxa de decaimento de cloro livre), k (taxa de inativação viral) e R^2 ($\ln(N/N_0)$ observado \times $\ln(N/N_0)$ modelo de

Chick-Watson) para cada condição experimental podem ser observados na tabela 9.

Tabela 9. Valor de k' (taxa de decaimento de cloro livre), k (taxa de inativação viral) e R^2 ($\ln(N/N_0)$ observado \times $\ln(N/N_0)$ modelo de Chick-Watson) determinados pelo modelo de Chick-Watson para cada condição experimental.

	Cloro livre (mg/L)	k' (min^{-1})	k (min^{-1})	R^2 ($\ln(N/N_0)$ observado \times modelo-CW)
BDF pH 8.0 20°C	0.2	0,0001	-3,6645	0,9709
	0.5	0,0001	-6,1967	0,9719
BDF pH 6.9 20°C	0.2	0,0001	-35,9078	0,7348
	0.5	0,0001	-82,9889	0,8125
ETA Lagoa do Peri 20°C	0.2	0,105	-52,0292	0,7852
	0.5	0,397	-47,5822	0,9106
ETA Lagoa do Peri 15°C	0.2	0,105	-72,7319	0,8382
	0.5	0,397	-44,3554	0,7655
ETA Morro dos Quadros 20°C	0.2	0,147	-100,5580	0,7913
	0.5	0,0001	-162,8456	0,8712
ETA Morro dos Quadros 15°C	0.2	0,147	-88,9608	0,7844
	0.5	0,0001	-75,0303	0,7695

Os valores de Ct (mg/L \times min) preditos para inativação viral foram determinados através da multiplicação do tempo (min) e concentração de cloro livre (C_t^n) em cada intervalo de tempo calculada pelo modelo de Chick-Watson, quando aproximadamente a inativação de $2\log_{10}$, $3\log_{10}$ e $4\log_{10}$ ocorreu e estão demonstrados na tabela 10.

Quanto à modelagem, os valores de Ct para inativação de $4\log_{10}$ foram de (1) 0,058 para ETA Morro dos Quadros 20°C com 0,5 mg/L de cloro livre; (2) seguido de 0,092 da ETA Morro dos Quadros

15°C e 20°C com 0,2 mg/L de cloro livre; (3) em torno de 0,125 para ETA Morro dos Quadros 15°C com 0,5 mg/L, ETA Lagoa do Peri 15°C e 20°C com 0,2 mg/L e Tampão BDF pH 6.9 com 0,5 mg/L de cloro livre; (4) 0,159 para ETA Lagoa do Peri 15°C e 20°C com 0,5 mg/L de cloro livre; (5) 0,249 para BDF pH 6.9 com 0,2 mg/L de cloro livre; (6) 1,249 para Tampão BDF pH 8.0 com 0,5 mg/L, e por último (7) 2,497 para Tampão BDF pH 8.0 com 0,2 mg/L de cloro livre (tabela 10).

Tabela 10. Valores de Ct para inativação de rAdV por cloro livre determinado pelo modelo de Chick-Watson para cada condição experimental.

	Ct 2log₁₀	Ct 3log₁₀	Ct 4log₁₀	Ct manual EPA (1991)
BDF pH 8.0				1 (2log ₁₀)
0,2 mg/L	0,999	1,998	2,497	2 (3log ₁₀)
0,5 mg/L	0,749	0,999	1,249	3 (4log ₁₀)
BDF pH 6.9				1 (2log ₁₀)
0,2 mg/L	0,016	0,124	0,249	2 (3log ₁₀)
0,5 mg/L	0,016	0,058	0,124	3 (4log ₁₀)
ETA Lagoa do Peri 20°C				1 (2log ₁₀)
0,2 mg/L	0,022	0,047	0,127	2 (3log ₁₀)
0,5 mg/L	0,038	0,101	0,159	3 (4log ₁₀)
ETA Lagoa do Peri 15°C				2 (2log ₁₀)
0,2 mg/L	0,022	0,047	0,127	3 (3log ₁₀)
0,5 mg/L	0,016	0,101	0,159	4 (4log ₁₀)
ETA Morro dos Quadros 20°C				1 (2log ₁₀)
0,2 mg/L	0,007	0,049	0,092	2 (3log ₁₀)
0,5 mg/L	NA	0,016	0,058	3 (4log ₁₀)
ETA Morro dos Quadros 15°C				2 (2log ₁₀)
0,2 mg/L	0,024	0,049	0,092	3 (3log ₁₀)
0,5 mg/L	0,016	0,058	0,125	4 (4log ₁₀)

*NA: Não analisado

5.9. Avaliação das amostras de água tratadas quanto à viabilidade de HAdV, concentração de cloro livre e colimetria

Amostras de água tratada provenientes diretamente da ETA Lagoa do Peri e ETA Morro dos Quadros e em um ponto longínquo representando cada uma das ETAs (água da torneira de uma residência e água da torneira da UFSC, respectivamente) foram testadas quanto aos coliformes totais e *E. coli* (item 4.3.), concentração de cloro livre (mg/L) e viabilidade de HAdV (item 4.14.).

A recuperação média da técnica de concentração viral por floculação orgânica foi de 6,4%. Das amostras testadas, a coletada na torneira da UFSC (representando a rede de distribuição ETA Morro dos Quadros) apresentou contaminação por HAdV infecciosos numa quantidade de $2,75 \times 10^3$ UFP/L (valor corrigido pela recuperação). Neste ponto, a concentração de cloro livre medida foi de 0,57 mg/L.

A concentração de cloro livre observada se encontra dentro do padrão exigido pela Portaria 2.914/2011, que delimita o valor mínimo de 0,2 mg/L e máximo de 5,0 mg/L (ANVISA, 2011).

Quanto aos coliformes, nenhuma amostra apresentou positividade tanto para coliformes totais quanto para *E. coli*, com valor inferior à sensibilidade informada pelo kit ($>1,1$ NMP/100 mL) conforme esperado pelo padrão de potabilidade estabelecido pela mesma portaria (Tabela 11).

Tabela 11. Análises das amostras de água tratada coletadas na saída da ETA Lagoa do Peri e ETA Morro dos Quadros e em um ponto na rede de distribuição de cada uma, quanto à viabilidade de HAdV, concentração de cloro livre (mg/L) e presença de coliformes totais e *E. coli*.

	Placa de Lise HAdV (UFP/L)	Cloro livre (mg/L)	Coliformes totais e <i>E. coli</i> (NMP/100 mL)
ETA Lagoa do Peri	>1 x 10 ³	1,65	>1,1
Rede de Distribuição ETA Lagoa do Peri - torneira de uma residência	>1 x 10 ³	0,6	>1,1
ETA Morro dos Quadros	>1 x 10 ³	4,0	>1,1
Rede de Distribuição ETA Morro dos Quadros - torneira da UFSC	2,75 x 10 ³	0,57	>1,1

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou a eficiência de desinfecção por cloro utilizando como modelo o adenovírus recombinante em águas ambientais em condições que procuraram mimetizar ao máximo a realidade brasileira no que se refere ao pH, temperaturas ambientais e a própria qualidade da água que é submetida ao processo de desinfecção em uma ETA, ou seja, água filtrada que em seguida é encaminhada à cloração. Para tanto, foi necessário estabelecer e padronizar as técnicas de cultura celular para avaliar a viabilidade viral para este novo modelo proposto.

O adenovírus recombinante (rAdV) tem sido utilizado amplamente como vetor em estudos de expressão gênica e aplicações terapêuticas, como transferência gênica *in vitro*, terapia gênica e como vetor em vacinas (MILLER, 1992; NADEAU; KAMEN, 2003; MCCONNELL; IMPERIALE, 2004). Apesar do bem-estabelecido uso de rAdV, esse trabalho descreve a primeira utilização do mesmo no campo da virologia ambiental, especificamente em água filtrada destinada ao consumo humano.

O uso do rAdV mostrou-se econômico, prático e rápido, visto que a sua detecção não requer o uso de anticorpos comumente necessários para testes de imunodetecção como a citometria de fluxo e microscopia de fluorescência (imunofluorescência). Além da praticidade e economia, a não utilização de anticorpos primários e secundários diminui também a possibilidade de superestimação de títulos virais devido a ligações não específicas. Ainda, descreve-se que a detecção de fluorescência de GFP de células HEK 293A infectadas com rAdV por citometria de fluxo se mostrou maior do que quando utilizados anticorpos anti-hexon (LI; HE; JIANG, 2010). Além disso, o uso do rAdV diminui a perda de células durante as etapas de lavagem comumente realizadas nas técnicas de imunodetecção, além de mais rápida (24 h) do que o método convencional de placa de lise, descrita por Cromeans et al. (2008), que leva cerca de 7 a 10 dias.

Quanto à curva da expressão da GFP, o período de 24 h p.i. foi escolhido por garantir emissão de fluorescência ótima para detecção nos ensaios posteriores de microscopia de fluorescência e citometria de fluxo, bem como por garantir o primeiro ciclo de replicação viral. Descreve-se que o ciclo de replicação do adenovírus em células HeLa (células tumorais cervicais) seja entre 24 e 36h (WOLD; HORWITZ *in*: KNIPE; HOWLEY, 2007), apesar do tempo de replicação viral variar entre linhagens celulares distintas. É importante não permitir longos períodos de replicação viral, visto que isso pode superestimar o título

viral, já que no final de um ciclo cerca de 10^4 partículas virais por célula podem ser produzidas, mascarando o real título viral (GREEN; DAESCH, 1961).

O título viral por citometria de fluxo ($2,8 \times 10^{10}$ URF/mL) foi maior do que o determinado por microscopia de fluorescência (9×10^8 UFF/mL), apesar deste último apresentar menor limite de detecção ($2,15 \times 10^5$ URF/mL *versus* $8,5 \times 10^1$ UFF/mL). O alto limite de detecção de adenovírus por citometria de fluxo após 24h de infecção já foi reportado previamente (LI; HE; JIANG, 2010).

Desta forma, as técnicas de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência se mostraram viáveis, confiáveis, rápidas e de baixo custo para detectar rAdV infeccioso como modelo viral em água filtrada destinada ao consumo humano. Igualmente, as matrizes ambientais utilizadas não interferiram e/ou alteraram os resultados obtidos apresentando a mesma sensibilidade quando comparada ao fluido viral purificado e diluído em PBS.

A etapa de purificação viral é primordial em experimentos de desinfecção por cloro livre, visto que suspensões virais contêm quantidades consideráveis de matéria orgânica, como componentes celulares e proteínas, que contém agentes redutores como a cisteína, que consomem o cloro livre, impedindo que esse tenha ação virucida e bactericida (URAKAMI *et al.*, 2007). Neste trabalho, o rAdV foi purificado cromatograficamente, utilizando-se o kit comercial Vivapure® AdenoPack™ 500 Sartorius Stedin, e este vírus purificado mostrou-se adequado para realização de desinfecção por cloro livre, visto que as concentrações do desinfetante não variaram significativamente na presença do fluido viral purificado ($P > 0.05$).

Sabe-se que a etapa de preparação do microrganismo a ser avaliado na desinfecção por cloro livre é primordial e pode influenciar significativamente na curva de inativação (SHIN; SOBSEY, 2008), bem como se as partículas virais estão agregadas, associadas às partículas/células ou dispersas. A agregação viral pode ocorrer pela mudança conformacional no capsídeo causada pelo pH ou condições salinas do meio (THURMAN; GERBA, 1988) e a associação às células é uma consequência do método de purificação viral (THURSTON-ENRIQUEZ *et al.*, 2003). Estas duas condições, agregação viral e associação à célula já foram relatadas por causar efeito protetor, promovendo a resistência ao cloro (SOBSEY; FUJI; HALL, 1991; THURSTON-ENRIQUEZ *et al.*, 2003), visto que desta forma as partículas virais estão mais protegidas quando agregadas/associadas do que quando isoladas na matriz aquática.

Ainda, recomenda-se que os valores de *Ct* deveriam ser baseados em estudos conduzidos com vírus agregados ou associados às células, visto que os vírus que ocorrem naturalmente no ambiente provavelmente estão associados com matéria orgânica ou agregados (SOBSEY; FUJI; HALL, 1991). No entanto, o tamanho desses conjugados (agregados ou associados) é de 0,5 a 1,0 µm, não permitindo que os mesmos sejam retidos com eficiência na etapa de filtração da ETA (THURSTON-ENRIQUEZ *et al.*, 2003).

Sabe-se que a purificação por polietileno glicol (PEG) produz vírus associados às células e se utilizado o clorofórmio em etapa subsequente, promove-se a dispersão viral (THURSTON-ENRIQUEZ *et al.*, 2003; CROMEANS; KAHLER; HILL, 2010; KAHLER *et al.*, 2010), entretanto tem-se relatado que o próprio clorofórmio diminui significativamente a viabilidade viral (URAKAMI *et al.*, 2007). Também é utilizado o método de centrifugação com colchão de sacarose (URAKAMI *et al.*, 2007) e ultrafiltração (PAGE; SHISLER; MARIÑAS, 2009). Este trabalho foi o primeiro a utilizar como método de purificação a cromatografia em kit comercial e mostrou-se comparável aos trabalhos que utilizaram outras formas de purificação, com valores de *Ct* comparáveis (CROMEANS; KAHLER; HILL, 2010; KAHLER *et al.*, 2010).

