

Lucas Ariel Totaro Garcia

**Percepção pública e qualidade da água distribuída em  
Florianópolis, SC: avaliação e proposição de alternativas de  
tratamento**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de doutor em Biotecnologia e Biociências; área de concentração: Microbiologia

Orientador: Profa. Dra. Célia Regina Monte Barardi

Florianópolis  
2018

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

Garcia, Lucas Ariel Totaro

Percepção pública e qualidade da água distribuída em Florianópolis, SC: avaliação e proposição de alternativas de tratamento / Lucas Ariel Totaro Garcia ; orientadora, Célia Regina Monte Barardi, 2018.

167 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

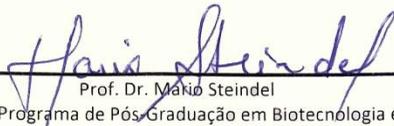
1. Biotecnologia e Biociências. 2. Percepção pública. 3. Qualidade da água. 4. Ultravioleta (UV). 5. Compostos naturais e sintéticos. I. Barardi, Célia Regina Monte. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

**"Percepção pública e qualidade da água distribuída em Florianópolis, SC:  
avaliação e proposição de alternativas de tratamento"**

Por

**Lucas Ariel Totaro Garcia**

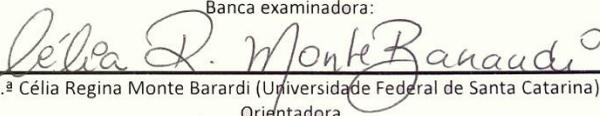
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (28/PPGBTC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



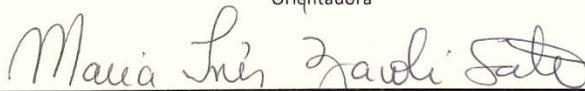
Prof. Dr. Márcio Steindel

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

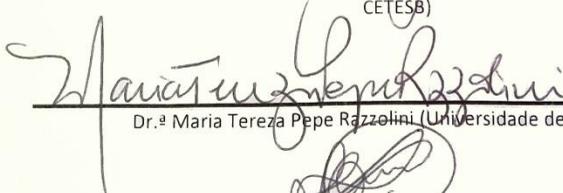
Banca examinadora:



Dr.ª Célia Regina Monte Barardi (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientadora



Dr.ª Maria Inês Zanolli Sato (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB)



Dr.ª Maria Tereza Pepe Razzolini (Universidade de São Paulo)



Dr.ª Thais Cristine Marques Sincero (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 05 de Março de 2018.



“O sucesso nasce do querer, da  
determinação e persistência  
em se chegar a um objetivo.  
Mesmo não atingindo o alvo,  
quem busca e vence obstáculos,  
no mínimo fará coisas admiráveis.”

*José de Alencar*



## Agradecimentos

Agradeço e dedico à minha família pelo pleno apoio e confiança. Aos meus pais, Mônica e Carlos, que nunca mediram esforços para que eu cumprisse meu objetivo. Nenhum desses (quase) 12 anos em Florianópolis seriam possíveis sem eles me incentivando.

Ao meu irmão (e *personal* estatístico), Leandro, que foi essencial para a elaboração do projeto de tese, a execução e, obviamente, pelas análises. Seu profissionalismo e dedicação são inspirações para mim. À minha cunhada, Cris, pela convivência e por dividir o tempo do Leandro comigo nos nossos momentos de lazer.

À Célia, querida orientadora que tanto me ajudou ao longo de todos esses anos no laboratório. Suas instruções e contestações me fizeram ser uma pessoa e um profissional melhor. Agradeço sua paciência e confiança, principalmente aceitando um projeto ousado como foi esta tese.

Ao Markus Nagl, meu orientador durante o doutorado sanduíche na Áustria. Agradeço por prontamente me aceitar e receber como um membro de seu laboratório. Também agradeço aos meus colegas do laboratório e do departamento, principalmente Bernhard, Andrea, Stefan e Waldo. Foram seis meses de ótima convivência e aprendizado.

À Prefeitura Municipal de Florianópolis e às creches, por me permitirem fazer as análises de água. Agradeço também a todos os participantes da pesquisa sobre a qualidade da água. Suas respostas e experiências compartilhadas são a base desta tese.

Aos professores Cláudia Simões e Flávio Reginatto pelas conversas e ideias sobre os ensaios com os compostos. Também à Caroline e Vitor, por me auxiliar nos ensaios com o extrato de semente de uva.

A todos os professores, colegas e servidores do departamento e da PPG Biotecnologia e Biociências. Aos membros do LAMEB, por auxiliarem a minha pesquisa e também pelas conversas descontraídas.

Aos professores Mauricio Petrucio e Nei Kavaguichi do departamento ECZ, que gentilmente emprestaram equipamentos para análise da água.

Agradeço a todos meus amigos e colegas que convivi nesses anos no LVA. Seria incapaz de citar de cada um, mas todos tiveram sua participação especial em minha formação. Não teria como encontrar um grupo tão unido e divertido como este. Gostaria apenas de citar a Laurita, por aceitar e realizar os ensaios de citotoxicidade dos compostos.

Aos meus amigos da bio, que distantes ou não, sempre é um prazer os reencontrar, conversar, rir e dividir conquistas e desilusões. Foram muitos anos de amizade e que venham muitos outros. Aos meus amigos de São Paulo, que sempre me recebem como se nunca tivesse partido. Aos meus amigos da LDU, que também tiveram importante participação para duas coisas que me alegram: tomar cerveja e jogar bola.

Aos membros da banca de qualificação e de defesa. Agradeço por aceitarem o convite e as considerações feitas para a melhoria do trabalho.

Às agências financiadoras do projeto e da bolsa, CNPq e CAPES.

## Resumo

De acordo com a Associação Internacional da Água, os padrões de potabilidade devem ser baseados na proteção da saúde humana e na aceitabilidade de quem a consome. Nesse contexto, pesquisas públicas podem fornecer informações primordiais sobre a percepção e satisfação quanto à qualidade da água. Alternativas ao cloro para a desinfecção podem aprimorar a qualidade da água em domicílios e em regiões descentralizadas. Os objetivos do presente estudo de tese foram avaliar a satisfação dos consumidores, a qualidade físico-química e microbiológica da água consumida em Florianópolis, bem como desenvolver alternativas que visem a melhoria da qualidade da água de consumo em domicílios e em escala descentralizada. Um inquérito foi realizado em seis bairros, sendo escolhido um bairro mais proximal e outro mais distal de cada uma das três Estações de Tratamento de Água (ETA). Um questionário estruturado foi utilizado para a coleta de dados, por meio da via postal e de entrevistas, sendo analisados por estatística descritiva e regressão logística binária. O inquérito obteve 581 respostas e apenas 39% dos entrevistados se mostraram satisfeitos com a qualidade da água recebida, sendo a insegurança o principal motivo de insatisfação. O sabor da água foi o pior fator organoléptico avaliado. A análise de regressão logística permitiu estabelecer interações entre as regiões e distância, como por exemplo, as pessoas que moravam próximas do centro de distribuição tiveram uma menor chance de estarem satisfeitas com o odor da água, em relação a quem morava mais distante. Para as análises de qualidade microbiológica e físico-química da água, foram selecionadas 12 creches, das quais cada duas representavam uma determinada região e distância até a ETA. Foram realizadas três campanhas de coletas de 10L de água, avaliando parâmetros físico-químicos e microbiológicos, no verão e no inverno, totalizando 71 amostras. A avaliação da água nas creches indicou que 63% das amostras estavam em desconformidade com os padrões de potabilidade. Diferenças da concentração de cloro entre as regiões e distâncias também foram detectadas. 32% das amostras foram positivas para coliformes totais e uma para adenovírus viáveis (38 UFP/L). Desse modo, a insatisfação da população é justificada pela inadequada qualidade da água de consumo. Como processo alternativo de desinfecção, utilizou-se um tanque em escala piloto de 300L de água com luz UV e bomba de circulação acopladas. A água foi inoculada com adenovírus recombinante (rAdV-GFP) e norovírus murino (MNV-1) e avaliado a viabilidade dos mesmos após 0, 3, 6 e 12h de circulação de água. Também foi avaliado o decaimento da concentração de cloro

durante a recirculação da água no tanque. Foi observado a inativação superior a 4logs (99,99%) de MNV-1 e rAdV-GFP em até 12h. O cloro reduziu 0,77 mg/L no mesmo período. Assim, o tanque se mostrou uma alternativa viável para tratamento de água de consumo em domicílios e regiões descentralizadas, sendo passível de escalonamento. Compostos naturais (extrato de semente de uva - GSE) e sintéticos (N-clorotaurina – NCT, e Bromoamina-T – BAT) foram testados na inativação de rAdV-GFP em água. BAT e GSE foram capazes de inativar o adenovírus em concentrações menores (0,01%) que a NCT (1%), porém foi observado um decaimento mais rápido com a BAT (10 min) do que a NCT e o GSE (120 min). Contudo, a NCT e a GSE apresentaram maior estabilidade na presença de matéria orgânica e em diferentes pH (6,8 e 2,5). Para a BAT foi constatado um acentuado decaimento da atividade oxidativa na presença de peptona, potencializado em pH 2,5. Ensaio de citotoxicidade *in vitro* apontou que apenas a NCT nas concentrações utilizadas afeta a viabilidade celular. Portanto, os compostos testados apresentaram potencial para aplicação na desinfecção de águas para diferentes finalidades.

**Palavras-chaves:** água de consumo, satisfação pública, patógenos entéricos, luz UV, compostos naturais.

## **Abstract**

### **Public perception and quality of drinking water in Florianopolis, SC: assessment and alternatives propositions for treatment**

According to the International Water Association, drinking water standard should be based on the human health and the consumer's acceptability. In this context, public surveys can gather valuable information about the perception and satisfaction of drinking water. Chlorine alternatives for disinfection can improve the water quality in households and decentralized areas. The aim of this study was to assess the consumer's satisfaction and the physical-chemical and microbiological quality of drinking water in Florianopolis, Brazil, as well as develop alternatives to enhance the quality of water in households and decentralized areas. A public survey was conducted in six districts, one close and another far from each of three water providers. A questionnaire was applied for data collection, using postal and interview strategies, and evaluated by descriptive statistic and binary logistic regression. It was obtained 581 answers and only 39% from participants were satisfied with the quality of the drinking water provided, being the lack of safety the main reason. Taste was the worst organoleptic attribute evaluated. Logistic regression allowed establishing interaction between the regions and distances to the water provider. For instance, those who lived close to the provider were less likely to report the odor as satisfactory than those who lived far. For drinking water analysis were selected 12 municipal daycare centers, being two in every district previously selected. Three sampling campaigns were conducted in summer and winter and it was collected 10L of water and assessed physical-chemical and microbiological parameters, totalizing 71 samples. The results showed that 63% of samples were not in accordance to Brazilian regulations of drinking water. Variation on chlorine concentration was detected among the regions and distances to the provider. 32% of samples were positive for total coliforms and one for infectious human adenovirus (38 PFU/L). Thus, people were not satisfied about the drinking water provided and it is supported by the inadequate quality. As alternative disinfection process was used a pilot scale tank of 300L coupled to an UV light and a water pump. Water was artificially contaminated with recombinant human adenovirus (rAdV-GFP) and murine norovirus (MNV-1) and it was accessed after 0, 3, 6 and 12h of water circulation. Also, was evaluated the chlorine concentration decay during the water recirculation. It was observed an inactivation decay higher than 4logs

(99.99%) for MNV-1 and rAdV-GFP after 12h. Chlorine concentration was reduced by 0.77mg/L at the same period. So, the water tank can be potential and viable alternative for drinking water treatment in households and decentralized areas. Natural and synthetic compounds (Grape Seed Extract – GSE; N-chlortaurine – NCT; and Bromamine-T – BAT) were tested for rAdV-GFP inactivation in water. BAT and GSE were able to inactivate adenovirus in a lower concentration (0.01%) than NCT (1%), although it was observed a faster decay with BAT (10 min) than NCT and GSE (120 min). However, NCT and GSE were more stable on the presence of organic matter and on pH variations (6.8 and 2.5). BAT had an accelerated decay on the oxidative activity on the presence of peptone, and it was enhanced in pH 2,5. *In vitro* cytotoxicity assay showed that only NCT affects the cell viability, at the concentrations evaluated. Therefore, the tested compounds have potential to be used as disinfectants in different water sources.