Diversos trabalhos já avaliaram a eficiência de desinfecção de adenovírus humano por cloro livre em tampão (THURSTON-ENRIQUEZ *et al.*, 2003; PAGE; SHISLER; MARIÑAS, 2009; CROMEANS; KAHLER; HILL, 2010), em águas de rio e lagos (KAHLER *et al.*, 2010), em águas subterrâneas (THURSTON-ENRIQUEZ *et al.*, 2003), em água do mar (CORRÊA *et al.*, 2012) e em esgoto (FRANCY *et al.*, 2012). No entanto, esse é o primeiro estudo de desinfecção de adenovírus por cloro livre que utiliza como matriz águas superficiais no Brasil, mais especificamente água filtrada em processo de potabilização, e também o primeiro que utiliza como modelo para avaliar a eficiência de desinfecção o adenovírus recombinante (rAdV), comparando ainda técnicas baseadas na detecção do genoma (PCR) com técnicas baseadas em infecciosidade (cultura celular).

Quanto às condições experimentais, quando foi avaliada a influência da temperatura (15°C e 20°C) não foi observada diferença significativa na eficiência de desinfecção ($P > 0.05$). Provavelmente, a amplitude térmica de 5°C não foi suficiente para observar a influência da temperatura. No entanto, estas temperaturas ocorrem regularmente durante o ano nas águas superficiais na região sul do Brasil (FONTES *et al.*, 2013), destacando a importância de analisar as condições que

ocorrem naturalmente no ambiente. Outros autores que avaliaram uma amplitude térmica maior, de pelo menos 10°C (5°C e 15°C) a 29°C (1°C a 30°C) conseguiram observar a influência da temperatura: quanto maior a temperatura, maior a taxa de inativação viral (THURSTON-ENRIQUEZ *et al.*, 2003; PAGE; SHISLER; MARIÑAS, 2009; KAHLER *et al.*, 2010).

Em relação ao pH das matrizes, pode-se observar a grande influência que esse parâmetro promove na eficiência de desinfecção. Quando se compara os experimentos realizados com tampão BDF pH 8.0 ao com tampão BDF pH 6.9, o tempo necessário para inativar $4\log_{10}$ em pH 8.0 é cerca de 10 vezes maior do que o tempo necessário para inativar a mesma quantidade em pH 6.9, tanto para 0.2 mg/L quanto para 0.5 mg/L de cloro livre. Quanto às formas de cloro residual livre, no pH 8.0 tem-se cerca de 25% de ácido hipocloroso (HOCl) e 75% de íon hipoclorito (HCl^+), enquanto no pH 6.9 cerca de 80% é ácido hipocloroso (HOCl) e 20% é íon hipoclorito (HCl^+) (figura 1). Como já mencionado, a eficiência germicida do ácido hipocloroso (HOCl) é cerca de 100 vezes maior do que o íon hipoclorito (HCl^+) (AWWA, 2006), o que justifica a diferença observada na eficiência de desinfecção nos dois pHs avaliados. Desta forma, se torna imprescindível a realização de controle do pH nas ETAs durante todo o processo, principalmente antes da etapa de desinfecção, visto a grande influência deste fator.

É possível observar que a curva de inativação para todas as condições experimentais, com exceção do tampão BDF pH 8.0, foi caracterizada por duas fases: uma fase inicial na qual a inativação ocorreu de forma rápida (cerca de $2\log_{10}$ em 2 segundos), seguida de uma fase com taxa de inativação menor, que pode ser chamada de fase de cauda. Page et al. (2009) descreve que a perda da eficiência de desinfecção observada na fase de cauda é provavelmente resultado da rápida transformação de agrupamentos químicos específicos da estrutura viral que reagem preferencialmente com o ácido hipocloroso (HOCl). Desta forma, alguns autores propõem que, pela alta reatividade com proteínas e pela sua abundância em sistemas biológicos, a transformação de proteínas mediada por HOCl desempenha um papel chave na perda da função biológica desta forma de cloro residual livre, levando a formação da fase de cauda (HAWKINS; DAVIES, 2005; PATTISON; HAWKINS; DAVIES, 2007; WINTER *et al.*, 2008). Como principal característica, o capsídeo do adenovírus contém fibras e proteínas que são fisicamente mais expostas ao desinfetante. Estas proteínas contêm grupamentos funcionais como aminas e tióis que reagem com cloro

livre, levando à perda da função biológica do desinfetante (PATTISON; DAVIES, 2001).

A formação de cloraminas ocorre quando a amônia (NH_3) reage com o ácido hipocloroso (HOCl), levando à formação de monoclорamina (NH_2Cl), dicloramina (NHCl_2) ou tricloramina (NCl_3). A distribuição destas formas de cloraminas é dependente de pH, temperatura e concentrações relativas de NH_3 e HOCl . Em condições de pH acima de 8.0 e quando a razão HOCl/NH_3 é menor que 1 (ou seja, tem mais NH_3 do que HOCl), a monoclорamina é a única formada. Quando o pH é menor que 8.0 e a razão HOCl/NH_3 é maior que 1 (ou seja, tem mais HOCl do que NH_3), dicloramina e tricloramina são preferencialmente formadas. A eficiência germicida da monoclорamina é cerca de 10.000 vezes menor que o ácido hipocloroso, e a dicloramina e tricloramina possuem ação desinfetante desprezíveis (USEPA, 1994).

As amostras de água filtrada da ETA Lagoa do Peri e ETA Morro dos Quadros possuem 16,65 $\mu\text{g}/\text{L}$ e 34,40 $\mu\text{g}/\text{L}$ de amônia (NH_3), com pH de 6.9 e 6.5, respectivamente. Nestas condições, a razão HOCl/NH_3 é aproximadamente 9,61 (0,2 mg/L de cloro livre) e 28,82 (0,5 mg/L de cloro livre) para a ETA Lagoa do Peri e 5,23 (0,2 mg/L de cloro livre) e 13,08 (0,5 mg/L de cloro livre) para ETA Morro dos Quadros, (considerando que ocorre aproximadamente 80% e 90% de ácido hipocloroso para ETA Lagoa do Peri e ETA Morro dos Quadros, respectivamente) levando à formação de dicloraminas e tricloraminas, que não apresentam ação desinfetante na mesma proporção que as monoclорaminas (USEPA, 1994).

Além disso, como já mencionado, a agregação viral fornece maior proteção da ação do desinfetante (THURSTON-ENRIQUEZ *et al.*, 2003). Com isto, em conjunto com a provável agregação viral, com o consumo de HOCl pelas proteínas virais e a reação com NH_3 , pode-se observar a formação de curva bifásica, onde a taxa de desinfecção é menor característico da fase de cauda, para todas as condições experimentais, com exceção do tampão BDF pH 8.0.

Os nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-) são íons que ocorrem naturalmente como parte do ciclo do nitrogênio, sendo que o nitrato é a forma estável, que pode ser reduzida à nitrito, que é relativamente instável. O nitrito também pode ser formado pela oxidação do amônio e, em condições de oxidação normais, a conversão dos nitritos em nitratos é quase imediata (WHO, 2011), justificando desta forma os valores maiores de nitrato em relação ao nitrito encontrados neste trabalho: as amostras de água da ETA Lagoa do Peri e da ETA Morro dos Quadros

apresentaram 0,56 e 3,98 $\mu\text{g/L}$ de nitrito e 4,34 e 33,32 $\mu\text{g/L}$ de nitrato, respectivamente.

Os nitratos podem ser introduzidos nas águas superficiais principalmente pela atividade de agricultura (visto que é utilizado como fertilizante inorgânico), pelo tratamento de esgoto e pela oxidação de compostos nitrogenados encontrados nos dejetos humanos e animais. Os nitritos são compostos intermediários, formados pela atividade de bactérias oxidantes de amônia (*ammonia-oxidizing bacteria* - AOB), que oxidam biologicamente amônia em nitrito e posteriormente em nitrato (WHO, 2011).

O nitrato pode ser absorvido pelas plantas em crescimento e utilizado como fonte para compostos nitrogenados. Porém, em condições aeróbias e quando não há vegetação, o nitrato pode percolar em grandes quantidades e contaminar as águas superficiais. A concentração de nitrato nas águas superficiais podem alcançar altos níveis (acima de 18 mg/L) como resultado do despejo de dejetos da agricultura e despejo de esgoto não tratado humano e/ou animal (WHO, 2011). De acordo com este parâmetro, pode-se perceber que os mananciais que abastecem a ETA Morro dos Quadros e ETA Lagoa do Peri recebem dejetos da agricultura e/ou humanos e animais, levando à formação de nitrato em sua composição, mesmo que em concentrações baixas (33,32 $\mu\text{g/L}$ e 4,34 $\mu\text{g/L}$, respectivamente). A portaria MS 2.914/2011 prevê como valor máximo aceitável de nitrato e nitrito na água potável 10 mg/L e 1 mg/L, respectivamente (ANVISA, 2011), e se considera que a maneira mais adequada de controlar as concentrações de nitrato seja prevenindo a contaminação do manancial (WHO, 2011).

A nitrificação pode ocorrer em sistemas que utilizam cloraminas como agentes de desinfecção: a formação das monoclорaminas se dá pela reação da amônia (NH_3) com ácido hipocloroso (HOCl). Uma vez formada, as monoclорaminas (NH_2Cl) oxidam o nitrito (NO_2^-) a nitrato (NO_3^-), levando à diminuição desse agente desinfetante (WAHMAN; SPEITEL, 2012).

A curva de inativação viral nos experimentos realizados com tampão BDF pH 8.0 pode estar associada com dano envolvendo agentes oxidantes secundários (PAGE; SHISLER; MARIÑAS, 2009). Além de neste pH a concentração de ácido hipocloroso (HOCl) estar em torno de 25% (AWWA, 2006), substâncias químicas como a amônia (NH_3) podem reagir com HOCl, formando as monoclорaminas (NH_2Cl), que além de serem menos eficientes para desinfecção, reduzem a disponibilidade de HOCl para a desinfecção (USEPA, 1994; PAGE; SHISLER; MARIÑAS, 2009). Além disso, as monoclорaminas podem

ser consumidas pela oxidação do nitrito à nitrato (WAHMAN; SPEITEL, 2012). Estes fatores tornam a desinfecção mais lenta e não foi observado comportamento bifásico, quando comparado com experimentos conduzidos com tampão BDF pH 6.9.

O valor de turbidez das amostras de água ETA Lagoa do Peri (1,52 uT) e ETA Morro dos Quadros (0,7 uT), excedeu o preconizado para 95% das amostras de 0,5 uT para ETA que utiliza filtração direta (ANVISA, 2011). Apesar de a turbidez estar associada com uma maior sobrevivência viral por facilitar a formação de agregados, protegendo os vírus da ação desinfetante (SOBSEY; FUJI; HALL, 1991; THURSTON-ENRIQUEZ *et al.*, 2003), esses valores de turbidez nas duas ETAs não pareceu influenciar a desinfecção viral e o mesmo também foi descrito por Kahler *et al.* (2003). Os valores de Ct observados para ETA Lagoa do Peri e ETA Morro dos Quadros não diferiram estatisticamente do encontrado no tampão BDF pH 6.9, que não continham partículas que provocariam uma maior turbidez ($P > 0.05$).

O ensaio de qPCR mostrou-se rápido e específico para detecção e quantificação de genomas do rAdV, contudo, esta técnica não foi capaz de fornecer informação à respeito dos vírus inativados, como demonstrado pela técnica de microscopia de fluorescência. Apesar de alguns estudos relatarem que o cloro livre pode danificar o material genético viral (NUANUALSUWAN; CLIVER, 2003; PAGE, SHISLER; MARINÃS, 2010), por interagir com o grupamento amina dos nucleotídeos (PRUTZ, 1996, 1998), sugere-se que a extensão do dano no DNA provocada pelo cloro livre não seja suficiente para detectar a inativação viral pela técnica de qPCR, que comumente resulta em um produto de amplificação muito pequeno (HERNROTH *et al.*, 2002). Page *et al.* (2010) realizaram PCR qualitativo, com conjuntos de iniciadores que geravam amplicons de 400 pb à 1.215 pb e observou que a integridade do genoma não diminuiu na mesma extensão que a viabilidade de HAdV, mesmo aplicando maiores concentrações de cloro. Isso sugere que a habilidade do cloro livre de provocar dano no genoma viral seja limitada (PAGE, SHISLER; MARINÃS, 2010) e que vírus com lesões nas proteínas do capsídeo provocadas pelo cloro, podem conter genomas protegidos de inativação que são detectados por técnicas moleculares. Por este motivo, a avaliação de risco baseada em cópias genômicas se mostra inadequada, superestimando o real risco ao se consumir uma água potável tratada com cloro quando analisado somente cópias genômicas via qPCR.