**Keywords:** drinking water, public perception, enteric pathogens, UV light, natural compounds.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Distribuição do total de água doce renovável no mundo no ano de 2014, em bilhões de metros cúbicos. ....	24
<b>Figura 2.</b> Uso da água doce para fins domésticos em porcentagem (%) do total de água retirada em cada país, no ano de 2014. ....	24
<b>Figura 3.</b> Localização do município de Florianópolis, pontos de captação e respectivas regiões de abastecimento pela CASAN. ....	30
<b>Figura 4.</b> Localização dos 12 reservatórios de água para distribuição referentes ao sistema Cubatão-Pilões, no município de Florianópolis. .	31
<b>Figura 5.</b> Localização dos seis reservatórios de água para distribuição referentes ao sistema Norte, no município de Florianópolis. ....	32
<b>Figura 6.</b> Localização dos cinco reservatórios de água para distribuição referentes ao sistema Leste-Sul, no município de Florianópolis. ....	32
<b>Figura 7.</b> Distribuição de ácido hipocloroso (HOCl) e de íon hipoclorito (OCl <sup>-</sup> ), em porcentagem, de acordo com a variação de pH, a temperaturas de 0 e 20°C. ....	33
<b>Figura 8.</b> Relação do tempo de contato (min) com a concentração de cloro livre (ppm) para a desinfecção de 99% de diferentes microrganismos. ....	35
<b>Figura 9.</b> Estrutura química da N-clorotaurina (NCT). ....	40
<b>Figura 10.</b> Estrutura química do sal de Bromoamina-T (BAT). ....	41
<b>Figura 11.</b> Estrutura do adenovírus humano: (A) desenho esquemático e (B) microscopia eletrônica de transmissão. ....	47
<b>Figura 12.</b> Estrutura do norovírus humano: (A) desenho esquemático e (B) microscopia eletrônica de transmissão. ....	49
<b>Figura 13.</b> Modelo dos frascos para análise de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> em amostras de água. Colorações transparente, amarelada e fluorescente correspondem às amostras negativas, positivas para coliformes totais e positivas para <i>E. coli</i> , respectivamente. ....	55
<b>Figura 14.</b> Média das notas atribuídas em cada bairro para a qualidade geral, sabor, odor, segurança, a ser saudável para a família, durante a estação de verão e nos sete dias anteriores ao inquérito, em relação à média amostral da qualidade geral da água (linha pontilhada). Notas em escala Likert (1 – Muito Ruim; 2 – Ruim; 3 – Nem bom, nem ruim; 4 – Bom; 5 – Muito bom). ....	68
<b>Figura 15.</b> Média da concentração de cloro na água de consumo em creches municipais, durante as campanhas de coleta de verão e inverno, distribuído por região e distância das ETAs em Florianópolis, SC, 2016. Linhas pontilhadas representam os limites estabelecidos pela legislação. ....	82

<b>Figura 16.</b> Imagens do tanque de 300L com luz UV acoplada utilizado para os ensaios de desinfecção vira.....	93
<b>Figura 17.</b> Quantidade média (pontos) e intervalo de confiança (linha pontilhada) de rAdV-GFP (FFU) e MNV-1 (PFU) presentes em 300L de água no tanque de tratamento, com e sem tratamento de luz UV. ....	98
<b>Figura 18.</b> Decaimento médio (pontos) e intervalo de confiança (linha pontilhada) da concentração de cloro livre presente em 300L de água no tanque de tratamento .....	99
<b>Figura 19.</b> Modelo de tanque desenvolvido para tratamento de água e redução de cloro. (1) Tubo de abastecimento; (2) Filtro de partículas; (3) Tanque de acondicionamento; (4) Tubo de recirculação; (5) Reator com lâmpada de ultravioleta; (6) Bomba de água; (7) Válvula de despejo; (8) Tubo de despejo. ....	101
<b>Figura 20.</b> Modelo em três dimensões do tanque desenvolvido para o tratamento de água e redução de cloro. Tubulações em verde; Filtro de partículas em cinza; Bomba de água e vermelho; Reator com lâmpada UV em preto e roxo.....	102
<b>Figura 21.</b> Decaimento de rAdV-GFP ( $\log_{10}$ ) frente ao tratamento com NCT em diferentes concentrações em água destilada.....	118
<b>Figura 22.</b> Decaimento de rAdV-GFP ( $\log_{10}$ ) frente ao tratamento com BAT em diferentes concentrações em água destilada.....	118
<b>Figura 23.</b> Decaimento de rAdV-GFP ( $\log_{10}$ ) frente ao tratamento com GSE em diferentes concentrações em água destilada. ....	119
<b>Figura 24.</b> Média e desvio padrão do decaimento da capacidade oxidativa (%) de NCT a 1 e 2% na presença de diferentes concentrações de peptona em pH 6,8 e 2,5.....	122
<b>Figura 25.</b> Média e desvio padrão do decaimento da capacidade oxidativa (%) de NCT a 1 e 2% na presença de diferentes concentrações de peptona em pH 6,8 e 2,5.....	124
<b>Figura 26.</b> Curva de decaimento do teor de fenólicos totais do extrato de semente de uva (GSE) em contato com a peptona em pH 6,8 e 2,5. ....	125
<b>Figura 27.</b> Curva de decaimento da porcentagem de captação de radicais livres do extrato de semente de uva (GSE) em contato com a peptona em pH 6,8 e 2,5. ....	126

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros de potabilidade da água e seus valores máximos permitidos durante o sistema de distribuição, segundo o Anexo XX da Portaria de Consolidação n.º 5 do Ministério da Saúde. ....	29
<b>Tabela 2.</b> Valores de Ct recomendados pela USEPA para a inativação de 99% de bactérias, vírus e cistos de <i>Giardia</i> , de acordo com o pH e a temperatura da água. ....	35
<b>Tabela 3.</b> Dosagem de luz UV necessária para inativação de 1 a 4 logs para diversos vírus e bactérias. ....	39
<b>Tabela 4.</b> Descrição dos principais dados sociodemográficos, frequência de limpeza da caixa d'água e principal fonte de água utilizada para beber, obtidos por meio de inquérito populacional obtidas nas regiões Central, Leste/Sul e Norte de Florianópolis, SC. ....	63
<b>Tabela 5.</b> Frequência de respostas e análise de regressão logística, por região e distância do abastecimento, referente aos motivos relatados pela população de Florianópolis, SC, para não beber água da torneira. ....	65
<b>Tabela 6.</b> Frequências de respostas, por região e distância do abastecimento, e análise de regressão logística referente às pessoas de Florianópolis, SC, que avaliaram a água como boa ou muito boa para os quesitos: qualidade geral da água, sabor, odor, cor, segurança, a ser saudável para família e custo. ....	69
<b>Tabela 7.</b> Frequências de respostas, por região e distância do abastecimento, e análise de regressão logística referente às pessoas de Florianópolis, SC, que reportaram piora na qualidade da água para os quesitos: sabor, odor, cor, segurança e a ser saudável para família. ....	75
<b>Tabela 8.</b> Tabela de contingência da quantidade de questionários respondidos que reportavam o número de pessoas que apresentaram sintomas de gastroenterites (náuseas, diarreia e vômito) na casa e quantas delas foram levadas ao médico. ....	78
<b>Tabela 9.</b> Parâmetros físico-químicos, coliformes totais, <i>Escherichia coli</i> e adenovírus humano viável (HAdV) em água de consumo coletada na estação de verão em creches municipais. Florianópolis, Brasil, março, 2016. ....	80
<b>Tabela 10.</b> Parâmetros físico-químicos, coliformes totais, <i>Escherichia coli</i> e adenovírus humano viável (HAdV) em água de consumo coletada na estação de inverno em creches municipais. Florianópolis, Brasil, agosto, 2016. ....	81
<b>Tabela 11.</b> Valores médios (e desvio padrão) dos parâmetros físico-químicos da água antes e após a sua circulação no tanque de tratamento por luz UV. ....	97

<b>Tabela 12.</b> Concentrações dos compostos testados (em porcentagem - p/v) nos ensaios de citotoxicidade em células HGF e HEK293A.....	115
<b>Tabela 13.</b> Decaimento médio (e desvio padrão) de rAdV-GFP (em $\log_{10}$ ) frente ao tratamento com NCT em diferentes concentrações em água destilada, por até 120 minutos de exposição. ....	117
<b>Tabela 14.</b> Decaimento médio (e desvio padrão) de rAdV-GFP (em $\log_{10}$ ) frente ao tratamento com BAT em diferentes concentrações em água destilada, por até 120 minutos de exposição. ....	117
<b>Tabela 15.</b> Decaimento médio (e desvio padrão) de rAdV-GFP (em $\log_{10}$ ) frente ao tratamento com GSE em diferentes concentrações em água destilada, por até 120 minutos de exposição. ....	118
<b>Tabela 16.</b> Decaimento médio da capacidade oxidativa (em %) de NCT a 1 e 2% na presença de diferentes concentrações de peptona em pH 6,8 e 2,5.....	121
<b>Tabela 17.</b> Decaimento médio da capacidade oxidativa (em %) de BAT a 1 e 2% na presença de diferentes concentrações de peptona em pH 6,8 e 2,5.....	123
<b>Tabela 18.</b> Valores médios (e desvio padrão) de CC50 dos compostos NCT, BAT e GSE frente às linhagens celulares HGF e HEK 293 comparadas às concentrações utilizadas para os experimentos de inativação de adenovírus.....	127

### Lista de Abreviaturas

- A549 – Linhagem celular epitelial de carcinoma pulmonar humano  
AdV – Adenovírus humanos  
BAT – Bromoamina-T  
CASAN – Companhia Catarinense de Águas e Saneamento  
CAT – Cloroamina-T  
CC50 – concentração necessária para reduzir 50% da viabilidade celular  
cg – Cópias genômicas  
cox – capacidade oxidativa  
Ct – concentração de cloro (mg/L) x tempo de contato (min)  
DMEM – *Dulbecco's modified Eagle medium* (Meio Eagle modificado Dulbecco)  
DO – Densidade Óptica  
DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil  
E1 – gene do adenovírus humano  
ETA – Estação de Tratamento de Água  
GFP – *Green Fluorescent Protein* (Proteína Verde Fluorescente)  
GSE – *Grape Seed Extract* (Extrato de semente de uva)  
HEK293 – Linhagem celular de rim embrionário humano  
HGF – Linhagem celular de fibroblasto de gengiva humano  
IC95% – Intervalo de confiança de 95%  
MEM – *Minimum Essential Medium* (Meio Mínimo Essencial)  
mg EAG – miligramas Equivalentes de Ácido Gálico  
mJ – milijoule (s)  
MNV-1 – Norovírus murino tipo 1  
NCT – N-clorotaurina  
NoV – Norovírus humano  
OR – *Odds ratio* (razão de chances)  
p/v – relação peso/volume  
PBS – *Phosphate Buffer Solution* (Solução Tampão de Fosfato)  
PCR – *Polimerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)  
PFU – *Plaque Forming Units* (Unidade Formadora de Placa)  
PS – Antibiótico contendo Penicilina e Estreptomicina  
qPCR – PCR quantitativa  
rAdV-GFP – Adenovírus humano recombinante que expressa a proteína GFP  
RAW 264.7 – Linhagem celular de macrófagos murinos  
SFB – Soro Fetal Bovino  
TFT – Teor de Fenólicos Totais

THM – Trihalometano

TNF- $\alpha$  – *Tumor necrosis fator alpha* (Fator de necrose tumoral alfa)

UFF – Unidades Formadoras de Foco

UFP – Unidades Formadoras de Placas

uT – Unidade de Turbidez

UV – Ultravioleta

v/v – relação volume/volume

VP – *Viral Protein* (Proteína Viral)

$\times g$  – Força gravitacional

## Sumário

CONTEXTUALIZAÇÃO.....	23
I. Distribuição e uso da água.....	23
II. A água em áreas remotas e situações emergenciais no Brasil.....	27
III. O abastecimento de água de consumo.....	28
i. Normas do tratamento.....	28
ii. O abastecimento de água em Florianópolis.....	29
iii. O cloro como desinfetante.....	33
IV. Alternativas ou complementos à desinfecção por cloro.....	38
i. A luz ultravioleta.....	38
ii. Os compostos naturais e sintéticos.....	39
V. A população e a água consumida.....	42
VI. Doenças de veiculação hídrica.....	44
VII. Marcadores de contaminação aquática.....	45
i. Coliformes totais e fecais.....	45
ii. Vírus entéricos.....	46
OBJETIVO GERAL.....	50

### **Capítulo 1: Avaliação da percepção pública e da qualidade da água distribuída em Florianópolis, SC**

1.1 Hipóteses.....	52
1.2 Objetivos específicos.....	52
1.3 Material e métodos.....	52
1.3.1 Inquérito populacional.....	52
1.3.2 Avaliação de água de consumo em Florianópolis.....	54
1.3.3 Método de concentração viral de amostras de água.....	56
1.3.4 Ensaio de citotoxicidade da água concentrada.....	56
1.3.5 Ensaio de placa de lise (UFP) para adenovírus humano.....	57
1.3.6 Ensaio de placa de lise (UFP) para norovírus murino.....	58
1.3.7 Análise dos dados.....	59
1.4 Resultados.....	61
1.4.1 Inquérito populacional.....	61
1.4.2 Avaliação da qualidade da água em creches municipais.....	78
1.5 Discussão.....	83
1.6 Conclusões.....	91

## **Capítulo 2: Uso de tanque com luz ultravioleta como alternativa de tratamento de água**

2.1 Hipótese .....	93
2.2 Objetivos específicos .....	93
2.3 Material e métodos.....	93
2.3.1 Avaliação da eficiência dos tanques de desinfecção com UV na inativação viral .....	93
2.3.2 Cultivo de células .....	94
2.3.3 Produção de estoques virais.....	95
2.3.4 Ensaio de citotoxicidade da água concentrada.....	95
2.3.5 Ensaio para determinar a viabilidade viral .....	95
2.3.6 Avaliação do decaimento do cloro no tanque de tratamento .....	96
2.3.7 Análise dos dados .....	96
2.4 Resultados.....	97
2.4.1 Eficiência do tanque de tratamento na desinfecção de vírus.....	97
2.4.2 Decaimento do cloro residual livre no tanque de tratamento.....	99
2.4.3 Modelo do tanque de tratamento .....	99
2.5 Discussão .....	103
2.6 Conclusões .....	108

## **Capítulo 3: Compostos naturais e sintéticos visando a desinfecção de águas naturais**

3.1 Hipótese .....	110
3.2 Objetivos específicos .....	110
3.3 Material e métodos.....	110
3.3.1 Características e preparação dos compostos NCT, BAT e GSE .....	110
3.3.2 Avaliação da eficiência dos compostos (NCT, BAT e GSE) na inativação de rAdV-GFP em água destilada.....	111
3.3.3 Avaliação da atividade oxidativa de NCT e BAT na presença de matéria orgânica .....	112
3.3.4 Determinação da quantidade de fenólicos totais e da atividade antioxidante de GSE na presença de matéria orgânica .....	113
3.3.5 Avaliação da citotoxicidade dos compostos (NCT, BAT e GSE) <i>in vitro</i> .....	114
3.3.6 Análise dos dados .....	116

3.4 Resultados.....	116
3.4.1 Avaliação da eficiência dos compostos (NCT, BAT e GSE) na inativação de rAdV-GFP em água destilada.....	116
3.4.2 Avaliação da atividade oxidativa de NCT e BAT na presença de matéria orgânica .....	119
3.4.3 Determinação da quantidade de fenólicos totais e da atividade antioxidante de GSE na presença de matéria orgânica .....	124
3.4.4 Avaliação da citotoxicidade dos compostos (NCT, BAT e GSE) <i>in vitro</i> .....	126
3.5 Discussão .....	127
3.6 Conclusões.....	136
DISCUSSÃO GERAL .....	137
PPERPECTIVAS.....	140
REFERÊNCIAS.....	141
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	158
ANEXO B – QUESTIONÁRIO UTILIZADO NO INQUÉRITO.....	161
ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	165
ANEXO D – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO REFERENTE AO CAPÍTULO 1.....	166
ANEXO E – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO REFERENTE AO CAPÍTULO 2.....	167



## CONTEXTUALIZAÇÃO

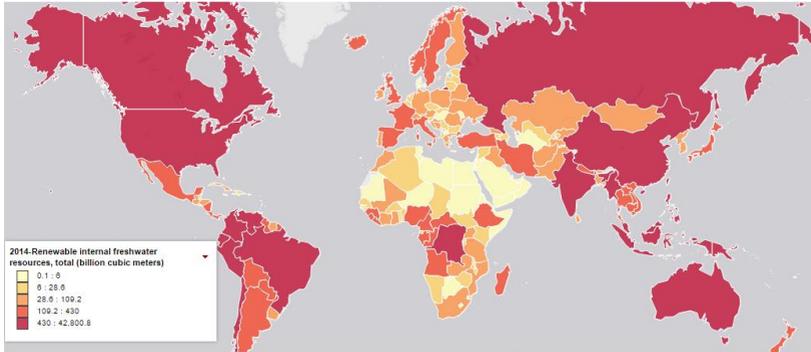
### I. Distribuição e uso da água

A água é um elemento vital para o nosso planeta em todos os aspectos. Um ecossistema aquático plenamente funcional e saudável fornece um abundante conjunto de benefícios dentre eles alimentos, lazer, preservação do litoral, processamento de resíduos e sequestro de carbono. A água segura e prontamente disponível é importante para a saúde pública, seja ela usada para beber, uso doméstico, produção de alimentos ou fins recreativos (OMS, 2010). Contudo, no início do presente século o mundo enfrenta uma crise na qualidade da água, causada principalmente pelo contínuo aumento da população, industrialização, práticas de produção de alimentos, fragilidade das estratégias de uso da água e tratamento inadequado de dejetos ou a falta do mesmo (CORCORAN et al., 2010).

Dado o papel da água como um recurso natural primordial ao bem-estar social, à prosperidade econômica e à integridade ambiental, ela é fundamental para o desenvolvimento sustentável. A melhoria do abastecimento de água e saneamento e uma melhor gestão dos recursos hídricos podem impulsionar o crescimento econômico dos países e podem contribuir para a redução da pobreza (OMS, 2010). Assim, as políticas e estratégias de gestão da água variam dependendo do abastecimento, o grau em que as necessidades sociais são cumpridas, e as necessidades dos diversos setores econômicos (SCHUSTER; SANDFORD, 2015).

Algumas das maiores preocupações relativa à água são a qualidade, a quantidade disponível e o seu desperdício. De todos os recursos hídricos existentes no mundo, somente 2,5% correspondem à água doce. Desta, apenas 1% está disponível para retirada e consumo, o que equivale a aproximadamente a 42.800 bilhões de metros cúbicos de água renovável (CORCORAN et al., 2010; THE WORLD BANK, 2017). Essa quantidade está desigualmente distribuída entre os países (Figura 1), sendo o Brasil o país que detém a maior quantidade de água doce renovável, com 13% do total (THE WORLD BANK, 2017).

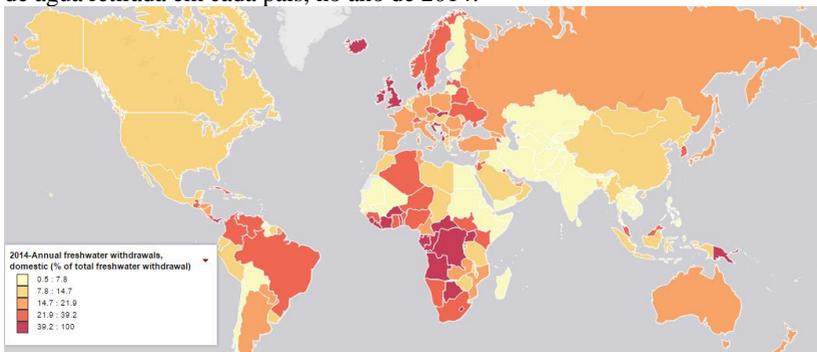
**Figura 1.** Distribuição do total de água doce renovável no mundo no ano de 2014, em bilhões de metros cúbicos.



Fonte: The World Bank, 2017

Com relação ao consumo da água disponível, no ano de 2014 foram retirados em todo o mundo cerca de 3.900 bilhões de metros cúbicos de água doce. Desse total, 60% foi utilizado na agricultura, 22% para fins industriais e 18% para uso doméstico. No Brasil, foram consumidos 74,8 bilhões de metros cúbicos de água, mantendo a proporção mundial de uso na agricultura, porém com 17% sendo utilizado nas indústrias e 23% para fins domésticos. Proporcionalmente, o Brasil foi um dos países com maior consumo de água em domicílio, com aproximadamente 17 bilhões de metros cúbicos (Figura 2) (THE WORLD BANK, 2017).

**Figura 2.** Uso da água doce para fins domésticos em porcentagem (%) do total de água retirada em cada país, no ano de 2014.



Fonte: The World Bank, 2017

A importância da água no futuro do planeta é reforçada quando se observa as 17 Metas Globais para o Desenvolvimento Sustentável a serem atingidas até 2030, elaboradas pela Organização das Nações Unidas (ONU) em 2015. Dentre elas, a meta de número seis, denominada “Água limpa e saneamento”, tem por objetivo principal garantir a disponibilidade e o manejo sustentável da água e saneamento para todos (ONU, 2015a). Além desta, que aborda especificamente sobre a qualidade da água, diversos objetivos específicos das demais metas estão explicitamente integrados a essa problemática. Como exemplos, estão a redução de doenças e mortes devido a poluição e contaminação do ambiente aquático e a redução dos impactos de desastres relacionados à água (SCHUSTER; SANDFORD, 2015).

Contudo, a perspectiva no uso dos recursos aquáticos não é otimista. Até 2030 a população mundial deve ultrapassar os oito bilhões de pessoas, levando à necessidade de um incremento na produção de alimentos em 50% (ONU, 2015b). Devido à grande quantidade de água necessária para a agricultura, haverá um significativo aumento no seu consumo. Assim, estima-se que cerca de 2/3 da população passará por problemas relacionados à água nos próximos dez anos (ONU, 2015c). Melhorias na gestão deste recurso podem permitir uma mudança, mas somente se conseguir alcançar um equilíbrio sustentável entre as demandas sociais, ambientais e de cada setor econômico (SCHUSTER; SANDFORD, 2015).