Quando foi avaliada a água tratada distribuída pela companhia de saneamento de Florianópolis, na saída da ETA e em um ponto na rede de distribuição, estas amostras de água foram consideradas próprias para consumo, visto que em relação aos parâmetros bacteriológicos não foram detectados coliformes totais e *E. coli*, além da concentração de cloro livre estar também em conformidade com o preconizado para água potável pela Portaria MS 2.914/2011 (ANVISA, 2011). No entanto, quando avaliada a viabilidade de HAdV, foi detectado $2,75.10^3$ UFP/L na rede de distribuição da ETA Morro dos Quadros (torneira da UFSC), mesmo com 0,57 mg/L de cloro livre.

Apesar de ter sido somente uma amostra coletada, a ausência de HAdV viáveis na saída de ambas as ETA e a presença de vírus infecciosos na rede de distribuição sugere que o tratamento de água empregado nas Estações são eficientes para inativação do HAdV e que, a detecção do mesmo na rede de distribuição sugere que esteja ocorrendo contaminação na rede de abastecimento. Desta forma, concentrações de cloro residual muito baixa ao longo do sistema de distribuição de água podem não ser altas o suficiente para inativar vírus que foram introduzidos após o processo de tratamento de água (THURSTON-ENRIQUEZ *et al.*, 2003).

É amplamente conhecido que bactérias podem entrar na rede por infiltração no sistema da rede de distribuição de água, ou mesmo resistindo ao tratamento de água. As mesmas podem utilizar como substratos biodegradáveis matérias orgânicas produzidas por outros microrganismos que resistiram ao tratamento, ou que entraram pela própria infiltração na rede e com isso conseguem se adsorver, iniciar a multiplicação e levar à formação de biofilmes (BOIS *et al.*, 1997). Há a hipótese de que os biofilmes podem desempenhar um papel na acumulação, proteção e disseminação de patógenos nas redes de distribuição de água potável (HELMI *et al.*, 2008, STEWART *et al.*, 2001).

Já é descrito que a formação de biofilmes permite que as bactérias sejam muito mais resistentes ao tratamento por cloro livre quando: 99,7% resistem à 1mg/L de cloro livre e 99% na presença de 3 mg/L (BOIS *et al.*, 1997), além desta estrutura poder suportar o desenvolvimento também de protozoários (KEEVIL, 2003). Outros microrganismos como macroinvertebrados (crustáceos, platelmintos, nematoides e insetos) (LEVY *et al.*, 1984) e algas (SILVERMAN; NAGY; OLSON, 1983) também tem sua resistência à desinfecção aumentada quando estão agregados ou adsorvidos em superfícies. Também tem se mostrado que os vírus podem se adsorver aos biofilmes

(DOOLITTLE; COONEY; CALDWELL, 1996; QUIGNON *et al.*, 1997a, 1997b; SZEWZYK *et al.*, 2000).

Apesar de terem sido coletadas poucas amostras, podemos presumir que a detecção de HAdV viáveis na rede de distribuição pode ser devido à própria agregação viral e a adsorção à partículas, já relatadas que aumentam a resistência no ambiente e ao cloro (SOBSEY; FUJI; HALL, 1991; GANTZER *et al.*, 1998; THURSTON-ENRIQUEZ *et al.*, 2003) ou à adsorção a biofilmes, protegendo-os também da ação desinfetante do cloro livre.

Os valores de Ct para cloro livre descritos no manual da EPA (USEPA, 1991) foram baseados em um trabalho de Sobsey (SOBSEY *et al.*, 1988 *in*: USEPA, 1991) que utilizou como modelo o vírus da hepatite A em tampão BDF a 5°C, com pH de 6 a 10. Os maiores valores de Ct observados por Sobsey no pH 9 foram multiplicados por um fator de segurança de 3 e então estabelecidos pela EPA como Ct de 4, 6 e 8 para inativação de $2\log_{10}$, $3\log_{10}$ e $4\log_{10}$. A extrapolação também se deu quanto à temperatura, visto que esses valores de Ct estão descritos para 5°C. Deste modo, a cada aumento de 10°C, se considera a diminuição pela metade do valor do Ct (exemplo 15°C: Ct de 2, 3 e 4 para inativação de $2\log_{10}$, $3\log_{10}$ e $4\log_{10}$; e 20°C: Ct de 1, 2 e 3 para inativação de $2\log_{10}$, $3\log_{10}$ e $4\log_{10}$).

Conforme previamente descrito na literatura, o adenovírus humano é rapidamente inativado por cloro livre. Apesar de ser difícil realizar uma comparação direta de valores de Ct devido às variações das condições experimentais, principalmente à técnica utilizada para purificação viral (KAHLER *et al.*, 2010), Thurston-Enriquez e colaboradores (2003) descreveram Ct para inativação de Adenovírus 40 (HAdV40) em tampão BDF no pH 6,0, de 0,22 ($4\log_{10}$), no pH 7,0, de 0,75 ($4\log_{10}$) e no pH 8,0, de 0,24 ($4\log_{10}$). Em 2010, Kahler e colaboradores avaliaram a desinfecção de HAdV2 e observaram valores de Ct para inativação de $3\log_{10}$ de 0,051, <0,04 e 0,063 para diferentes matrizes ambientais, com pH 7,0 a 15°C. No mesmo ano, Cromeans e colaboradores avaliaram a desinfecção de HAdV2, HAdV40 e HAdV41 em tampão semelhante ao BDF e observaram valores de Ct para inativação de $4\log_{10}$ de 0,15 e <0,04 em pH 7,0 (CROMEANS; KAHLER; HILL, 2010). Estes valores se assemelham aos observados no presente trabalho, com exceção do tampão BDF pH 8,0, reportado na literatura com Ct de 0,24 (THURSTON-ENRIQUEZ *et al.*, 2003) para inativar $4\log_{10}$, em contraste com 1,249 e 2,497 (0,5 mg/L e 0,2 mg/L de cloro livre, respectivamente) observado. No entanto, esses valores de Ct descritos por Thurston-Enriquez *et al.* (2003) foram calculados pelo

modelo, já que o Ct observado em experimento foi de 36 pra redução de $4\log_{10}$. Em conjunto, esses dados indicam a alta suscetibilidade do adenovírus humano ao tratamento de desinfecção por cloro livre.

Considerando que este trabalho foi realizado com o rAdV e os valores de Ct reportados na literatura são comparáveis, comprova-se mais uma vez a aplicabilidade do rAdV como modelo para estudos de desinfecção em amostras de água superficiais utilizando como desinfetante o cloro.

Ao comparar os valores de Ct recomendados pelo manual da EPA (USEPA, 1991) com os observados e preditos pela modelagem neste trabalho, podemos perceber que os valores são inferiores aos recomendados, em todas as condições experimentais, fornecendo desta forma uma margem de segurança ao tratamento de água por cloro livre no que se refere aos adenovírus humanos.

A equação de Chick-Watson foi escolhida para modelagem da cinética de desinfecção visto que se enquadra melhor em condições que utilizam reatores do tipo batelada ou pistão ideal, que tem a dispersão longitudinal igual à zero (DANIEL, 2001; TEIXEIRA; FONSECA, 2003). Como os experimentos realizados foram em 10 ou 40 mL, se desconsidera a dispersão longitudinal. Este modelo considera que a concentração do desinfetante está relacionada com a sobrevivência dos microrganismos: quanto maior o tempo de contato com o desinfetante, maior é o número de microrganismos inativados (CAMARGO, 2004). Da mesma forma, é possível interpretar a importância do tempo de contato e da concentração do desinfetante em um determinado processo da desinfecção utilizando o modelo de Chick-Watson (TEIXEIRA; FONSECA, 2003).

Quanto ao ajuste da inativação observada e a inativação modelada, o valor mínimo de R^2 foi de 0,7348 e máximo de 0,9719 para Tampão BDF pH 6.9 0,2 mg/L e Tampão BDF pH 8.0 0,5 mg/L de cloro livre, respectivamente, demonstrando que o modelo se ajusta bem às condições experimentais realizadas e observadas.

Os valores de k (taxa constante de inativação) calculados pelo modelo de Chick-Watson estão de acordo com o observado: a inativação foi mais rápida na amostra de água da ETA Morro dos Quadros, seguida da ETA Lagoa do Peri/Tampão BDF pH 6.9 e por último o Tampão BDF pH 8.0 (tabela 9 e figuras 14 a 17), já que quanto maior o valor de k , maior a taxa de inativação.

Em relação ao k' , altos valores indicam que a concentração de cloro livre decaí significativamente durante o experimento, enquanto baixos valores de k' indicam que ocorreu um decaimento mínimo

durante a realização do experimento (THURSTON-ENRIQUEZ *et al.*, 2003), e podem ser observados na tabela 9, assim como na figura 11. Assume-se que a taxa de decaimento de cloro diminua em função do desinfetante e da característica da água e que seja independente dos microorganismos presentes (GYUREK; FINCH, 1998).

As constantes do modelo de Chick-Watson aqui descritos (k , k') foram determinadas através da realização de experimentos de bancada e estas constantes são consideradas características para a cinética de inativação do vírus em questão – rAdV, pela condição de pH e temperatura específicos e para as matrizes ambientais utilizadas. Desta forma, essas constantes podem ser utilizadas para calcular valores de Ct em outras concentrações de cloro, sem a necessidade de realizar os experimentos em bancada.

7. SUMÁRIO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

Os principais resultados obtidos durante a realização deste estudo podem ser aqui sumarizados:

- O rAdV se mostrou adequado para realização dos experimentos de desinfecção viral por cloro livre, o que permitiu o desenvolvimento de técnicas de viabilidade viral econômicas, práticas e rápidas.
- As técnicas padronizadas de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência foram adequadas para avaliar a viabilidade de rAdV, e foi escolhida a técnica de microscopia de fluorescência por apresentar limite de detecção apropriado para observar redução de $4\log_{10}$.
- O ensaio de qPCR mostrou-se rápido e específico para detecção e quantificação de genomas do rAdV, apesar de não ser capaz de fornecer informação à respeito da inativação viral.
- As matrizes ambientais utilizadas não interferiram e/ou alteraram os resultados obtidos.
- A etapa de purificação viral realizada foi eficiente e permitiu a realização de experimentos utilizando cloro livre.
- A temperatura (15°C e 20°C) e os valores de turbidez não influenciaram na desinfecção viral por cloro livre, ao contrário do pH (6,5, 6,9 e 8,0), que exerceu grande influência na eficiência de desinfecção.
- Em conjunto com a agregação viral, com o consumo de HOCl pelas proteínas virais e a reação com NH_3 (formação de dicloraminas e tricloraminas), pode-se observar a formação de curva bifásica, onde a taxa de desinfecção é menor característico da fase de cauda para as amostras ETA Morro dos Quadros e ETA Lagoa do Peri, assim como para o Tampão BDF pH 6.9.
- Em relação ao tampão BDF pH 8,0, a desinfecção ocorreu mais lentamente devido principalmente à concentração de ácido

hipocloroso (HOCl) estar em torno de 25%, à reação da amônia (NH_3) com HOCl, formando as monocloraminas (NH_2Cl), que são menos eficientes e ainda reduzem a disponibilidade de HOCl para a desinfecção e o posterior consumo de NH_2Cl pelo nitrito (NO_2^-).

- A não detecção de HAdV viáveis na saída das ETAs e a detecção na rede de distribuição da ETA Morro dos Quadros - torneira da UFSC ($2,75 \cdot 10^3$ UFP/L), sugere que há infiltração nas redes de distribuição de água e que concentrações de cloro residual podem não ser suficientes para inativar vírus que foram introduzidos após o processo de tratamento de água.
- Quanto à modelagem, os valores de Ct para inativação de $4\log_{10}$ foi menor que 0,25 para todas as condições experimentais, com exceção do Tampão BDF pH 8,0, com Ct de 1,249 e 2,497.
- Os valores de Ct reportados na literatura são comparáveis aos observados neste trabalho. Entretanto, quanto aos Cts recomendados pela EPA os valores são inferiores aos recomendados, fornecendo desta forma uma margem de segurança ao tratamento de água por cloro livre no que se refere aos adenovírus humanos.
- O modelo demonstrou ter se ajustado bem às condições experimentais realizadas e observadas, e os valores de k (taxa constante de inativação) calculados pelo modelo de Chick-Watson também estão de acordo com o observado.

8. CONCLUSÃO GERAL

As concentrações de cloro (0,2 mg/L e 0,5 mg/L) aplicadas à águas superficiais filtradas foram eficientes na inativação do adenovírus recombinante, que demonstrou ser altamente suscetível ao cloro nas condições analisadas e o fator que mais influenciou a desinfecção foi o pH. O rAdV mostrou ser um modelo adequado para esta avaliação, sendo comparável ao descrito na literatura em relação ao adenovírus humano não-recombinante.