A água potável e o saneamento adequado são fundamentais para a redução da pobreza e o desenvolvimento sustentável. Com base nessa premissa a Organização das Nações Unidas em julho de 2010, por meio da Resolução A/RES/64/292, declarou que a água de consumo limpa e segura e o saneamento são direitos humanos essenciais para o pleno usufruto da vida e de todos os outros direitos (ONU, 2010, 2011). Assim, deve-se garantir às pessoas água em quantidade suficiente, segura, aceitável, fisicamente acessível e a um preço justo, para uso doméstico e pessoal (ONU, 2011).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), são necessários entre 50 e 100 litros de água diariamente por pessoa para assegurar as necessidades básicas e diminuir problemas de saúde. Além disso, água e instalações sanitárias devem estar disponíveis e acessíveis para todos e não devem exceder 5% da renda familiar. Ademais, a água requerida para o consumo pessoal e doméstico deve ser aceitável quanto ao sabor, odor e cor e ser também segura. Portanto, deve ser livre de microrganismos e substâncias químicas perigosas (ONU, 2011; OMS, 2012). Quando não se verificam essas condições básicas, as pessoas se

confrontam com graves riscos à segurança, causados por más condições de saúde e pela ruptura dos meios de subsistência (ONU, 2006).

Atualmente é estimado que 663 milhões de pessoas no mundo não consomem água potável (ONU, 2015c). Além disso, entre três e quatro bilhões de pessoas não têm disponível em casa, água de torneira limpa e segura (ONU, 2015b). Devido a essa conjuntura, uma criança morre a cada 15 segundos por alguma doença transmitida pela água, a qual tem prevenção (ONU, 2015c).

A problemática da qualidade da água se agrava quando o saneamento dos dejetos não é apropriado. Estima-se que 2,4 bilhões de pessoas não têm instalações sanitárias próprias e adequadas e que 946 milhões praticam defecação a céu aberto. No mundo, cerca de 80% dos resíduos gerados são despejados em corpos de água sem qualquer tratamento. Somente de esgoto humano, dois milhões de toneladas são lançados no ambiente aquático por dia (ONU, 2015c). De acordo com o censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), cerca 85% da população brasileira é abastecida por uma rede geral de distribuição de água. No entanto, apenas 59% têm o esgoto conectado a uma rede coletora (IBGE, 2015a).

A falta de tratamento adequado de dejetos e esgotos leva à contaminação de rios, mares e lençóis freáticos. Diversos tipos de poluentes podem estar presentes no ambiente aquático, como patógenos, químicos sintéticos, matéria orgânica e metais pesados. Todos estes podem causar impactos à saúde, ao ambiente e à economia, comprometendo a qualidade da água utilizada para ingestão, irrigação e higiene (GOMES; EBRARY, 2009; CORCORAN et al., 2010). Acredita-se que cerca de 70% da água que adentra as áreas urbanas já tenha sido utilizada em outras atividades (CORCORAN et al., 2010).

O aperfeiçoamento dos serviços de água e saneamento e suas gestões requerem investimentos. Os custos econômicos, ambientais e sociais, em termos de saúde humana e ambiental devem aumentar drasticamente caso não haja prioridade e urgência em tratar os resíduos despejados na água (CORCORAN et al., 2010). No entanto, desde 1997, a proporção de financiamento mundial alocado para saneamento e água potável diminuiu de 8% para 5% (ONU, 2015b). Em 2010, no Brasil, apenas 0,14% do PIB foi destinado ao saneamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

## **II. A água em áreas remotas e situações emergenciais no Brasil**

Dos 15% da população brasileira que não é abastecida por água tratada a maior parte se encontra em regiões descentralizadas, ou seja, distante dos centros que possuem infraestrutura para o tratamento de água. Em geral, essas pessoas vivem em áreas rurais e em comunidades isoladas, como indígenas, quilombolas e ribeirinhos. Normalmente, esses grupos sociais utilizam águas de poços, rios e lagos para as necessidades diárias, muitas vezes sem qualquer tipo de tratamento. Contudo, devido à constante poluição do ambiente aquático, essas comunidades podem estar expostas a diferentes contaminantes e suscetíveis à possíveis doenças.

Estudos realizados no Brasil, em regiões onde não há serviço de abastecimento de água tratada, apresentam contaminação microbiológica na água de consumo (mananciais e poços). Mais de 90% das amostras de águas provenientes de poços de áreas rurais de Minas Gerais, São Paulo e Nordeste não estavam de acordo com padrões microbiológicos de potabilidade (AMARAL et al., 2003; BARCELLOS et al., 2006). No Paraná, 46% das amostras de poços estavam contaminadas com coliformes totais, sendo 15% coliformes termotolerantes, com prevalências maiores em água de nascentes (NOGUEIRA et al., 2003).

Outras circunstâncias em que a falta da água de consumo de qualidade impacta diretamente a saúde são as situações emergenciais, decorrentes de desastres naturais e danos ambientais ocasionados por ação antrópica. Devido às mudanças climáticas, os dias chuvosos têm diminuído, porém aumentando o volume médio de cada evento de chuva, consequentemente gerando graves inundações (PRATHUMRATANA; STHIANNOPKAO; KIM, 2008). No Brasil, entre 1991 e 2010 ocorreram mais de 10 mil desastres hidrológicos que afetaram diretamente cerca de 39 milhões de pessoas (CEPED, 2012). A Região Sul do Brasil tem sido frequentemente acometida por inundações e enxurradas, afetando principalmente os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, que alcançaram, durante o ano de 2015, índices de 20% acima da média histórica de chuvas dos últimos 10 anos (EPAGRI-CIRAM, 2015).

Ação antrópica ao meio ambiente são recorrentes e costumam afetar diretamente a qualidade da água. Dos mais graves acidentes ocorridos nos últimos anos, o mais atual foi o rompimento da barragem de mineração e derramamento de resíduos tóxicos no município de Mariana, em Minas Gerais, em novembro de 2015. Dentre as diversas

consequências sociais, econômicas e ambientais, estão o assoreamento de cursos de água, a interrupção do abastecimento de água e alteração dos padrões de qualidade da água doce, salobra e salgada (IBAMA, 2015). Assim, a população atingida por esse evento tem dificuldades de consumir água potável, muitas vezes sendo obrigadas a utilizar águas contaminadas para as necessidades diárias.

Algumas das principais consequências dos desastres ambientais (antrópicos ou naturais) são a contaminação biológica e química da água para consumo humano e o comprometimento da rede e fontes alternativas de abastecimento de água (OPAS/OMS, 2015). A degradação da água nessas situações acarreta diretamente o aumento de doenças de veiculação hídrica. Assim, é imprescindível uma gestão e mitigação do risco de contaminação, que visem a preservação das fontes de água e o tratamento das águas já comprometidas, principalmente no que diz respeito à água de dessedentação.

### **III. O abastecimento de água de consumo**

#### **i. Normas do tratamento**

A água potável utilizada para consumo humano é, geralmente, proveniente de águas de superfícies, como rios e mananciais. No entanto, essas fontes de água utilizadas para abastecimento possuem diversos contaminantes, dentre eles patógenos humanos e animais (FAWELL, 2003; REYNOLDS; MENA; GERBA, 2008; CORCORAN et al., 2010).

O tratamento de água potável para abastecimento público consiste de uma série de etapas que variam de acordo com os requisitos do fornecimento e da natureza, vulnerabilidade e qualidade da fonte (FAWELL, 2003). Tradicionalmente, as etapas são: (a) proteção da fonte de água; (b) coagulação, floculação e sedimentação; (c) filtração; (d) desinfecção e (e) preservação do sistema de distribuição (LECHEVALLIER; AU, 2004). Portanto, os principais objetivos do tratamento são de ordem estética/organoléptica e sanitária, como remoção de organismos patogênicos e das substâncias químicas que representam riscos à saúde (BRASIL, 2006).

A remoção de patógenos ocorre principalmente no processo de desinfecção, onde há a descontaminação da água, e no processo de filtração, essencial para retirada de cistos e oocistos de protozoários resistentes à desinfecção (REYNOLDS; MENA; GERBA, 2008). De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, um

tratamento eficiente deve ser capaz de remover ou inativar 99,99% (4 logs) dos vírus entéricos presentes na água de consumo (USEPA, 2011).

A segurança da água potável é garantida com base em normas nacionais ou internacionais. No Brasil, a legislação vigente para água de consumo está presente no Anexo XX da Portaria de Consolidação n° 5, do Ministério da Saúde, originária da antiga Portaria n° 2.914 de 2011, e dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Nela estão previstos os padrões dos parâmetros físicos, químicos, radioativos e microbiológicos. Referente aos padrões microbiológicos, a água é considerada potável na ausência de *Escherichia coli*. A presença apenas de coliformes totais não representa uma contaminação no processo de tratamento e distribuição, mas não retrata sobre a potabilidade da água. Além disso, o monitoramento de protozoários é realizado em casos específicos e apenas se recomenda o monitoramento de vírus entéricos nos pontos de captação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A Tabela 1 apresenta alguns dos parâmetros e seus limites máximos estabelecidos pela legislação para a água potável no sistema de distribuição (reservatórios e rede).

**Tabela 1.** Parâmetros de potabilidade da água e seus valores máximos permitidos durante o sistema de distribuição, segundo o Anexo XX da Portaria de Consolidação n° 5 do Ministério da Saúde.

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor Máximo Permitido</b>
Cloro residual livre	0,2mg Até 5 mg/L
Turbidez	Até 5 uT
pH	Entre 6,0 e 9,5
Coliformes totais	Ausência em 100 mL em 95% das amostras
<i>E. coli</i>	Ausência em 100 mL

Fonte: adaptado de MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017.

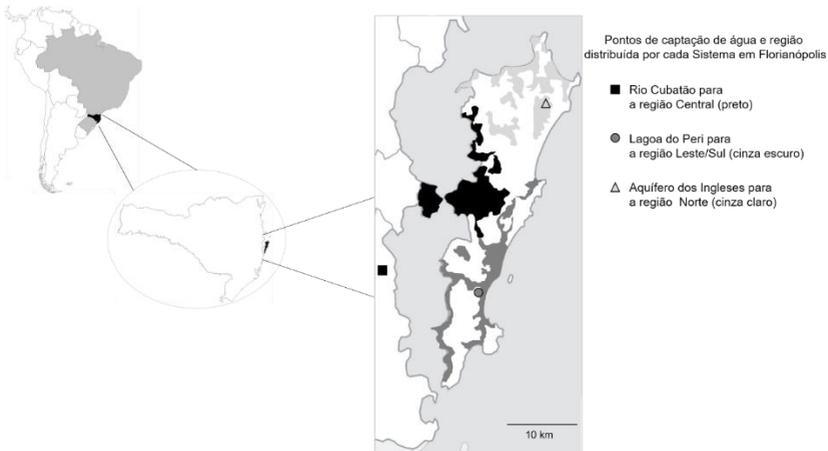
## ii. O abastecimento de água em Florianópolis

No Estado de Santa Catarina, a CASAN (Companhia Catarinense de Águas e Saneamento) abastece com água tratada 196 municípios, beneficiando 96,5% da população urbana. Segundo a empresa, há garantia da qualidade da água fornecida, obedecendo a legislação vigente (CASAN, 2017). No município de Florianópolis há uma demanda de aproximadamente 1.600 L/s de água. Para isso, existem três principais mananciais utilizados para o abastecimento: (a) o dos rios Cubatão do Sul e Vargem do Braço (Pilões), que atendem às

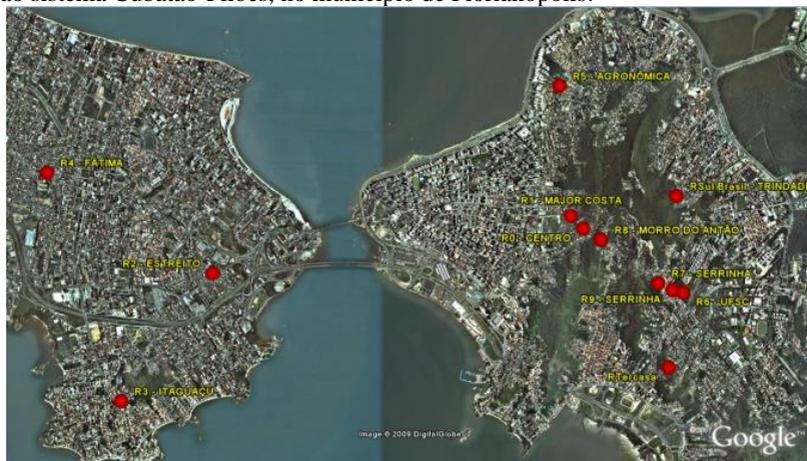
regiões central e continental da cidade; (b) o aquífero sedimentar freático de Ingleses, que abrange o norte da ilha; (c) e a Lagoa do Peri, que abastece a costa leste-sul (PMF, 2010) (Figura 3).