9. REFERÊNCIAS

ABES – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL – SEÇÃO SÃO PAULO. **Subsídios para legislação nacional de água para consumo humano**. Ano I, v.1, n.1, 2010.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Portaria Nº 518/GM de 25 de março de 2004**. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>>. Acesso em: 22 de Novembro de 2013.

AWWA - AMERICAN WATER WORK ASSOCIATION. **Water Chlorination/Chloramination Practices and Principles**. Manual of Water Supply Practices – M20, 2 ed. Denver, 2006.

BAYLIS, J. R. Elimination of Taste and Odor in Water. McGraw-Hill, New York, 1935. In: AWWA - AMERICAN WATER WORK ASSOCIATION. **Water Chlorination/Chloramination Practices and Principles**. Manual of Water Supply Practices – M20, 2 ed. Denver, 2006.

BOIS, F.Y., FAHMY, T., BLOCK, J.C., GATEL, D. Dynamic modeling of bacteria in a pilot drinking-water distribution system. **Water Research**, v.31, n.12, p.3146-3156, 1997.

BOSCH, A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. **International Microbiology**, v.1, p.191–196, 1998.

BOSCH, A. **Human Viruses in Water: Perspectives in Medical Virology**. Amsterdam: Elsevier, 2007.

BOSCH, A.; GUIX, S.; SANO, D.; PINTO, R. M. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. **Current Opinion in Biotechnology**, v.19, n.3, p.295-301. 2008.

CALGUA, B., MENGEWEIN, A., GRÜNERT, A., BOFILL-MAR, S., CLEMENTE-CASARES, P., HUNDESA, A., WYN-JONES, A. P., LÓPEZ-PILA, J. M., GIRONES, R. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. **Journal of Virological Methods**, v.153, n.2, p.79-83, 2008.

CALGUA, B., FUMIAN, T., RUSIÑOL, M., RODRIGUEZ-MANZANO, J., MBAYED, V. A., BOFILL-MAS, S., MIAGOSTOVICH, M., GIRONES, R. Detection and quantification of classic and emerging viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas. **Water Research**, v.47, p.2797-2810, 2013.

CAMARGO, J.G. **Aplicação do dióxido de cloro na desinfecção de efluentes domésticos tratados pelo sistema de lodos ativados**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 95p., 2004.

CARTER, M.J. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. **Journal of Applied Microbiology**, v.6, p.1354–1380, 2005.

CASAN – COMPANHIA CATARINENSE DE ÁGUAS E SANEAMENTO. **Manual de Operação e Manutenção Sistemas de Abastecimento de Água da Costa Sul/Leste**, 2011.

CASAN – COMPANHIA CATARINENSE DE ÁGUAS E SANEAMENTO. **Manual de Operação e Manutenção ETA Morro dos Quadros**, 2012.

CHEREMISINOFF, N.P. **Handbook of Water and Wastewater Treatment Technologies**. Butterworth Heinemann, Woburn, MA, USA, 2002.

CONNELL, G. F. The Chlorination/Chloramination Handbook. American Water Work Association, 1996. In: AWWA - AMERICAN WATER WORK ASSOCIATION. **Water Chlorination/Chloramination Practices and Principles**. Manual of Water Supply Practices – M20, 2nd ed. Denver, 2006.

CONTRERAS-COLL, N., LUCENA, F., MOOIJMAN, K., HAVELAAR, A., PIERZ, V., BOQUE, M., GAWLER, A., HOLLER, C., LAMBIRI, M., MIROLO, G., MORENO, B., NIEMI, M., SOMMER, R., VALENTIN, B., WIEDENMANN, A., YOUNG, V., JOFRE, J. Occurrence and levels of indicator bacteriophages in bathing

waters throughout Europe. **Water Research**, v.36, n.20, p.4963-4974, 2002.

CORRÊA, A. A., CARRATALA, A., BARARDI, C. R. M., CALVO, M., GIRONES, R., BOFILL-MAS, S. Comparative Inactivation of Murine Norovirus, Human Adenovirus, and Human JC Polyomavirus by Chlorine in Seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.18, p. 6450–6457, 2012.

CROMEANS, T.L., KAHLER, A.M., HILL, V.R. Inactivation of adenoviruses, enteroviruses, and murine norovirus in water by free chlorine and monochloramine. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.4, p.1028-33, 2010.

CROMEANS, T.L., LU, X., ERDMAN, D.D., HUMPHREY, C.D., HILL, V.R. Development of a plaque assay for adenoviruses 40 and 41. **Journal of Virological Methods**, v.151, p.140-145, 2008.

DAN, L.I., MIAO, H.E., SUNNY, C., JIANG, D. Detection of Infectious Adenoviruses in Environmental Waters by Fluorescence-Activated Cell Sorting Assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.5, p.1442-1448, 2010.

DANIEL, L.A. **Rede cooperativa de pesquisas: Métodos alternativos de desinfecção da água**. São Carlos, São Paulo, 1 ed., 2001.

DEGRÉMONT. Water Treatment Handbook. New York: John Wiley & Sons, 1979. In: AWWA - AMERICAN WATER WORK ASSOCIATION. **Water Chlorination/Chloramination Practices and Principles**. Manual of Water Supply Practices – M20, 2 ed. Denver, 2006.

DOOLITTLE, M.M., COONEY, J.J., CALDWELL, D.E. Tracing the interaction of bacteriophage with bacterial biofilms using fluorescent and chromogenic probes. **Journal of Industrial Microbiology**, v.16, p.331–41, 1996.

ENRIQUEZ, C.E., HURST, C.J., GERBA, C.P. Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea and wastewater. **Water Research**, v.29, p.2548-2553, 1995.

FARTHING, M. J. G. Viruses and the gut. Smith Kline & French, Walwyn Garden City, Hertfordshire, United Kingdom, 1989. In: FONG, T.T., LIPP, E.K. Enteric viruses of human and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, p. 357-371, 2005.

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

FONGARO, G., NASCIMENTO, M. A., VIANCELLI, A., TONETTA, D., PETRUCIO, M. M., BARARDI, C. R. M. Surveillance of human viral contamination and physicochemical profiles in a surface water lagoon. **Water Science & Technology**, p.2682- 2687, 2012.

FONTES, M.L.S., TONETTA, D., DALPAZ, L., ANTÔNIO, R.V., PETRUCIO, M.M. Dynamics of planktonic prokaryotes and dissolved carbon in a subtropical coastal lake. **Frontiers in Microbiology**, v.4, 2013.

FRANCY, D.S., STELZER, E.A., BUSHON, R.N., BRADY, A.M.G., WILLISTON, A.G., RIDDELL, K.R., BORCHARDT, M.A., SPENCER, S.K., GELLNER, T.M. Comparative effectiveness of membrane bioreactors, conventional secondary treatment, and chlorine and UV disinfection to remove microorganisms from municipal wastewaters. **Water Research**, v.46, p.4164-4178, 2012.

FUJIOKA, R.S., YONEYAMA, B.S. Sunlight inactivation of human enteric viruses and fecal bacteria. **Water Science and Technology**, v.46, n.11-12, p.291-295, 2002.

GANTZER, C., DUBOIS, I., CRANCE, J.M., BILLAUDEL, S., KOPECKA, H., SCHWARTZBROD, L., POMMEPUY, M., LE GUYADER, F. Devenir des virus entériques en mer et influence des facteurs environnementaux. **Oceanologica**, v.21, n.6, p.983-992, 1998.

GARCIA, L.A., VIANCELLI, A., RIGOTTO, C., PILOTTO, M.R., ESTEVES, P.A., KUNZ, A., BARARDI, C.R. Surveillance of human and swine adenovirus, human norovirus and swine circovirus in

water samples in Santa Catarina, Brazil. **Journal Water and Health**, v. 10 (n°3), p.445-52, 2012.

GIRONES, R., FERRÚS, M. A., ALONSO, J. L., RODRIGUEZ-MANZANO, J., CALGUA, B., CORRÊA, A. A., HUNDESA, A., CARRATALA, A., BOFILL-MAS, S. Molecular detection of pathogens in water - The pros and cons of molecular techniques. **Water Research**, v.44, p.4325-4339, 2010.

GOLTERMAN, H.L., CLYMO, R.S., OHNSTAD, M.A.M. Methods for physical and chemical analysis of freshwater. **Oxford: Blackwell Science Publisher**, 1978.

GRAHAM, F.L., SMILEY, J., RUSSELL, W.C., NAIRN, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **Journal of General Virology**, v.36: p.59-74, 1977.

GREEN, M., DAESCH, G.E. Biochemical studies on adenovirus multiplication. II. Kinetics of nucleic acid and protein synthesis in suspension cultures. **Virology**, v.13, p.169-176, 1961.

GYUREK, L. L., FINCH, G. R. Modeling water treatment chemical disinfection kinetics. **Journal of Environmental Engineering (ASCE)**, v.124, p.783–793, 1998.

HAAS, C. N., ROSE, J. B., GERBA, C. P., REGLI, R. Risk assessment of viruses in drinking water. **Risk Analysis**, v.13, p.545–552, 1993.

HARLEY, D., HARROWER, B., LYON, M., DICK, A. A primary school outbreak of pharyngoconjunctival fever caused by adenovirus type 3. **Communicable Diseases Intelligence**, v.25, n.1, p.9 – 12, 2001.

HAWKINS, C.L., DAVIES, M.J. Inactivation of protease inhibitors and lysozyme by hypochlorous acid: role of sidechain oxidation and protein unfolding in loss of biological function. **Chemical Research in Toxicology**, v.8, p.1600–1610, 2005.

HELMI, K., SKRABER, S., GANTZER, C., WILLAME, R., HOFFMANN, L., CAUCHIE, H.M. Interactions of *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, Vaccinal Poliovirus Type 1, and Bacteriophages ϕ 174 and MS2 with a Drinking Water Biofilm and a

Wastewater Biofilm. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.7, p.2079–2088, 2008.

HERNROTH, B.E., CONDEN-HANSSON, A.C., REHNSTAM-HOLM, A.S., GIRONES, R., ALLARD, A.K. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.9, p.4523-4533, 2002.

HIJNEN, W.A., BEERENDONK, E.F., MEDEMA, G.J. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. **Water Research**, v.40, n.1, p.3–22, 2006.

HORMAN, A., RIMHANEN-FINNE, R., MAUNULA, L., von BONSDORFF, C. H., TORVELA, N., HEIKINHEIMO, A., HANNINEN, M. L. *Campylobacter* spp., *Girardia* spp., *Cryptosporidium* spp., Noroviruses and indicator organisms in surface water in southwestern Finland, 2000-2001. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.87-95, 2004.

HUNDESA, A., MALUQUER DE MOTES, C., BOFILL-MAS, S., ALBINANA-GIMENEZ, N., GIRONES, R. Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.7886 – 7893, 2006.

HUSMAN, A.M.R., LODDER, W.J., RUTJES, S.A., SCHIJVEN, J.F., TEUNIS, P.F. Long-term inactivation study of three enteroviruses in artificial surface and groundwaters using PCR and cell culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.4, p.1050-1057, 2009.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Atlas do Saneamento**, 2011. Rio de Janeiro, 2011.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável: Brasil 2010**. Rio de Janeiro, 2010.

JIANG, S., NOBLE, R., CHUI, W.P. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern

California. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.179–184, 2001.

KAHLER, A. M., CROMEANS, T. L., ROBERTS, J. M., HILL, V. R. Effects of Source Water Quality on Chlorine Inactivation of Adenovirus, Coxsackievirus, Echovirus, and Murine Norovirus. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.15, p.5159–5164, 2010.

KEEVIL, C. W. Rapid detection of biofilms and adherent pathogens using scanning confocal laser microscopy and episcopic differential interference contrast microscopy. **Water Science and Technology**, v.47, n.5, p.105-116, 2003.

KING, A. M. Q., ADAMS, M. J., CARSTENS, E. B., LEFKOWITZ, E. J., KING, A., LEFKOWITZ, E., ADAMS, M., CARSTENS. E. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, Academic Press, San Diego, p.125-141, 2011.

KOCWA-HALUCH, R. Waterborne enteroviruses as a hazard for human health. **Polish Journal of Environmental Studies**, v.10, p.484-487, 2001.

KOROLEFF, F. Determination of nutrients. In: GRASSHOFF, K. **Methods of Sea Water Analysis**. Weinhein: Verlag. Chemie, p.117–181, 1976.

KRASNER, S.W., WEINBERG, H.S., RICHARDSON, S.D., PASTOR, S.J., CHINN, R., SCLIMENTI, M.J., ONSTAD, G.D., THRUSTON, A.D. Occurrence of a new generation of disinfection byproducts. **Environmental Science and Technology**, v.40, n.23, p.7175-7185, 2006.