A água retirada do manancial Cubatão-Pilões (Sistema Integrado) é responsável por abastecer 63% da população de Florianópolis, além de outros municípios (ANA, 2010). O tratamento é realizado na Estação Morro dos Quadros, e passa pelas seguintes etapas: (a) condução gravitacional e recalque da água bruta; (b) processo de clarificação, por meio pré-alcalinização com cal, coagulação com sulfato de alumínio e filtração ascendente, para remoção de particulados e matéria orgânica; (c) desinfecção com cloro e fluoretação; (d) correção do pH final; (e) armazenamento em 12 reservatórios em Florianópolis (Figura 4), seguido da distribuição (CASAN, 2015).

**Figura 3.** Localização do município de Florianópolis, pontos de captação e respectivas regiões de abastecimento pela CASAN.



**Figura 4.** Localização dos 12 reservatórios de água para distribuição referentes ao sistema Cubatão-Pilões, no município de Florianópolis.

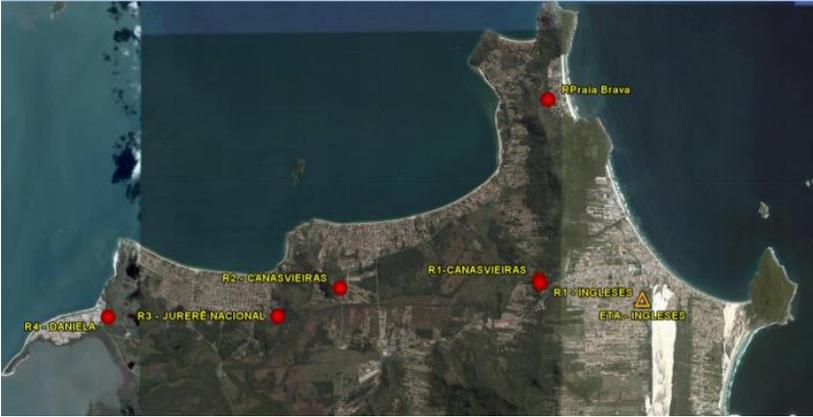


Fonte: Prefeitura Municipal de Florianópolis - PMF, 2010

Na região norte da ilha, o abastecimento de 24% da população do município é proveniente do Aquífero Ingleses (ANA, 2010). A água é captada por meio de 22 poços artesianos localizados no Sítio de Capivari, Distrito dos Ingleses e Rio Vermelho. A partir do recalque, a água é diretamente desinfetada por cloro, fluoretada e passa por correção da acidez (pH). Enfim, segue a seis reservatórios (Figura 5) para posterior distribuição (CASAN, 2015).

Já o sistema Leste-Sul tem uma participação no abastecimento de Florianópolis de 12% da população. A captação é feita da água excedente do manancial superficial da Lagoa do Peri. O processo de tratamento é semelhante ao sistema Cubatão-Pilões. A água tratada e desinfetada é armazenada em cinco reservatórios (Figura 6), seguido da distribuição (CASAN, 2015).

**Figura 5.** Localização dos seis reservatórios de água para distribuição referentes ao sistema Norte, no município de Florianópolis.



Fonte: Prefeitura Municipal de Florianópolis - PMF, 2010

**Figura 6.** Localização dos cinco reservatórios de água para distribuição referentes ao sistema Leste-Sul, no município de Florianópolis.



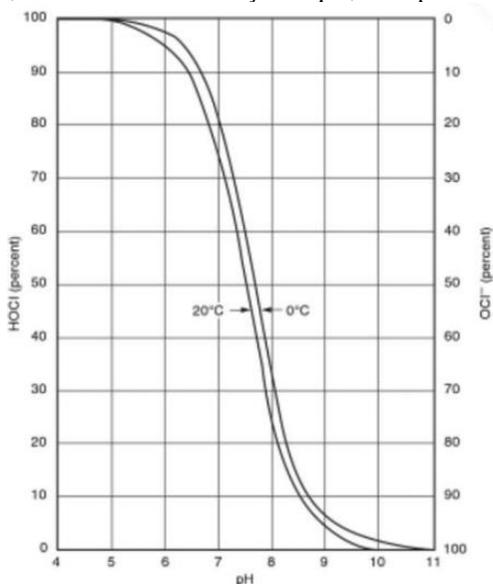
Fonte: Prefeitura Municipal de Florianópolis - PMF, 2010

### iii. O cloro como desinfetante

O cloro é o desinfetante mais frequentemente utilizado para a desinfecção de água, o qual proporciona a inativação de patógenos, além de ser um marcador e conservante da água durante a distribuição (FAWELL, 2003). No Brasil, de acordo com o Anexo XX da Portaria de Consolidação n<sup>o</sup> 5, recomenda-se uma concentração de cloro residual livre na água entre 0,2 e 2,0mg/L durante todo o sistema de abastecimento, mas sendo permitido até 5,0mg/L. A inativação dos microrganismos ocorre pela ação de uma concentração de cloro por um determinado tempo de contato, que varia de acordo com a temperatura e o pH da água (BRASIL, 2006).

A adição de cloro na água permite a formação de ácido hipocloroso (HOCl) e de íon hipoclorito (OCl<sup>-</sup>), conhecidos por serem formas de cloro residual livre (DEGRÉMONT, 1979). A formação dessas moléculas é diretamente relacionada ao pH da água, como demonstrado na Figura 7.

**Figura 7.** Distribuição de ácido hipocloroso (HOCl) e de íon hipoclorito (OCl<sup>-</sup>), em porcentagem, de acordo com a variação de pH, a temperaturas de 0 e 20°C.

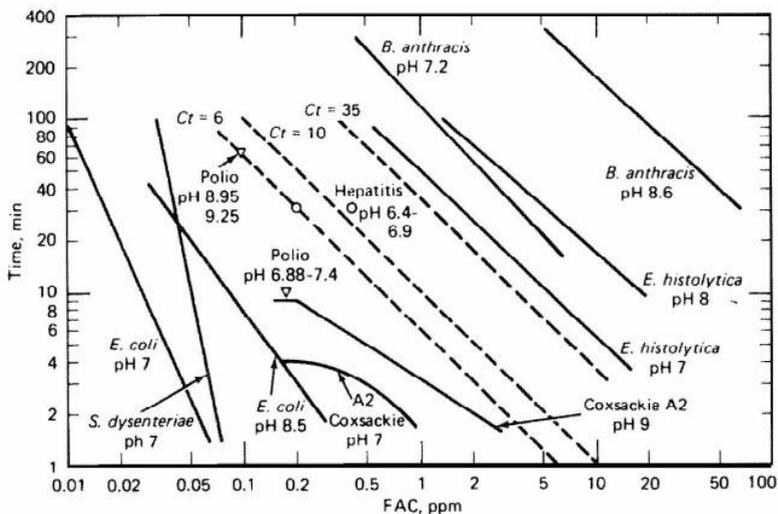


Fonte: DEGRÉMONT, 1979

O HOCl tem, aproximadamente, 100 vezes maior poder de oxidação do que o OCl<sup>-</sup>, apesar de ser consumido em maior taxa. A neutralidade de carga do ácido hipocloroso permite maior facilidade em interagir e penetrar superfícies de carga negativa, como as de bactérias e vírus. Além disso, há uma maior interação com os ácidos nucleicos dos organismos. Essas características asseguram a eficiência superior do HOCl na inativação de patógenos (CHEREMISINOFF, 2002; PAGE; SHISLER; MARINÃS, 2010).

Em geral, em ordem crescente de resistência à desinfecção por cloração apresentam-se as bactérias, os vírus e os cistos e oocistos de protozoários. A Figura 8 apresenta os tempos necessários para a inativação de 99% de diferentes organismos em relação à concentração de cloro residual livre. Nota-se que os vírus requerem maiores concentrações de cloro e/ou tempos de contato para inativação, em relação às bactérias. Ainda assim, algumas bactérias podem ser mais resistentes, principalmente aquelas capazes de esporular e as Gram positivas (LECHEVALLIER; AU, 2004). Da mesma forma, cistos e oocistos de protozoários costumam ser extremamente resistentes à cloração. A Tabela 2 apresenta o fator de tempo de contato e dose de cloro (Ct) recomendados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 2011) para a desinfecção de 99% dos principais patógenos transmitidos pela água.

**Figura 8.** Relação do tempo de contato (min) com a concentração de cloro livre (ppm) para a desinfecção de 99% de diferentes microrganismos.



Fonte: LECHEVALLIER; AU, 2004

**Tabela 2.** Valores de Ct recomendados pela USEPA para a inativação de 99% de bactérias, vírus e cistos de *Giardia*, de acordo com o pH e a temperatura da água.

Microrganismo	pH	Temp. (°C)	Ct <sup>a</sup> (mg.min / L)
<b>Bactérias</b>	7,0	<2	0,08
	8,5	<2	3,3
<b>Vírus</b>	7,0-7,5	<5	12
	7,0-7,5	10	8
	7,0-7,5	0,5	230
<b>Cistos de <i>Giardia</i></b>	7,0-7,5	10	100
	7,0-7,5	25	41

<sup>a</sup> – Ct = concentração de cloro (mg/L) x tempo de contato (min)

Fonte: adaptado de LECHEVALLIER; AU, 2004

O processo de desinfecção de água por cloro é vantajoso pela elevada eficiência na inativação de bactérias e vírus, efeito residual relativamente estável e baixo custo. Ele também reage com substâncias como manganês e ferro, removendo-as da água (OMS, 2016). No entanto, possui algumas desvantagens, como a limitada eficiência na inativação de cistos de protozoários patogênicos e forte odor e sabor quando presente em doses elevadas, além da formação de subprodutos quando em contato com matéria orgânica (VOTANO; PARHAM; HALL, 2004). Alguns desses subprodutos podem alterar propriedades organolépticas, enquanto outros, quando presentes em dosagens acima de determinados níveis, podem causar efeitos adversos à saúde, inclusive câncer e má-formação fetal. (VOTANO; PARHAM; HALL, 2004).

Como geralmente a água é consumida com até 2mg/L de cloro, os efeitos adversos à curto prazo da ingestão direta deste químico são poucos ou inexistentes. Um estudo clínico com homens saudáveis não demonstrou toxicidade ou alterações fisiológicas após ingerirem, por 18 dias, água com concentrações de cloro que aumentavam de 0,1 até 24mg/L (LUBBERS; CHAUHAN; BIANCHINE, 1981). Wones et al. (1993) relataram uma diminuição na produção de hormônios T3 e T4 apenas em homens, após 4 semanas de ingestão diária de 1,5L de água com 20mg/L de cloro. Apesar disso, os autores julgaram não ser representativo e concluíram que não havia impacto do consumo no metabolismo da tireoide.