LAUBUSCH, E. J. Chlorination and Other Disinfection Processes. Chlorine Institute, 1964. In: AWWA - AMERICAN WATER WORK ASSOCIATION. **Water Chlorination/Chloramination Practices and Principles**. Manual of Water Supply Practices – M20, 2 ed. Denver, 2006.

LAVERICK, M.A., WYN-JONES, A.P., CARTER, M.J. Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in

water and sewage. **Letters in Applied Microbiology**, v.39, p.127 – 136, 2004.

LEE, C., LEE, S.H., HAN, E., KIM, S.J. Use of cell culture-PCR assay based on combination of A549 and BGMK cell lines and molecular identification as a tool to monitor infectious adenoviruses and enteroviruses in river water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.6695 - 6705. 2004.

LEVY, R. V., CHEETHAM, R. D., DAVIS, J., WINER, G., HART, F. L. Novel method for studying the public health significance of macroinvertebrates occurring in potable water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.47, p.889-894, 1984.

LI, D., GU, A. Z., ZENG, S., YANG, W., HE, M., SHI, H. Evaluation of the infectivity, gene and antigenicity persistence of rotaviruses by free chlorine disinfection. **Journal of Environmental Sciences**, v.23, n.10, p.1691–1698, 2011.

LI, D., HE, M., JIANG, S.C. Detection of infectious adenoviruses in environmental waters by fluorescence-activated cell sorting assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.1442-1448, 2010.

LIPP, K.E., FARRAH, S.A., ROSE, J.B. Assessment and Impact of Microbial Fecal Pollution and Human Enteric Pathogens in a Coastal Community. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, n.4, p.286-293, 2001.

LINDESMITH, L., MOE, C., MARIONNEAU, S., RUVOEN, N., JIANG, X., LINDBLAD, L., STEWART, P., LEPENDU, J., BARIC, R. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. **Nature Medicine**, v.9, p.548–553, 2003.

MACKERETH, F.J.H., HERON, J., TALLING, J.F. Water Analysis: some revised methods for limnologists. **Freshwater Biological Association, Scientific Publication**, p.36, 1978.

MCCONNELL, M.J., IMPERIALE, M.J. Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. **Human Gene Therapy**, v.15, p.1022-1033, 2004.

MELNICK, J. L., GERBA, C. P. The ecology of enteroviruses in natural waters. **Critical Reviews in Environmental Control**, v.10, p.65-93, 1989.

MESCHKE, J. S., SOBSEY, M. D. Comparative adsorption of Norwalk virus, poliovirus 1 and F+ RNA coliphage MS2 to soils suspended in treated wastewater. **Water Science and Technology**, v.38, p.187-189, 1998.

MEYER, S. T. Chlorine Use in Water Disinfection, Trihalomethane Formation, and Potential Risks to Public Health. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.10, n.1, p.99-110, 1994.

MIAGOSTOVICH, M.P., FERREIRA, F.F.M., GUIMARÃES, F.R., FUMIAN, T.M., DINIZ-MENDES, L., LUZ, S.L.B., SILVA, L.A., LEITE, J.P.G. Molecular Detection and Characterization of Gastroenteritis Viruses Occurring Naturally in the Stream Waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.375-382, 2008.

MILLER, A.D. Human gene therapy comes of age. **Nature**, v.357, p.455-460, 1992.

MORESCO, V., VIANCELLI, A., NASCIMENTO, M. A., SOUZA, D. M. S., RAMOS, A. P. D., GARCIA, L. A. T., SIMÕES, C. M. O., BARARDI, C. R. M. Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, p. 40-48, 2012.

MWH - MONTGOMERY WATSON HARSA. **Water Treatment: Principles and Design**. John Wiley & Sons. Hoboken, New Jersey, 2 ed., p.1968, 2005.

NADEAU, I., KAMEN, A. Production of adenovirus vector for gene therapy. **Biotechnology Advances**, v.20, p.475-489, 2003.

NEMEROW, G.R., PACHE, L., REDD, Y. V., STEWART, P.L. Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. **Virology**, v. 20, n.2, p.380-388, 2008.

NEVINS, J.R. Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product. **Cell**, v.26, p.213-220, 1981.

NUANUALSUWAN, S., CLIVER, D. O. Capsid Functions of Inactivated Human Picornaviruses and Feline Calicivirus. **Applied and Environmental Microbiology**, p.350–357, v.69, n.1, 2003.

PAGE, M. A., SHISLER, J. L., MARINÑAS, B. J. Mechanistic Aspects of Adenovirus Serotype 2 Inactivation with Free Chlorine. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2946–2954, v.76, n.9, 2010.

PAGE, M.A., SHISLER, J.L., MARIÑAS, B.J. Kinetics of adenovirus type 2 inactivation with free chlorine. **Water Research**, v.43, p.2916-2926, 2009.

PAPAPETROPOULOU, M., VANTARAKIS, A.C. Detection of adenovirus outbreak at a municipal swimming pool by nested PCR amplification. **Journal of Infection**, v.36, p.101 – 103, 1995.

PATTISON, D.I., DAVIES, M.J. Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds. **Chemical Research in Toxicology**, v.14, n.10, p.1453–1464, 2001.

PATTISON, D.I., HAWKINS, C.L., DAVIES, M.J. Hypochlorous acid-mediated protein oxidation: how important are chloramine transfer reactions and protein tertiary structure? **Biochemistry**, v.46, p.9853–9864, 2007.

PINA, S., PUIG, N., LUCENA, F., JOFRE, J., GIRONES, R. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.3376-3382, 1998.

PMISB - PLANO MUNICIPAL INTEGRADO DE SANEAMENTO BÁSICO. **Produto 11: Versão Consolidada final**. No RL-0309-800-942-MPB-011 . fev. 2011.

PRÜTZ, W.A. Hypochlorous Acid Interactions with Thiols, Nucleotides, DNA, and Other Biological Substrates. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.332,n.1, p.110–120, 1996.

PRÜTZ, W.A. Reactions of Hypochlorous Acid with Biological Substrates Are Activated Catalytically by Tertiary Amines. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.357,n.2, p.265-273,1998.

QUIGNON, F., KIENE, L., LEVI, Y., SARDIN, M., SCHWARTZBROD, L. Virus behavior within a distribution system. **Water Science and Technology**, v.35, p.311–18, 1997a.

QUIGNON, F., SARDIN, M., KIENE, L., SCHWARTZBROD, L. Poliovirus-1 inactivation and interaction with biofilm: a pilot-scale study. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.978–82, 1997b.

RICHARDSON, S. D., TERNES, T. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. **Analytical Chemistry**, v. 77, n.12, p.3807-3838, 2005.

RIGOTTO, C., HANLEY, K., ROCHELLE, P.A., DE LEON, R., BARARDI, C.R.M., YATES M.V. Survival of Adenovirus Types 2 and 41 in Surface and Ground Waters Measured by a Plaque Assay. **Environmental Science and Technology**, v.45, p.4145 – 4150, 2011.

RIGOTTO, C., VICTORIA, M., MORESCO, V., KOLESNIKOVAS, C.K.M., CORREA, A.A., SOUZA, D.S.M., MIAGOSTOVICH, M., SIMÕES, C.M.; BARARDI, C.R. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianópolis, South Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.109, p.1979-1987, 2010.

RODRÍGUEZ, R.A., PEPPER, I.L., GERBA, C.P. Application of PCR-based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.297–307, 2009.

SHIN, G.A., SOBSEY, M.D. Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. **Water Research**, v.42, n.17, p.4562-4568, 2008.

SILVERMAN, G.S., NAGY, L.A., OLSON, B.H. Variations in particulate matter, algae, and bacteria in an uncovered, finished drinking

water reservoir. **Journal of the American Water Works Association**, v.75, p.191-195, 1983.

SINCLAIR, R.G., JONES, E.L., GERBA, C.P. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, p.1769–1780, 2009.

SOBSEY, M. D., FUJI, T., HALL, R. M. Inactivation of cell-associated and dispersed hepatitis A virus in water. **Journal of American Water Works Association**, v.83, p.64–67, 1991.

SOBSEY, M. Detection and Chlorine Disinfection of Hepatitis A in Water. CR-813-024. EPA Quarterly Report. 1988. In: USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Guidance manual for compliance with the filtration and disinfection requirements for public water systems using surface water sources**. Washington, DC, 1991.

STEWART, P.S., RAYNER, J., ROE, F., REES, W.M. Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.525-532, 2001.

SZEWZYK, U., SZEWZYK, R., MANZ, W., SCHLEIFER, K.H. Microbiological safety of drinking water. **Annual Review of Microbiology**, v.54, p.81–127, 2000.

TEIXEIRA, C.E., FONSECA, I.R. **Desempenho dos modelos cinéticos de previsão em função da eficiência de desinfecção medida em unidades de fluxo contínuo**, 2003.

THURMAN, R. B., C. P. GERBA. Molecular mechanisms of viral inactivation by water disinfectants. **Advances in Applied Microbiology**, v.33, p.75–105, 1988.

THURSTON-ENRIQUEZ, J. A., HAAS, C. N., JACANGELO, J., GERBA, C. P. Chlorine Inactivation of Adenovirus Type 40 and Feline Calicivirus. **Applied and Environmental Microbiology**, p.3979–3985, v.69, n.7, 2003.

URAKAMI, H., IKARASHI, K., OKAMOTO, K., ABE, Y., IKARASHI, T., KONO, T., KONAGAYA, Y., TANAKA, N. Chlorine sensitivity of feline calicivirus, a norovirus surrogate. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.17, p.5679-5682, 2007.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Comprehensive Disinfectants and Disinfection Byproducts Rules (Stage 1 and Stage 2): Quick Reference Guide**. 2010.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Conductivity: What is conductivity and why is it important?**, 2012. Disponível em: <<http://water.epa.gov/type/rsl/monitoring/vms59.cfm>>. Acesso em: 16 de Dezembro de 2013.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Contaminant Candidate List 3 2009 – CCL**. Disponível em: <<http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/dws/ccl/ccl3.cfm#microbial>>. Acesso em: 31 de julho de 2013.

USEPA- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Drinking Water Criteria Document for Chloramines**. Health and Ecological Criteria Division Office of Science and Technology Office of Water, 1994.

USEPA- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Drinking Water Treatment**. EPA 816-F-04-034. 2004. Disponível em: <http://water.epa.gov/lawsregs/guidance/sdwa/upload/2009_08_28_sdwa_fs_30ann_treatment_web.pdf> Acesso em: 17 de Dezembro de 2013.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Guidance manual for compliance with the filtration and disinfection requirements for public water systems using surface water sources**. Washington, DC, 1991.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Manual on guidelines for water reuse**. Center for Environmental Reservation Information, Cincinnati, Ohio, 1992.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes**. Cincinnati, Ohio, 1983.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Removing trihalomethanes from drinking water - an overview of treatment techniques**, 2002. Disponível em: <http://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_Report.cfm?dirEntryID=29716>. Acesso em: 15 de Novembro de 2013.

VAN-HEERDEN, J., EHLERS, M.M., HEIN, A., GRABOW, W.O.K. Prevalence, quantification and typing of adenoviruses detected in river and treated drinking water in South Africa. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p.234-242, 2005.

VERHEYEN, J., TIMMEN-WEGO, M., LAUDIEN, R., BOUSSAAD, I., SEN, S., KOC, A., UESBECK, A., MAZOU, F., PFISTER, H. Detection of Adenoviruses and Rotaviruses in Drinking Water Sources Used In Rural Areas of Benin, West Africa. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.2798–2801, 2009.

WAHMAN, D.G., SPEITEL, G.E.J. Relative Importance of Nitrite Oxidation by Hypochlorous Acid under Chloramination Conditions. **Environmental Science and Technology**, v.46, p.6056–6064, 2012.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Nitrate and Nitrite in Drinking Water**: Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality, 2011.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION; UN - UNITED NATIONS. **Glaas 2012 report - Water global annual assessment of sanitation and drinking-water**: the challenge of extending and sustaining services, 2012.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION; UNICEF - UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND. **Progress on sanitation and Drinking-water** 2013 Update, 2013.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION; UNICEF - UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND. **Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done**, 2009.

WINTER, J., ILBERT, M., GRAF, P.C.F., OZCELICK, D., JAKOB, U. Bleach activates a redox-regulated chaperone by oxidative protein unfolding. **Cell**, v.135, p.691–701, 2008.

WOLD, W.S.M., HORWITZ, M.S. Adenoviruses. In: KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.2395–2436, 2007.

WONG, M., KUMAR, L., JENKINS, T. M., XAGORARAKI, I., PHANIKUMAR, M. S., ROSE, J. B. Evaluation of public health risks at recreational beaches in Lake Michigan via detection of enteric viruses and a human-specific bacteriological marker. **Water Research**, v.43, p.1137 – 1149, 2009.

WYER, M. D., WYN-JONES, A. P., KAY, D., AU-YEUNG, H. K. C., GIRONÉS, R., LÓPEZ-PILA, J., HUSMAN, A. M. R., RUTJES, S., SCHNEIDER, O. Relationships between human adenoviruses and faecal indicator organisms in European recreational waters. **Water Research**, v.46, p.4130 – 4141, 2012.

WYN-JONES, A. P., CARDUCCI, A., COOK, N., D'AGOSTINO, M., DIVIZIA, M., FLEISCHER, J., GANTZER, C., GAWLER, A., GIRONES, R., HOLLER, C., HUSMAN, A. M. R., KAY, D., KOZYRA, I., LÓPEZ-PILA, J., MUSCILLO, M., NASCIMENTO, M. S. J., PAPAGEORGIOU, G., RUTJES, S., SELLWOOD, J., SZEWZYK, R., WYER, M. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. **Water Research**, v.45, p.1025-1038, 2011.

WINTER, J., ILBERT, M., GRAF, P.C.F., OZCELICK, D., JAKOB, U. Bleach activates a redox-regulated chaperone by oxidative protein unfolding. **Cell**, v.135, p.691–701, 2008.

YSI ENVIRONMENTAL. **Environmental Dissolved Oxygen Values Above 100% Air Saturation**, 2005.

10. APÊNDICES

As seguintes publicações como co-autoria foram realizadas no período do mestrado (2012-2014) e estão aqui destacadas:



*International Journal of Environmental Science and
Engineering Research (IJESER)*

www.journal-ijeser.com
ISSN: 0976-3708 (print)
IJESER Vol 3(3):62-79, 2012

Monitoring viruses in environmental samples

C.R.M. Barardi^{1*}, A. Viancelli², C. Rigotto³, A.A. Corrêa⁴,
V. Moresco¹, D.S.M. Souza¹, M. E. L. ElMahdy¹,
G. Fongaro¹, M.R. Pilotto¹, M. A. Nascimento¹

¹Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade 88040-900, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

²Embrapa Suínos e Aves, 89700-000 Concórdia, Santa Catarina, Brasil

³Laboratório de Microbiologia Molecular Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental Universidade Feevale, Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, Brasil

⁴Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, 24210-001, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil

ABSTRACT

Environmental virology is a field that has grown in the last 50 years. Because viruses can be transmitted by contaminated water, this work is of special concern for human and animal health. Enteric viruses, mainly consisting of adenovirus, polyomavirus, norovirus, hepatitis A and E, rotavirus A and C, and porcine circovirus, can be found in environments contaminated with human and animal feces. Despite the importance of this issue to health and the recommendations of various studies to use viruses as environmental contamination markers, viruses are not routinely monitored in drinking water. This review aims to contribute to the case for the inclusion of viral surveillance in tests of water and food quality. We have gathered information about important food- and waterborne viruses implicated in outbreaks, the main methods available to concentrate and detect these viruses from different environmental matrices, and also the current status of legislation in Europe, the United States and Brazil.

Key words: *Environmental samples, enteric viruses, concentration methods, detection methods, legislation*



Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil

V. Moresco, A. Viancelli, M.A. Nascimento, D.S.M. Souza, A.P.D. Ramos, L.A.T. Garcia, C.M.O. Simões, C.R.M. Barardi*

Laboratório de Virologia Aplicada, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina State, CEP 88040-900, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Seawater
Viral contamination
Fecal coliforms
Molecular techniques

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the impact of sewage discharge on coastal waters by evaluating the influence of physicochemical parameters on the presence of enteric microorganisms in seawater samples collected from 11 beaches in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil, over a one-year period (August 2009 to July 2010). Samples were assessed for the presence of human adenoviruses (HAdV), polyomavirus (JCPyV), hepatitis A virus (HAV), and noroviruses (HuNoV GI and GII). *Escherichia coli* and physicochemical parameters (salinity, temperature, pH and dissolved oxygen) were also evaluated. From the 132 samples analyzed, 55% were positive for HAdV, 51.5% for HAV, 7.5% for HuNoV GI, 4.5% for HuNoV GII, and 3% for JCPyV. *E. coli* levels ranged from 8 to 1325 CRU/100 mL at all sites. The overall results highlight the problem of sewage discharge into coastal waters and confirm that there is no correlation between viral presence and bacterial contamination.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Surveillance of human viral contamination and physicochemical profiles in a surface water lagoon

G. Fongaro, M. A Nascimento, A. Viancelli, D. Tonetta, M. M. Petrucio and C. R. M. Barardi

ABSTRACT

The present study evaluated the contamination of a surface water lagoon (Peri Lagoon) in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil, by human adenovirus (HAdV), polyomavirus JC (JCPyV), hepatitis A virus (HAV) and rotavirus species A (RVA). Efforts were driven to determine the correlation between viral presence and the physicochemical parameters of the lagoon and measure the distribution of these viruses throughout the year (June 2010 to May 2011). A total of 48 samples were collected, concentrated and analyzed by qPCR (quantitative polymerase chain reaction). Approximately 96% of the samples were positive for HAdV (46/48), 65% were positive for RVA (31/48), 21% were positive for JCPyV (10/48) and 12% were positive for HAV (6/48). The presence of JCPyV was positively correlated with that of $\text{NO}_2\text{-N}$, and also there was a positive correlation between the presence of each one of the viruses (HAdV, HAV and RVA) in winter. Samples from water dedicated for human consumption and recreation tested positive for HAdV by qPCR. These samples were also subjected to viral integrity and viability assays: 83% (10/12) contained intact viral particles and 66% (8/12) contained infectious particles. Our results demonstrate the release of human waste into water sources, justifying the urgent need to add viral parameters to water quality surveillance.

G. Fongaro
M. A. Nascimento
A. Viancelli
C. R. M. Barardi (corresponding author)
Laboratório de Virologia Aplicada,
Departamento de Microbiologia,
Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal
de Santa Catarina,
88040-900 Florianópolis, Santa Catarina State,
Brazil
E-mail: celia.barardi@ufsc.br

D. Tonetta
M. M. Petrucio
Laboratório de Ecologia de Águas Continentais,
Departamento de Ecologia e Zoologia -
Universidade Federal de Santa Catarina,
88040-900, Florianópolis,
Brazil

RESEARCH

Open Access

Evaluation and molecular characterization of human adenovirus in drinking water supplies: viral integrity and viability assays

Gislaine Fongaro¹, Mariana A do Nascimento¹, Caroline Rigotto¹, Giseli Ritterbusch², Alessandra D' A da Silva³, Paulo A Esteves³ and Célia R M Barardi^{1*}

Abstract

Background: Human adenoviruses (HAdVs) are the second-leading cause of childhood gastroenteritis worldwide. This virus is commonly found in environmental waters and is very resistant to water disinfection and environmental stressors, especially UV light inactivation. Molecular techniques, such as PCR-based methods (Polymerase Chain Reaction), are commonly used to detect and identify viral contamination in water, although PCR alone does not allow the discrimination between infectious and non-infectious viral particles. A combination of cell culture and PCR has allowed detection of infectious viruses that grow slowly or fail to produce cytopathic effects (CPE) in cell culture. This study aimed to assess the integrity and viability of human adenovirus (HAdV) in environmental water and evaluate circulating strains by molecular characterization in three sites of the water supply in Florianópolis, Santa Catarina Island, Brazil: Peri Lagoon water, spring source water, and water from the public water supply system.

Methods: Water samples were collected, concentrated and HAdV quantified by real-time PCR. Viral integrity was evaluated by enzymatic assay (DNase I) and infectivity by plaque assay (PA) and integrated cell culture using transcribed mRNA (ICC-RT-qPCR). Samples containing particles of infectious HAdV were selected for sequencing and molecular characterization.

Results: The analyzed sites contained 83, 66 and 58% undamaged HAdV particles (defined as those in which the genetic material is protected by the viral capsid) at Peri Lagoon, spring source water and public supply system water, respectively. Of these, 66% of the particles (by PA) and 75% (by ICC-RT-qPCR) HAdV were shown to be infectious, due to being undamaged in Peri Lagoon, 33% (by PA) and 58% (by ICC-RT-qPCR) in spring source water and 8% (by PA) and 25% (by ICC-RT-qPCR) in the public water supply system. ICC-RT-qPCR, a very sensitive and rapid technique, was able to detect as low as 1×10^2 HAdV genome copies per milliliter of infectious viral particles in the environmental water samples. The molecular characterization studies indicated that HAdV-2 was the prevalent serotype.

Conclusions: These results indicate a lack of proper public health measures. We suggest that HAdV can be efficiently used as a marker of environmental and drinking water contamination and ICC-RT-qPCR demonstrated greater sensitivity and speed of detection of infectious viral particles compared to PA.

Keywords: HAdV, Water supply, Viral integrity and viability, ICC-RT-qPCR, Molecular characterization



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro



Virus, protozoa and organic compounds decay in deperured oysters



Doris Sobral Marques Souza ^{a,*}, Rômi Sharon Piazza ^{d,1}, Mariana Rangel Pilotto ^a,
Mariana de Almeida do Nascimento ^a, Vanessa Moresco ^a, Satie Taniguchi ^{b,2}, Diego Averaldo Guiguet Leal ^{c,3},
Éder Carlos Schmidt ^{e,4}, Eduardo Cargin-Ferreira ^f, Márcia Caruso Bicego ^{b,2}, Silvio Tarou Sasaki ^{b,2},
Rosalinda Carmela Montone ^{b,2}, Rafael Alves de Araujo ^{g,5}, Regina Maura Bueno Franco ^{c,3},
Zenilda Laurita Bouzon ^{e,4}, Afonso Celso Dias Bainy ^{d,1}, Célia Regina Monte Barardi ^{a,6}

^a Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Laboratório de Virologia Aplicada, Florianópolis, Santa Catarina CEP: 88040-970, Brazil

^b Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, Laboratório de Química Orgânica Marinha, Praça do Oceanográfico, 191, São Paulo, SP 05508-120, Brazil

^c Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Laboratório de Protozoologia, Rua Monteiro Lobato Nº 255, Campinas, São Paulo PO Box: 6109 CEP: 13083-970, Brazil

^d Universidade Federal de Santa Catarina, Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola, Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Florianópolis, Santa Catarina CEP: 88034-257, Brazil

^e Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Florianópolis, SC CEP 88049-900, Brazil

^f Laboratório de Marcadores Histológicos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina, Campus Garopaba, SC, Brazil

^g Universidade Federal de Santa Catarina, Grupo de Conceção e Análise de Dispositivos Eletromagnéticos, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

- Capítulo de livro aceito a convite para o iConcept Press:

Molecular and Cell Culture Methods for evaluation of Viral Contamination in Environmental Samples Using Human Adenoviruses as Model

Gislaine Fongaro

*Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil*

Vanessa Moresco

*Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil*

Lucas Ariel Totaro Garcia

*Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil*

Elmahdy Mohamed Elmahdy

*Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil*

Doris Sobral Marques Souza

*Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil*

Mariana de Almeida do Nascimento

*Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil*

Mariana Rangel Pilotto

*Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil*

Célia Regina Monte Barardi

*Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil*



- Artigo de padronização das técnicas submetido à análise para publicação na revista Virology Journal:

Recombinant Adenovirus as surrogate for persistence and disinfection studies of adenovirus in water matrices

Mariana A Nascimento*, Lucas AT Garcia*, Célia RM Barardi[§]

Laboratório de Virologia Aplicada, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

*These authors contributed equally to this work

[§]Corresponding author

Email addresses:

MAN: mari_aln@hotmail.com

LATG: lucasabu@gmail.com

CRMB: celia.barardi@ufsc.br

ABSTRACT

Background

Water quality has been affected by the presence of pathogenic microorganisms, mainly enteric viruses. Based on that, it is important to choose a viral model to study persistence in environment as well efficiency of disinfection processes. Human adenoviruses (HAdVs) is an important pathogen that can be transmitted by water consumption and may be chosen as indicator of fecal contamination. Recombinant human adenovirus (rAdV) that express green fluorescent protein (GFP) can be used as surrogate for studies of human and animal adenoviruses persistence and decontamination in environmental samples. HEK 293A cells infected with rAdV provides a novel reporter for assays of viral infectivity, allowing the use of flow cytometry and fluorescence microscopy as rapid and quantitative methods to monitor GFP expression in individual cells. The aim of this study was to determine methods based on GFP-fluorescence able to detect recombinant adenovirus in environmental matrices.

Methods

Kinetics of rAdV GFP-expression was measured by UV-spectrophotometer. Virus titer was determined by flow cytometry (FC) and fluorescence microscopy (FM). Drinking water and filtered seawater sample were collected and the detection limit of FC and FM using water samples and virus stock performed. Plaque Assay (PA) was done in order to compare with FC and FM.

Results

Kinetics of rAdV GFP-expression was determined and it was shown that GFP fluorescence could be early measured by UV-spectrophotometer, flow cytometry (FC) or by fluorescence microscopy (FM) during the first cycle of viral replication (24h post-infection). Virus titer was determined by FC and FM and was 1.4×10^9 GFU/mL and 8.5×10^7 FFU/mL respectively. FC was able to detect GFP expression until 10^{-4} virus dilution while FM could detect until 10^{-6} dilution. Plaque assay (PA) showed similar results than FM, however taking 7 days to read the plaques. Drinking water and seawater were spiked with rAdV and these matrices did not interfere with fluorescence measurement.