Quando analisado a exposição a longo prazo, outros estudos relatam efeitos adversos relacionados ao consumo de água clorada. Analisando 46 comunidades em Wisconsin, Estados Unidos, Zeighami, Watson e Craun (1990) demonstraram que os níveis de colesterol e LDL (lipoproteína de baixa densidade) foram maiores em comunidades que consumiam água tratada com cloro (entre 0,2 e 1mg/L). Os autores especularam que o cloro e o cálcio presente na água podem interagir e afetar os níveis de lipídeos. Além disso, Cantor et al. (1987) e Mcgeehin et al. (1993) indicaram que há um aumento no risco de desenvolver câncer de bexiga para adultos que consomem água clorada por mais de 30 anos.

Os trihalometanos (THMs) são os principais subprodutos gerados pela interação do cloro com a matéria orgânica. Eles podem ser ingeridos, como podem também ser inalados e penetrar pela pele, sendo encontrados no sangue e urina de pessoas após o banho com água tratada com cloro (XU; WEISEL, 2005; LEAVENS et al., 2007; RICHARDSON; POSTIGO, 2012). O clorofórmio é o THM mais

comum na água de consumo. Baseado em um adulto de 60kg que consome diariamente dois litros de água, estima-se que a ingestão média de clorofórmio seja de 0,7 µg/kg por dia (OMS, 2004).

A legislação brasileira de água de consumo (Anexo XX da Portaria de Consolidação n.º 5 do Ministério da Saúde) estabelece que a concentração máxima permitida de THMs totais na água de consumo é de 100 µg/L. Entretanto, diversos estudos realizados nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Ceará e Santa Catarina apresentaram concentrações de THMs totais acima do permitido nas águas no sistema de distribuição e na torneira (TOMINAGA; MIDIO, 1999; BUDZIAK; CARASEK, 2007; VIANA et al., 2009; FERREIRA; DA CUNHA, 2012). Em Florianópolis, Budziak e Carazek (2007) quantificaram THMs em amostras de água após a desinfecção com cloro nos três centros de distribuição da CASAN. As do sistema Norte e Cubatão-Pilões apresentaram, em média, 19,4 e 63,0 µg/L de THMs totais, respectivamente. Já a água do sistema Leste-Sul foi a mais preocupante, uma vez que todas as amostras estavam acima do limite estabelecido pela legislação, com média de 152,3 µg/L, mas podendo alcançar níveis até 282,2 µg/L de THMs totais. Na maioria das amostras o clorofórmio foi o THM detectado em maiores concentrações.

Apesar do processo de desinfecção ser bem conhecido e aplicado, o tratamento da água, em si, não garante a manutenção da condição de potabilidade, uma vez que a qualidade da água pode se deteriorar entre o tratamento, a reserva, a distribuição e o consumo (BRASIL, 2006). Uma contaminação microbiológica após a desinfecção pode resultar em riscos para a saúde humana, mesmo se as etapas anteriores de controle forem aplicadas de forma eficaz. Por causa da natureza extensiva do sistema de distribuição, com muitos tubos, tanques de armazenamento, interconexões com as indústrias e do potencial de adulteração e vandalismo, as oportunidades de risco microbiológico ocorrem, mesmo na presença de desinfetante residual (LECHEVALLIER; AU, 2004).

A principal preocupação é com a contaminação a partir de material fecal que possa se acumular perto de tubulações ou contaminar águas superficiais ou o solo (VITANAGE; PAMMINGER; OURTSANIS, 2004). Dentre os principais patógenos presentes em material fecal estão os parasitas protozoários, as bactérias e os vírus. Em vista da possível contaminação do sistema de distribuição, o tratamento adicional pode ser necessário para controlar a qualidade da água tratada e evitar a presença desses patógenos (VITANAGE; PAMMINGER; OURTSANIS, 2004).

#### IV. Alternativas ou complementos à desinfecção por cloro

##### i. A luz ultravioleta

Como alternativa ao tratamento tradicional com cloro está a utilização de luz ultravioleta (UV), uma vez que tem uma grande eficiência na inativação de diversos microrganismos sem a formação de THMs e não gera sabor e odor. Contudo, o tratamento com lâmpada UV não apresenta poder residual, tem eficiência dependente da turbidez e cor da água e um custo mais elevado, o que torna essa alternativa pouco atrativa para sistemas de tratamento de água de consumo para largas proporções (VOTANO; PARHAM; HALL, 2004).

A ação microbicida da luz UV tem maior eficiência a um comprimento de onda próximo de 265 nm, pico máximo de absorção pelos ácidos nucleicos. A luz UV atua no genoma dos microrganismos formando dímeros de timina, inibindo a transcrição e replicação dos ácidos nucleicos, interferindo na replicação dos microrganismos (LECHEVALLIER; AU, 2004). Além disso, a fotocatalise por UV pode causar rompimento de membranas celulares em bactérias e danos em proteínas estruturais dos capsídeos virais (EISCHEID; LINDEN, 2011; PIGEOT-RÉMY et al., 2012). No entanto, os danos no material genético podem ser reparados pelos microrganismos, principalmente aqueles que possuem genoma de DNA dupla fita, utilizando enzimas de reparo das células hospedeiras. Assim, a desinfecção por luz UV deve ser feita com dose relativamente elevada para garantir dano suficiente no genoma que evite o seu reparo (LECHEVALLIER; AU, 2004).

A eficiência da inativação de diversos microrganismos em água por luz UV é bem conhecida. Geralmente, as bactérias são mais susceptíveis a esse tratamento, sendo que para um decaimento de 4 logs (99,99%), as bactérias fecais, como *E. coli* e *Enterococcus faecalis*, requerem doses inferiores a 30 mJ/cm<sup>2</sup>. Nessa mesma dosagem, alguns vírus também são inativados, como norovírus e o vírus da hepatite A. Contudo, outros vírus apenas são inativados quando submetidos a dosagens superiores de luz UV, como os adenovírus, que requerem cerca de 170 mJ/cm<sup>2</sup> para sua completa inativação (LECHEVALLIER; AU, 2004; HIJNEN; BEERENDONK; MEDEMA, 2006). A Tabela 3 apresenta a dosagem aproximada de irradiação UV necessária para inativação de diferentes microrganismos.

**Tabela 3.** Dosagem de luz UV necessária para inativação de 1 a 4 logs para diversos vírus e bactérias.

Inativação microbicida (log)	Dose necessária (mJ/cm <sup>2</sup> )			
	1	2	3	4
Adenovírus	42	83	125	167
Calicivírus canino	10	21	31	41
Rotavírus SA-11	10	20	29	39
Calicivírus felino	9	9	28	38
Coxsackie vírus B5	8	17	25	34
<i>Enterococcus faecalis</i>	9	16	23	30
<i>Legionella pneumophila</i>	8	15	2	30
Poliovírus tipo 1	7	15	22	30
<i>Salmonella typhi</i>	6	12	17	51
Vírus da hepatite A	6	11	17	22
<i>Escherichia coli</i>	5	9	14	19
<i>Campylobacter jejuni</i>	3	7	10	14
<i>Vibrio cholerae</i>	2	4	7	9

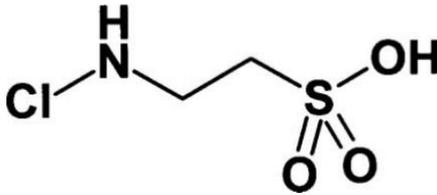
Fonte: adaptado de HIJNEN; BEERENDONK; MEDEMA, 2006

#### ii. Os compostos naturais e sintéticos

Em regiões onde a água é consumida diretamente de mananciais ou em situações emergenciais, o uso do cloro pode ser prejudicial devido à alta concentração de matéria orgânica nessas águas, formando trihalometanos em excesso. Assim, outra alternativa para a desinfecção é o uso de compostos alternativos, podendo ser naturais ou sintéticos. Diversos compostos microbicidas são estudados visando o desenvolvimento de novos medicamentos, porém há pouco conhecimento da ação deles na remediação de água.

Neste contexto, um dos desses compostos com atividade microbicida é a N-clorotaurina (Cl-HN-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub>H, NCT, Figura 9). Ela é um oxidante naturalmente presente em granulócitos e monócitos humanos, originada da reação de compostos N-clorados com o aminoácido taurina. A capacidade de sintetizar a NCT como um sal de sódio (Cl-HN-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub>-Na) possibilitou o avanço nos estudos principalmente utilizando sua solução aquosa a concentração de 1% (p/v), equivalente a 55mM (GOTTARDI; NAGL, 2010; EITZINGER et al., 2013).

**Figura 9.** Estrutura química da N-clorotaurina (NCT).



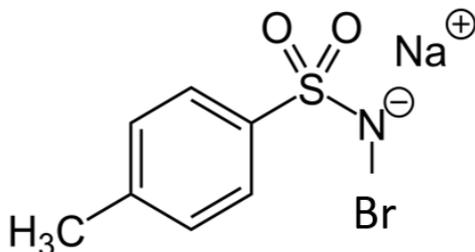
Fonte: Romanoski et al. 2006.

Gottardi e Nagl (2010) reportaram a ação microbicida *in vitro* da NCT a 1% frente a diversos organismos. Em geral as bactérias foram as mais susceptíveis ao tratamento, enquanto fungos e vírus demonstraram ser mais resistentes. Além disso, a NCT apresenta alta tolerabilidade, sendo utilizada em uma diversidade de estudos clínicos (Gottardi e Nagl, 2010).

Outro composto com grande atividade oxidativa capaz de inativar patógenos é o sal de Bromoamina-T ( $[\text{CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_2\text{-N-Br}]^- \text{Na}^+$ , BAT, Figura 10), um análogo sintético da Cloramina-T (N-chloro-4-toluensulfonamide-sodium, CAT). A CAT substituiu a solução de hipoclorito de sódio como desinfetante de feridas durante a Primeira Guerra Mundial, sendo mais estável e causando menos irritabilidade. Tanto a CAT quanto a BAT podem ser formados a partir da reação de grupos aminas juntamente com ácidos hipohalogênicos (HOCl e HOBr, respectivamente) (GOTTARDI; NAGL, 2013; GOTTARDI; KLOTZ; NAGL, 2014).

A vantagem da BAT sobre a CAT e a NCT é ser um composto mais estável, com maior poder oxidativo e ainda apresentar baixa toxicidade. No entanto, poucos estudos de inativação de patógenos utilizando a BAT foram feitos. Em geral, os compostos com bromo são mais eficientes na inativação de bactérias (*E. coli* e *Staphylococcus aureus*) do que os compostos clorados. Em específico, a BAT obteve a mesma eficiência que a CAT no decaimento de bactérias, utilizando concentrações entre 10 e 25 vezes menores (GOTTARDI; KLOTZ; NAGL, 2014; WALCZEWSKA et al., 2017). Até o presente, não há nenhum trabalho relatando a atividade da Bromoamina-T em vírus.

**Figura 10.** Estrutura química do sal de Bromoamina-T (BAT).



Fonte: Estudo não publicado.

Assim como a NCT, a BAT apresenta atividade anti-inflamatória, inibindo citocinas, como TNF- $\alpha$  e interleucinas, *in vitro*. Quando avaliado o índice de biocompatibilidade (relação entre a concentração citotóxica e a concentração necessária para inativação de bactérias) os valores são próximos de 100, sendo que quanto maior, melhor é a relação da atividade bactericida em relação à citotóxica (WALCZEWSKA et al., 2017). Assim, existe um grande potencial de tolerabilidade da BAT a ser explorado.