Conclusion

rAdV can be feasible and rapidly detected by flow cytometry and fluorescence microscopy including in environmental matrices. rAdV can be used as an excellent model for study on persistence in environment as well efficiency of disinfection process.

Keywords

Recombinant adenovirus, environmental matrices, UV-spectrophotometer, flow cytometry, fluorescence microscopy.

BACKGROUND

Water quality has been affected by the presence of pathogenic microorganisms originated from incorrect disposal of treated, partially treated or untreated sewage in watercourses. Constituting the group of pathogenic microorganisms present in environmental water are the enteric viruses, the main causal agent of gastroenteritis worldwide [1]. They are excreted in high concentrations in feces and are less efficiently removed by primary treatment of drinking water (coagulation and filtration) than other pathogens (bacteria and protozoa) [2, 3]. According to Fong et al. [4], there are hundreds of different types of human viruses present in human sewage, which, if improperly treated, can become a source of contamination in drinking and recreational water.

Based on that, it is important to choose a viral model to study persistence in environment as well efficiency of disinfection processes, such as chlorine, ozone and UV-treatment. Human adenoviruses (HAdVs) is on the USEPA (United States Environmental Protection Agency) Contaminant Candidate List (CCL) as they are important human pathogens that can be transmitted by water consumption and spray (aerosols) [5]. Also, several studies have proposed HAdV as indicator of human fecal contamination [6-10]. HAdVs are nonenveloped and icosahedral viruses containing linear double-stranded DNA. They are included in Adenoviridae family, Mastadenovirus genera and there are 52 serotypes organized in subgroups A-G. Disease symptoms from adenovirus infection in humans include respiratory illness, gastroenteritis, and conjunctivitis [11].

As an alternative, recombinant adenoviruses (rAdV) can be used as a viral model to study persistence and disinfection efficiency of different treatments. rAdV are defective in their replication since they lack the early gene E1. Early gene products, such as E1, are generally involved in viral gene transcription, DNA replication, host immune suppression and inhibition of host cell apoptosis [12]. Thus, rAdV replication is weakened in this condition, unless the replication occurs in permissive cell lines that express E1 gene products, such as Human Embryonic Kidney (HEK) 293A cells [13]. So, rAdV replication can be directly monitored by fluorescent methods based on green fluorescence protein (GFP) expression encoded by a gene incorporated into the viral DNA.

The plaque assay has long been considered as a standard method because of the inherent accuracy and reproducibility, but it is extensively time consuming [14]. HEK 293A cells infected with rAdV provides a novel reporter for assays of viral infectivity, allowing the use of flow cytometry and fluorescence microscopy as rapid and quantitative methods to monitor GFP expression in individual cells [15]. The aim of this study, was to standardized methods based on GFP-fluorescence, such as UV-spectrophotometer, flow cytometry and fluorescence microscopy assays were in order to detect rAdV in environmental matrices. Detection limits and water matrices interference on fluorescence measurements were also determined.

RESULTS

Kinetics of GFP expression

The kinetics of GFP-expression is shown in Figure 1. The onset of cytopathic effect at MOI 10, 1.0 and 0.5 was observed 20 h p.i. After 40 h p.i. there was no attached cells at MOI 10, and at MOI 1.0 and 0.5, 100% of cytopathic effect was observed. The statistical analysis showed that, at MOI 10 and 1.0, there was a significant increase of fluorescence between 18 and 20h p.i. ($P < 0.05$). Thus, the 24h p.i. period was chosen to perform flow cytometry and fluorescence microscopy assays, ensuring the achievement of the fluorescence peak for detection as well the first cycle of viral replication.

Detection limits

This study aimed to determine the rAdV limit of detection by flow cytometry assay and fluorescence microscopy when compared with plaque assay. The use of the same virus stock and dilutions for both techniques was important to allow a direct comparison among the techniques. The 24h p.i. period was used for flow cytometry and microscopy assays in accordance to kinetics GFP-expression results. In order to compare, plaque assay showed virus stock titer of 4.0×10^7 PFU/mL and the limit detection was 10^6 dilution.

(i) Flow cytometry assay

The detection limit of the virus stock by FC was 10^{-4} dilution, corresponding to 2.15×10^5 GFU/mL. No statistically significant differences were found between virus stock and virus diluted in drinking water and flocculated seawater ($P > 0.05$). The titer of the viral working solution was 1.43×10^9 GFU/mL. Seawater inoculated with rAdV

before flocculation had 1 log less virus, representing 10% of viable rAdV recovery (Figure 2).

Regression analysis showed that the correlation was linear, with an r^2 value of 0.9856, by plotting the normalized values in log₁₀ of rAdV inoculated in decimal dilutions ranging from 4.0×10^2 to 4.0×10^7 PFU/mL versus the viral titer by flow cytometry assay obtained at each dilution (Figure 3).

(ii) Fluorescence microscopy assay

The detection limit of the virus stock by FM was 10^{-6} dilution, corresponding to 8.5×10^1 FFU/mL (Figure 4). No statistically significant differences were found between virus stock and virus diluted in drinking water and concentrated seawater ($P > 0.05$). The titer of the viral working solution was 8.5×10^7 FFU/mL. Viable adenovirus recovery was approximately 10%, once that seawater inoculated with rAdV before flocculation had 1 log less virus.

DISCUSSION

Recombinant adenovirus provides a versatile system for gene expression studies and therapeutic applications, including gene transfer *in vitro*, gene therapy and vaccine therapy [16,17,18]. The possibility to transfer genes to a broad spectrum of cell types not depending on active cell division, as well the high-titer preparations of adenoviruses can be readily prepared and used to achieve a high level of transgene expression, made adenovirus the vectors of choice for these applications [16-20]. Although this well-established use, we describe herein a novel application of rAdV in environmental virology field. The current study shows methods standardized to detect rAdV in environmental matrices, such as drinking water and seawater, whereas those water matrices come into frequent contact with the majority population, representing an important vehicle of disease transmission.

Regarding the kinetics of GFP expression assay, at MOI 10 and 1.0 all cells were killed by the virus after 40h p.i., which explains the wide variation of relative fluorescence after this period. The 24h p.i. period was chosen to perform the subsequent assays, ensuring the optimal fluorescence emission for detection, but mainly ensuring the first cycle of viral replication. It is already described that HAdV replication cycle is completed after 24 to 36 h in HeLa cells [11], although viral replication can vary from cell to cell. This is important to not allow longer periods for viral replication which could overestimate the real

viral titer, where at the end of one cycle, about 10^4 viral progeny particles per cell could have been produced [21].

Fluorescence microscopy can be equally compared with plaque assay, since their detection limit was the same (10^{-6} dilution), as well a similar viral titer (Figure 5). Nevertheless, the huge difference concerning the time of incubation (1 day for fluorescence microscopy versus 7 days for plaque assay) supports the choice for fluorescence microscopy assays.

A previous study [22] reported the use of flow cytometry for rAdV detection after 1 to 5 days of incubation. They report that after 3 days of incubation, fluorescent cells were detected at inoculation densities of 1 PFU/well, while in 1 day of incubation it was only possible to detect fluorescence above 100 PFU/well, also showed in this study (400 PFU/well). Therefore, it is remarkable that, when the incubation time is prolonged, the sensitivity of the assay increases but this fact masks the viral replication and the real viral titer.

The viral titer by FC (1.43×10^9 GFU/mL) was higher than by FM (8.5×10^7 FFU/mL). Although, FM presented a lower detection limit, allowing seeing fluorescence in two decimal dilutions more than FC (10^{-6} and 10^{-4} , respectively) (Figure 5). The high detection limit of FC after 24h p.i. was already previously showed [22].

To our knowledge, this is the first study that uses rAdV as virus model for environmental samples. The use of this viral model is economical and practical since this detection does not require the use of antibodies obligatorily requested by detection using immunofluorescence microscopy and traditional flow cytometry. In addition, detection of fluorescence by flow cytometry with rAdV was higher when compared with immunological use of anti-hexon or anti-E1A antibodies [22]. Also, the use of rAdV decrease chances of unspecific binds and loss of cells during extensively washes. Furthermore, FM and FC is faster (1 day) than conventional methods like plaque assay (7-10 days) [15].

The seawater concentration method had approximately 10% of viable rAdV recovery. Others studies show a recovery of 40-50% [8, 23, 24] in river and seawater, however it was available genome copies by quantitative PCR, that not infer in virus viability, as accessed in this study.

CONCLUSIONS

In conclusion, we demonstrated that FC and FM has proven to be feasible, reliable, not time-consuming and not expensive to detect viable recombinant adenovirus in environmental matrices. Drinking water and seawater did not interfere on fluorescence detection, allowing using

these matrices samples and rAdV for further study on persistence in environment as well efficiency of disinfection process.

METHODS

Virus and cell line

Recombinant adenovirus (rAdV) was propagated in Human Embryonic Kidney 293A cells (HEK 293A). HEK 293A were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 1X), supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) and 1% of HEPES. Virus stock was produced by host cell infection using multiplicity of infection (MOI) of 5. After 24h incubation, the flasks were freeze-thawed three times, centrifuged at $2,500 \times g$ for 5 min and the supernatant recovered and stored at -80°C .

Environmental samples

Drinking water sample was obtained from the Water Treatment Plant located at Peri Lagoon, Florianópolis, Brazil, after regular treatment and just prior to chemical disinfection. This water matrix was used without concentration methods.

Filtered seawater sample came from Barra da Lagoa beach, Florianópolis, Brazil, and concentrated by skimmed milk flocculation as previously described to 10 mL final volume [8]. To analyze the seawater matrix influence and the viral recovery after flocculation, two flasks containing 10 L of filtered seawater were inoculated with rAdV before and after the flocculation process respectively. These concentrated samples were analyzed by flow cytometry and fluorescence microscopy assays.

Cytotoxicity assay

To evaluate the cytotoxicity of the drinking water and the flocculated seawater on HEK 293A cells, the confluent monolayers were inoculated with 100 μL of twofold dilutions of each water matrix. Cells were incubated for 60 min at 37°C in 5% of CO_2 and, after incubation, 650 μL of maintenance medium was added (DMEM 1X, containing 2% FBS, 1% HEPES, 1% PSA). After 48 h the cells were stained with Amido Black (Naphthol Blue Black, Sigma), to check monolayer integrity.

Kinetics of GFP expression

This assay was performed in order to determine which period post-infection (p.i.) was more appropriated to detect GFP fluorescence,

ensuring optimal fluorescence quality as well to determine the first cycle of viral replication. For this, HEK 293A confluent monolayers were inoculated with 100 μL of distinct multiplicity of infection (MOI) of rAdV (0.01, 0.1, 0.5, 1, and 10) in triplicates. Cells were incubated for 60 min at 37°C in 5% of CO_2 and, after incubation 650 μL of fresh maintenance medium was added (DMEM 1X, 2% FSB, 1% HEPES, 1% PSA [10 U/mL penicillin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, 2ng/mL amphotericin]). Every 2h up to 60h p.i. the relative fluorescence was measured by UV-spectrophotometer (excitation/emission: 395/508nm) (Molecular Devices SpectraMax M2).

Flow cytometry assay (FC)

HEK 293A confluent monolayers were inoculated with 100 μL of decimal dilutions of virus stock and virus stock spiked in drinking water (without residual free chlorine) and concentrated seawater in a non-cytotoxic dilution in triplicates. Cells were incubated for 60 min at 37°C in 5% of CO_2 and, after incubation, 650 μL of fresh maintenance medium was added (DMEM 1X, containing 2% FSB, 1% HEPES, 1% PSA). After 24 h p.i., the cells were harvested with trypsin, centrifuged at $2000 \times g$ for 3 min, resuspended in 500 μL of PBS and EDTA 0.05 μM solution, and cell viability was counted at Countess® Automated Cell Counter (Invitrogen™). Data from 50,000 events were measured by flow cytometry (BD Biosciences FACSCanto™ II) and were analyzed using the free software program Weasel (version 3.1). The results are shown in Green Fluorescence Unit per mL (GFU/mL).

Fluorescence Microscopy (FM)

The same procedure for cell infection described above was performed in 8-well chamber slides. After 24 h p.i., chambers were mounted in the presence of 50 μL of mounting solution (5% NaCl 5M, 40% PBS, 50% ethanol, 5% formaldehyde, 2.5% DBCO) on the coverslip. Cells were then observed under an epifluorescence microscopy with UV light (Olympus). The viral titer was determined by the following formula: (average green cells counted \times reciprocal dilution)/ inoculum (mL). The results are shown in Focus Forming Unit per mL (FFU/mL).

Plaque assay (PA)

The plaque assay was performed for virus stock aiming to compare the results obtained by both fluorescence methods. The protocol was adapted from other study [25]. Briefly, HEK 293A cells were incubated in 6-well plate for 24 h at 37°C in 5% CO_2 , when confluent monolayers

were achieved. Growth medium was discarded, 300 μL of decimal dilutions of virus stock was added in duplicate to the cell monolayer and the cells were incubated for 60 min at 37°C in 5% of CO_2 . After this period, the inocula were removed and cell monolayers were overlaid with 0.6% Bacto-agar in high glucose DMEM 2X containing 4% FBS, 0.1 mM sodium pyruvate, 26 mM MgCl_2 and incubated at 37 °C for 7 days. After this period, the agar overlay was removed, cells were stained with 20% Gram's crystal violet and plaques were counted macroscopically once the stain was removed. The viral titer was determined by the following formula: (average plaque counted x reciprocal dilution)/ inoculum (mL). The results are shown in Plaque Forming Unit per mL (PFU/mL).

Statistical Analysis

The statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5.0 (USA). ANOVA test, Student's t test, regression and linear correlation were performed and all significant differences are quoted for $P < 0.05$.

Competing interests

No conflict of interest declared.

Authors' contributions

MAN, LATG and CRMB designed the research. MAN and LATG carried out the kinetic of GFP expression study, the detection limit of fluorescence microscopy and flow cytometry assays with virus stock. MAN carried out the collection of drinking water sample, the cytotoxicity assay and the detection limit of fluorescence microscopy and flow cytometry assays using drinking water sample, and performed the statistical analysis. LATG carried out the collection and concentration of seawater sample, the cytotoxicity assay and the detection limit of fluorescence microscopy and flow cytometry assays using seawater sample, as well the plaque assay with virus stock. CRMB conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Ms. Carlos Guillermo Quiroz Carrillo for statistic assistance.

Financial support for this research was provided by National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

1. Figueras MJ, Borrego JJ: **New perspectives in monitoring drinking water microbial quality.** *Int J Environ Res Public Health* 2010, **7**:4179-4202.
2. Bosch A, Guix S, Sano D, Pintó RM: **New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water.** *Curr Opin Biotechnol* 2008, **19**:295-301.
3. Kahler AM, Cromeans TL, Roberts JM, Hill VR: **Effects of source water quality on chlorine inactivation of adenovirus, coxsackievirus, echovirus, and murine norovirus.** *Appl Environ Microbiol* 2010, **76**:5159-5164.
4. Fong TT, Lipp EK: **Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2005, **69**:357-371.
5. USEPA – United States Environmental Protection Agency: **Contaminant Candidate List 3 – CCL 3.** 2009, [<http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/dws/ccl/ccl3.cfm>]
6. Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R: **Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses.** *Appl Environ Microbiol* 1998, **64**:3376-3382.
7. Formiga-Cruz M, Allard AK, Conden-Hansson AC, Henshilwood K, Hernroth BE, Jofre J, Lees DN, Lucena F, Papapetropoulou M, Rangdale RE, Tsibouxi A, Vantarakis A, Girones R: **Evaluation of potential indicators of viral contamination in shellfish and their applicability to diverse geographical areas.** *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**:1556-1563.
8. Calgua B, Mengewein A, Grunert A, Bofill-Mas S, Clemente-Casares P, Hundesa A, Wyn-Jones AP, López-Pila JM, Girones R: **Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples.** *J Virol Methods* 2008, **153**:79-83.
9. Sinclair RG, Jones EL, Gerba CP: **Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review.** *J Appl Microbiol*

- 2009, **107**:1769-1780.
10. Wong M, Kumar L, Jenkins TM, Xagorarakis I, Phanikumar MS, Rose JB: **Evaluation of public health risks at recreational beaches in Lake Michigan via detection of enteric viruses and a human-specific bacteriological marker.** *Water Res* 2009, **43**:1137-1149.
 11. Wold WSM, Horwitz MS: **Adenoviruses.** In *Fields Virology. Volume 1.* 5th edition. Edited by Knipe DM, Howley PM. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007:2396 -2436.
 12. Luo J, Deng ZL, Luo X, Tang N, Song WX, Chen J, Sharff KA, Luu HH, Haydon RC, Kinzler KW, Vogelstein B, He TC: **A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system.** *Nat Protoc* 2007, **2**:1236-1247.
 13. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R: **Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.** *J Gen Virol* 1977, **36**:59-74.
 14. Gueret V, Negrete-Virgen JA, Lyddiatt A, Al-Rubeai M: **Rapid titration of adenoviral infectivity by flow cytometry in batch culture of infected HEK293 cells.** *Cytotechnology* 2002, **38**:87-97.
 15. Hitt DC, Booth JL, Dandapani V, Pennington LR, Gimble JM, Metcalf J: **A flow cytometric protocol for titrating recombinant adenoviral vectors containing the green fluorescent protein.** *Mol Biotechnol* 2000, **14**:197-203.
 16. Miller AD: **Human gene therapy comes of age.** *Nature* 1992, **357**:455-460.
 17. Nadeau I, Kamen A: **Production of adenovirus vector for gene therapy.** *Biotechnol Adv* 2003, **20**:475-489.
 18. McConnell MJ, Imperiale MJ: **Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy.** *Hum Gene Ther* 2004, **15**:1022-1033.
 19. Graham FL, Prevec L: **Adenovirus-based expression vectors and recombinant vaccines.** *Biotechnology* 1992, **20**:363-390.
 20. He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B: **A simplified system for generating recombinant adenoviruses.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**:2509-2514.
 21. Green M, Daesch GE: **Biochemical studies on adenovirus multiplication. II. Kinetics of nucleic acid and protein synthesis in suspension cultures.** *Virology* 1961, **13**:169-176.
 22. Li D, He M, Jiang SC: **Detection of infectious adenoviruses in environmental waters by fluorescence-activated cell sorting**

- assay.** *Appl Environ Microbiol* 2010, **76**:1442-1448.
23. Bofill-Mas S, Calgua B, Clemente-Casares P, La Rosa G, Iaconelli M, Muscillo M, Rutjes S, Husman AMR, Grunert A, Gräber I, Verani M, Carducci A, Calvo M, Wyn-Jones P, Girones R: **Quantification of Human Adenoviruses in European Recreational Waters.** *Food Environ Virol* 2010, **1**:101-109.
 24. Calgua B, Fumian T, Rusiñol M, Rodriguez-Manzano J, Mbayed VA, Bofill-Mas S, Miagostovich M, Girones R: **Detection and quantification of classic and emerging viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas.** *Water Res* 2013, **47**:2797-2810.
 25. Cromeans TL, Lu X, Erdman DD, Humphrey CD, Hill VR: **Development of plaque assays for adenoviruses 40 and 41.** *J Virol Methods* 2008, **151**:140-145.

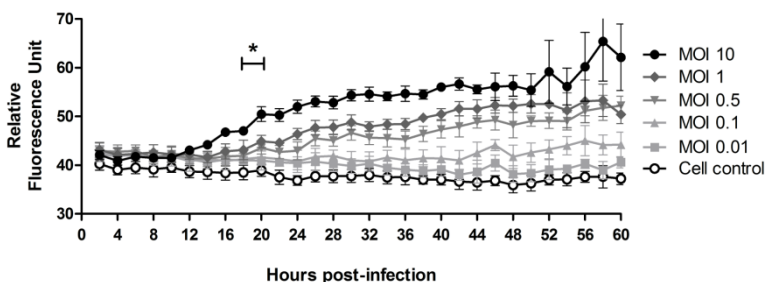


Figure 1 – Kinetic of GFP expression. Kinetics GFP-expression by UV-spectrophotometer in HEK293A cells infected with rAdV at MOI of 0.01, 0.1, 0.5, 1.0, 10, and cellular control

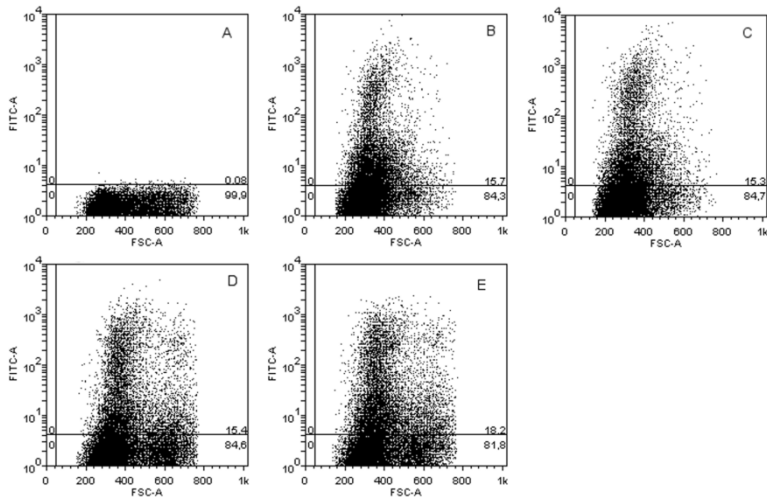


Figure 2 – Flow cytometry of HEK293A cells inoculated with rAdV in water samples. Dot plot of HEK293A cells inoculated with rAdV in drinking water and seawater matrices. Cellular control (A); virus stock diluted 10^{-3} (B); virus in drinking water diluted 10^{-3} (C); virus spiked in seawater after concentration diluted 10^{-3} (D); virus spiked in seawater before concentration diluted 10^{-2} (E).

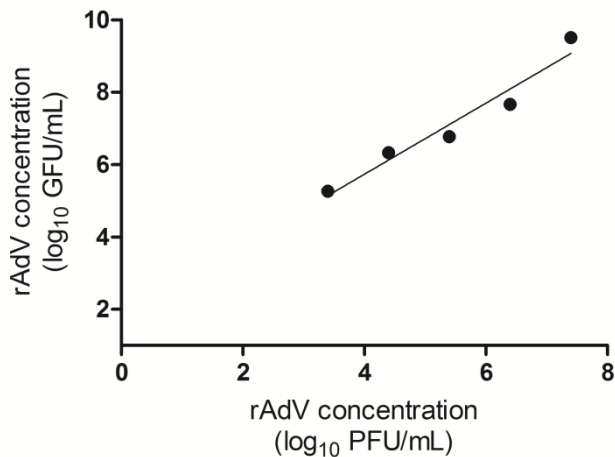


Figure 3 – Linear regression of plaque assay and flow cytometry assay. Normalized values in log₁₀ of rAdV inoculated in plaque assay (PFU/mL) *versus* the viral titer obtained by flow cytometry assay (GFU/mL). The linear

regression with an r^2 value of 0.9468 was obtained with the equation: $y = 0.9821x + 1.8048$.

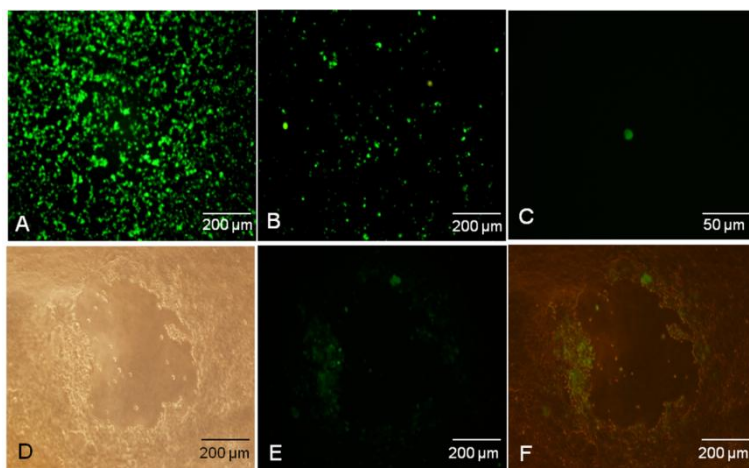


Figure 4 - Fluorescence microscopy of HEK 293A cells infected with rAdV. Dilutions 10^{-3} and 10^{-4} dilutions (A and B, respectively); single cell infected at 10^{-5} dilution (C); single PFU microscopy (D), fluorescent microscopy (E) and merged (F).

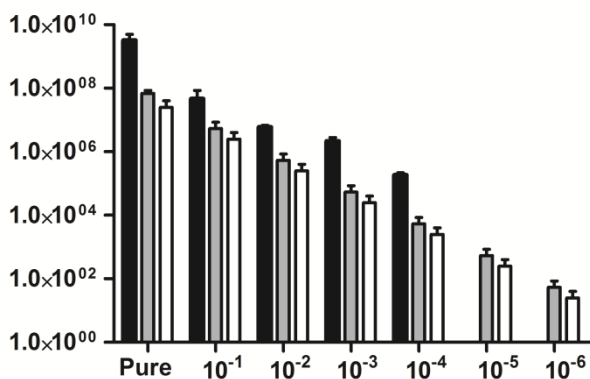


Figure 5 – Detection limit of rAdV by flow cytometry, fluorescence microscopy and plaque assay. Flow cytometry, fluorescence microscopy, and plaque assay. Flow cytometry assays shows 10^{-4} detection limit, while fluorescence microscopy and plaque assay shows 10^{-6} .