Outro exemplo de agente microbicida com potencial para a desinfecção de águas é o extrato de semente de uva (GSE). Ele é um subproduto da vinicultura e apresenta uma diversidade de compostos bioativos, como flavonoides, polifenóis e proantocianinas (D'SOUZA, 2014; NASSIRI-ASL; HOSSEINZADEH, 2016). Nassiri-Asl e Hosseinzadeh (2016) compilaram diversos trabalhos realizados que reportaram a atividade antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória e antimicrobiana a partir de extratos da uva (*Vitis vinifera*).

Quanto à atividade antimicrobiana, foi reportado que a GSE inibe o crescimento de diversas bactérias, como *Staphylococcus aureus* e *E. coli*, em concentrações iguais ou superiores a 0,1 mg/mL (0,01% - p/v) (JAYAPRAKASHA; SELVI; SAKARIAH, 2003; AL-HABIB et al., 2010; KAO et al., 2010; ADÁMEZ et al., 2012). Para vírus entéricos, estudos relataram que o norovírus murino, o calicivírus felino, e o vírus da hepatite A tiveram um decaimento de viabilidade utilizando concentrações de GSE entre 0,25 e 2,0 mg/mL (0,025 – 0,2% - p/v) (SU; D'SOUZA 2011, LI et al. 2012). Além disso, testes realizados em ratos e em humanos com a ingestão desse extrato não apresentaram reações adversas ou toxicidade aguda e crônica (BENTIVEGNA; WHITNEY, 2002; YAMAKOSHI et al., 2002; BROWN et al., 2010; SANO, 2017).

De modo aplicado, o único estudo que reporta a ação do GSE em água foi realizado por Li et al. (2012). Neste, foi avaliado a inativação de MNV-1 em água de lavagem de alface e água de torneira, observando cerca de 1 log de decaimento após 1 h de contato com o extrato a 0,02%. Contudo, não há estudos de inativação de adenovírus pelo extrato de semente de uva.

## **V. A população e a água consumida**

A qualidade da água potável e do saneamento são fatores determinantes para a saúde e a gestão destes é a base para a prevenção e o controle de doenças transmitidas pela água (OMS, 2010). Neste cenário, a percepção pública da qualidade da água pode contribuir na melhoria dos serviços e, conseqüentemente, na satisfação dos consumidores (DORIA, 2010). De acordo com a Associação Internacional da Água (AIA, 2004), os padrões de potabilidade da água devem ser baseados na proteção da saúde humana e a aceitabilidade de quem a consome. Devido à capacidade da população de detectar diferenças nas características organolépticas da água, propõe-se que os órgãos de distribuição considerem utilizar os consumidores como vigilantes da qualidade da água (WHELTON et al., 2004; DIETRICH, 2006).

A percepção da qualidade da água pela população é influenciada por diversos fatores fisiológicos, psicológicos e culturais. Esses fatores incluem experiências pessoais e estímulo externos, assim como aspectos organolépticos e o risco à saúde associado ao consumo (DIETRICH, 2006; DORIA, 2010). Elementos contextuais, como sociodemográficos, fonte de captação da água, local onde é consumida e qualidade da rede distribuição, também podem estar associados com a percepção da qualidade da água, bem como o risco. Portanto, tais fatores devem ser considerados ao pretender a melhoria da qualidade da água (DORIA, 2010).

Além disso, estudos demonstram que a percepção de sabor, odor e do risco associado ao consumo da água distribuída são os principais fatores que levam às pessoas comprarem água mineral para consumo e muitas vezes para o cozimento de alimentos (GLEICK, 2004). Em uma comunidade canadense, dentre 1610 pessoas, 27% consomem água engarrafada (JONES et al., 2006a). Outros estudos apresentados por Doria (2006) reportaram que os fatores organolépticos foram a causa para o consumo de água mineral para 7, 71 e 47% dos entrevistados em trabalhos nos Estados Unidos, Canadá e França,

respectivamente. Para esse mesmo público, a saúde e o risco foram a razão para 47, 25 e 23%, respectivamente.

Neste contexto, pesquisas públicas podem fornecer informações primordiais sobre a percepção e satisfação quanto à qualidade da água distribuída nas casas (DORIA, 2010). Diversos estudos no Canadá e países da União Europeia utilizam pesquisas por meio de questionários para coletar informações da população sobre a percepção da água. Em geral, esses trabalhos destacam o sabor e a percepção de risco como fatores determinantes para a avaliação da qualidade e escolha da fonte de consumo de água (TURGEON et al., 2004; DORIA, 2006; JONES et al., 2006b; TALATALA, 2008; DORIA; PIDGEON; HUNTER, 2009). No entanto, no Brasil, pesquisas envolvendo satisfação da população são escassas, pouco representativas e trazem pouca informação sobre a qualidade da água distribuída.

Em um estudo em Quixadá, CE, questionários aplicados em 61 residências demonstraram que 55% consideraram como boa a água do sistema público de abastecimento. Além disso, 75% revelaram pagar por outras fontes de água para consumo (FREITAS et al., 2012). Outro trabalho realizado em três municípios avaliou por meio de 10 entrevistas em cada um e relatou que os consumidores têm dúvidas quanto à qualidade da água distribuída, forçando-os a comprar água engarrafada (DE QUEIROZ et al., 2013). Da Silva et al. (2010) em 40 entrevistas no município de Vitória, ES, concluíram que a maioria (30) considera excelente a água distribuída. Contudo ainda há desconfiança de uma parcela da população quanto à qualidade da água devido ao sabor, cor e material suspenso. Ainda, 50% relataram que a água necessita ser filtrada antes de consumida.

Em Florianópolis, SC, o único estudo que incluía a percepção da qualidade da água foi feito por Cesa, Fongaro e Barardi (2016). Os autores aplicaram questionários em quatro regiões abastecidas primordialmente por Sistema Alternativo Coletivo (SAC) e pela CASAN. Juntamente, investigaram a relação entre o tratamento de água e esgoto com doenças de veiculação hídrica que foram relatadas entre 2002 e 2009. Os autores concluíram que os consumidores da água distribuída pela concessionária têm menos chances de apresentar doenças por ela veiculadas. Ainda, algumas pessoas relataram a intermitência no serviço da concessionária e a qualidade duvidosa da água abastecida (CESA; FONGARO; BARARDI, 2016).

Portanto, para a busca de melhorias na qualidade da água distribuída pelos sistemas de abastecimento, principalmente no Brasil, é necessário primeiramente investigar quão satisfeita a população está

com o recurso que recebe. Além disso, é importante conhecer os motivos que as fazem consumir ou não a água diretamente da torneira. Juntamente a isso, é fundamental a análise dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos, que podem influenciar a avaliação da água pelas pessoas. Combinados, esses esforços podem trazer informações úteis para as companhias responsáveis, para poder distribuir uma água segura para a saúde e que também agrade a população que a consome.

## VI. Doenças de veiculação hídrica

Nas últimas décadas, tem crescido a importância do estudo de patógenos transmitidos pela água. Isso se deve principalmente ao aumento na proporção de pessoas mais susceptíveis (idosos, crianças, imunocomprometidos e gestantes), assim como a evolução natural dos microrganismos adquirindo maior virulência e o uso de métodos moleculares de monitoramento para melhorar os métodos de identificação de surtos e suas fontes (REYNOLDS; MENA; GERBA, 2008).

A diarreia é a doença predominantemente relacionada ao consumo da água, tendo uma incidência anual estimada de 4,6 bilhões de episódios relatados (OMS, 2010). Entre as crianças menores de 5 anos de idade, é a segunda doença que mais causa mortes (UNICEF, 2008). Em 2011, 1,8 milhões de pessoas morreram devido à diarreia provocada por agentes patogênicos, no qual cerca de 430 mil mortes em crianças até 14 anos e 280 mil acima 50 anos (OMS, 2013). Além disso, estima-se que 88% das doenças diarreicas são devido à falta de higiene, saneamento e abastecimento de água inadequados (ONU, 2015c). Estes mesmos fatores são responsáveis por cerca de 25 mil mortes por ano no Brasil (OMS, 2009).

Nos Estados Unidos, entre 1971 e 2006, foram relatados 780 surtos de doenças transmitidas pelo consumo de água. Entre eles, 18% foram causados por parasitas (principalmente *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp.), 16% por bactérias e 8% por vírus (principalmente norovírus e vírus da hepatite A). Falhas nos sistemas de abastecimento público de água foram identificadas na grande maioria dos casos, das quais as deficiências no tratamento e no sistema de distribuição foram responsáveis por 50% dos surtos (CRAUN et al., 2010). Em outro estudo realizado entre 2011 e 2012, 431 surtos foram atribuídos ao consumo de água, sendo 32% causados por vírus (BEER et al., 2015). Isso demonstra que, atualmente, os vírus estão sendo mais frequentemente investigados, aumentando assim suas relações com doenças de veiculação hídrica.

Segundo o IBGE (2010), a cada 100 mil habitantes, 265 são internados por uma doença fecal-oral relacionadas ao saneamento e abastecimento impróprios. Em 2013, o Brasil teve, em média, reportado cerca de 200 internações por diarreias a cada 100 mil habitantes de doenças relacionadas ao saneamento inadequado (BRASIL, 2015). Nesse mesmo ano, o Estado de Santa Catarina reportou cerca de 90 internações por doenças relacionadas a saneamento inadequado (IBGE 2015b). No município de Florianópolis, um estudo agrupou os dados epidemiológicos entre 2002 e 2009 e constatou que a cada mil habitantes, em média, 50 apresentaram doenças de veiculação hídrica (CESA, 2013).

No Brasil, as informações em saúde são obtidas principalmente pelos Sistemas Nacionais de Informação em Saúde gerenciados pelo Sistema Único de Saúde. No entanto, muitas doenças infecciosas não são notificáveis, e quando são, a subnotificação é comum. Cerca de 70% das doenças infecciosas e parasitárias registradas em hospitais e clínicas são diagnosticadas como infecções intestinais mal definidas, enquanto o restante aparece como intoxicação alimentar e septicemia, todas sem identificação dos agentes etiológicos (GRISOTTI, 2010).

## VII. Marcadores de contaminação aquática

### i. Coliformes totais e fecais

Por definição, os coliformes pertencem a família Enterobacteriaceae e são bactérias gram negativas, com forma de bastonetes, sem formação de esporos e aeróbicas facultativas. Por estarem presentes naturalmente no trato intestinal de humanos e outros animais, podem ser utilizados como marcadores de contaminação ambiental. A presença dessas bactérias na água, principalmente as do subgrupo de coliformes termotolerantes (ou fecais), como a *Escherichia coli*, indica a contaminação fecal. Dessa forma, são utilizadas pelas agências reguladoras como controle de qualidade da água (ROMPRÉ et al., 2002; MADIGAN et al, 2012).

No entanto, a utilização de coliformes como marcadores de contaminação fecal é contestada. Gruber, Ercumen e Colford (2014), por meio de uma revisão e meta-análise de diversos estudos, não encontraram associação consistente entre doença diarreica e coliformes termotolerantes na água de consumo. Já quando utilizado *E. coli* como marcador de contaminação ambiental, essa relação foi consistente. Entretanto, a presença ou ausência de coliformes, devido ao fato de serem mais suscetíveis às condições adversas do ambiente e aos

processos de tratamento, não está relacionada com os demais patógenos, como os vírus (MADIGAN et al, 2012). Assim, a detecção de *E. coli* pode ser um bom marcador de contaminação por bactérias entéricas, mas não um indicador geral da qualidade da água (MADIGAN et al, 2012; GRUBER; ERCUMEN; COLFORD, 2014).

Existem diversas técnicas capazes de detectar e quantificar os coliformes em amostras ambientais. Utilizando meios seletivos e baseados no metabolismo dessas bactérias é possível identificar coliformes totais e *E. coli*. Esta é a única do grupo que possui a enzima  $\beta$ -glucuronidase, a qual metaboliza o substrato  $\beta$ -D-glucuronide (IBDG) para um composto azul, visível sob luz UV. Assim, alguns testes comerciais foram produzidos para detecção e quantificação dessas bactérias, baseados em seus metabolismos específicos (MADIGAN et al, 2012).

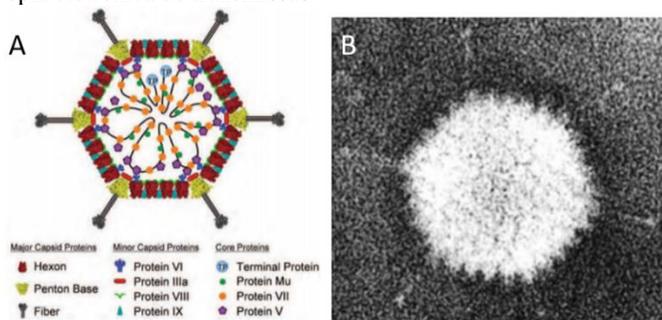
## ii. Vírus entéricos

Dentre os microrganismos transmitidos pela via fecal-oral, os vírus entéricos humanos são causadores de diversas doenças, como gastroenterites, hepatites e conjuntivites. Alguns deles também estão relacionados com algumas doenças crônicas, como diabetes e síndrome da fadiga crônica. Os vírus entéricos mais prevalentes e que são transmitidos ao homem são os vírus da hepatite A e E, norovírus, enterovírus, poliomavírus e adenovírus. Pessoas infectadas podem excretar de  $10^5$  a  $10^{11}$  partículas virais por grama de fezes, mesmo na ausência de sintomas. Além disso, esses vírus possuem baixa dose infecciosa, podendo causar infecção pela ingestão de 10 a 100 vírions. Apesar da exposição por alguns vírus entéricos nos primeiros anos de vida poder evocar imunidade contra novas infecções, isso não vale para todos eles. Diferenças sorotípicas e genotípicas nos vírus fazem com que a imunidade evocada não seja protetora para todos além de sempre constituírem um fator de risco para pacientes imunocomprometidos, gestantes, crianças e idosos (LA ROSA et al., 2012; ASHBOLT, 2004, 2015).

Os adenovírus humanos (AdV) pertencem a família Adenoviridae, gênero *Mastadenovirus*, o qual contém 56 tipos, divididos em 7 espécies (A a G). São vírus de aproximadamente 90 nm, não envelopados, com capsídeo de formato icosaédrico, de 252 capsômeros, sendo estes compostos por 240 *hexons* e 12 *pentons* (Figura 11). Em cada *penton* há a projeção de uma ou duas fibras, que apresentam grande importância na adsorção à célula hospedeira. Possuem genoma de DNA dupla fita com tamanho que varia entre 26 e

45 Kb. As infecções por adenovírus podem gerar diversas enfermidades, desde inflamações no trato respiratório até gastroenterites (WOLD; ISON, 2013).

**Figura 11.** Estrutura do adenovírus humano: (A) desenho esquemático e (B) microscopia eletrônica de transmissão.



Fonte: WOLD; ISON, 2013

Os adenovírus figuram como a segunda principal causa de doenças respiratórias e gastroenterites em crianças, sendo que diversos surtos dessas doenças foram relatados em hospitais e creches (SHIMIZU et al., 2007; MENA; GERBA, 2008; LANDRY et al., 2009; ERSOY et al., 2012; RAMES et al., 2016;). Além disso, um surto de pneumonia no Alasca foi relacionado com a infecção por adenovírus do sorotipo 14 em crianças e adultos (ESPOSITO et al., 2010).

Os adenovírus são resistentes a alterações térmicas do ambiente bem como à radiação solar. O DNA de dupla fita, que compreende o genoma do vírus, também proporciona uma maior estabilidade do vírus no ambiente. Além disso, os adenovírus utilizam enzimas de reparo das células hospedeiras para restaurar o DNA danificado, podendo prolongar a sua sobrevivência e aumentar sua resistência à inativação por luz UV (REYNOLDS; MENA; GERBA, 2008). Devido a sua grande resistência, os adenovírus têm sido utilizados para avaliar a eficiência de alguns tipos de tratamentos em diferentes matrizes ambientais, sendo também indicados por alguns autores como marcadores virais de contaminação (BOFILL-MAS et al., 2013; CARRATALÀ et al., 2013; FONGARO et al., 2014; RAMES et al., 2016).

Uma das vantagens em utilizar o adenovírus humano como indicador de contaminação ambiental é a diversidade de técnicas passíveis de detectá-lo. Metodologias moleculares, como PCR

quantitativas (qPCR), são amplamente empregadas devido a maior sensibilidade e rapidez dos resultados (FONGARO et al., 2014; RAMES et al., 2016). No entanto, o seu emprego na detecção em amostras ambientais e estudos de desinfecção é controverso, pois não é possível aferir a viabilidade do adenovírus. Para isso, técnicas que utilizam infecção celular *in vitro* são necessárias para quantificar os vírus viáveis (BOSCH et al., 2008; BAERT; DEBEVERE; UYTENDAELE, 2009; RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2012; FONGARO et al., 2014).

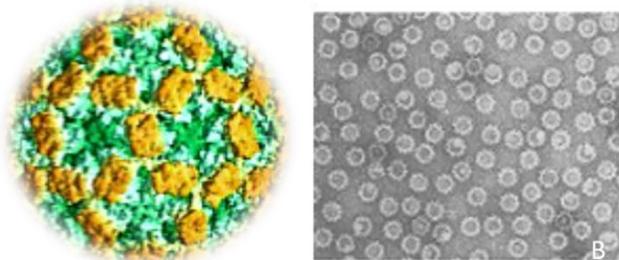
O ensaio mais utilizado para a detecção de adenovírus viáveis é o de placa de lise. As placas são halos de lise celular observados na monocamada de células após fixação e coloração, causados pela replicação viral e lise celular podendo levar até sete dias para serem contabilizados (CROMEANS et al., 2008). Porém, novos estudos utilizam técnicas alternativas para mensurar a viabilidade de adenovírus, como os que integram infecção celular e qPCR (ICC-RT-qPCR) e os que fazem uso de adenovírus recombinante que expressam a proteína verde fluorescente (rAdV-GFP) em trabalhos de desinfecção (FONGARO et al., 2013, 2014; GARCIA; NASCIMENTO; BARARDI, 2015; RAMES et al., 2016).

Os norovírus humanos (NoV) pertencem à família Caliciviridae, gênero *Norovirus*. São vírus de genoma RNA fita simples de senso positivo linear, com tamanho aproximado de 7,5 Kb. Seu genoma é envolto por um capsídeo icosaédrico contendo 180 cópias da proteína estrutural VP1, organizada em 90 dímeros, e algumas cópias da proteína VP2. Possuem um diâmetro aproximado de 30 nm e são desprovidos de envelope lipídico (Figura 12). Estão divididos em cinco genogrupos (GI-GV), com base na identidade de aminoácidos da proteína estrutural principal VP1, sendo GI, GII e GIV os genogrupos que infectam humanos. São os principais agentes causadores de gastroenterites não bacterianas, sendo diarreia e vômito as manifestações clínicas mais frequentes (GREEN, 2013). Como os demais vírus entéricos, por não possuírem envelope, podem resistir a condições adversas no ambiente, como variações de temperatura e ação do cloro na água (LA ROSA et al., 2012)

Surtos têm sido frequentemente relatados em ambientes coletivos (asilos, hospitais, creches, navios de cruzeiro), onde o controle de NoV é dificultado devido à transmissão eficiente de pessoa a pessoa, bem como a resistência do vírus aos agentes de limpeza comumente utilizados. Apesar de ser tipicamente uma doença de curta duração, casos de mortes têm sido reportados em populações vulneráveis, como

pessoas imunocomprometidas, idosos e crianças (LA ROSA et al., 2012; CDC, 2011).

**Figura 12.** Estrutura do norovírus humano: (A) desenho esquemático e (B) microscopia eletrônica de transmissão.



Fonte: GREEN, 2013

Para estudos de desinfecção, o norovírus murino (MNV-1) tem sido amplamente utilizado como substituto ao norovírus humano, pois pertence à mesma família e gênero e apresenta grande semelhança estrutural e na via de transmissão (CANNON et al., 2006). É capaz de infectar *in vitro* a linhagem celular de macrófago murino RAW264.7, causando efeito citopático em aproximadamente 36 h. O ensaio de placa de lise está bem padronizado, fornecendo informações sobre a viabilidade viral em apenas 48 h (PREDMORE; LI, 2011; GONZALEZ-HERNANDEZ, CUNHA, WOBUS, 2012).

Diante do exposto, se faz necessário compreender como os consumidores percebem e avaliam a água de consumo distribuída em casa e se há uma relação com a real qualidade da água que é oferecida. Além disso, é importante investigar novas e seguras alternativas de desinfecção de água, principalmente para se aplicar em escalas descentralizadas, como em áreas rurais e situações emergenciais.

## **OBJETIVO GERAL**

Avaliar a satisfação dos consumidores e a qualidade físico-química e microbiológica da água consumida em Florianópolis, SC, bem como desenvolver alternativas que visem a melhoria da qualidade da água de consumo em domicílios e em escala descentralizada.

## **CAPÍTULO 1**

# **AVALIAÇÃO DA PERCEPÇÃO PÚBLICA E DA QUALIDADE DA ÁGUA DISTRIBUÍDA EM FLORIANÓPOLIS, SC**

## 1.1 Hipóteses

As hipóteses deste capítulo foram:

- a. Existe uma insatisfação pública referente à qualidade da água distribuída em Florianópolis, que varia de acordo com a fonte e distância da fonte de captação, e que piora na estação do verão;
- b. Há uma relação entre a insatisfação pública quanto à qualidade da água e o fato da água não atender aos padrões estabelecidos pela legislação vigente;

## 1.2 Objetivos específicos

- c. Realizar inquérito, para determinar a satisfação e percepção da população de Florianópolis quanto à água de consumo distribuída;
- d. Avaliar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos da água de consumo em creches municipais de Florianópolis nos períodos de verão e inverno;

## 1.3 Material e métodos

### 1.3.1 Inquérito populacional

Com o objetivo de identificar a fonte da água consumida, percepções organolépticas da população referente à água distribuída e possíveis doenças relacionadas ao consumo de água, foi realizado um inquérito com adultos a partir de 18 anos de idade residentes em Florianópolis. Para isso, foram selecionados seis bairros para aplicação de questionários, representando as três diferentes estações de tratamento e a distância até elas. Assim, dois bairros foram selecionados por região (Central, Leste/Sul e Norte) (Figura 3), sendo um bairro dentro do raio mais proximal em relação à fonte de abastecimento e outro no raio mais distal. Para a região a Central os bairros selecionados estavam a aproximadamente 15 e 25 Km de distância da respectiva ETA. Já para a região Leste/Sul, estavam a 3 e 19 Km, enquanto que na região Norte os bairros selecionados estavam a 2 e 10 Km de distância da respectiva ETA.

Antes do início do inquérito, o projeto e o questionário foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC) (número 33243014.1.0000.0121 – Anexo A). A coleta de dados foi realizada nos meses de setembro a novembro de 2015.

Para o cálculo do tamanho amostral, foi utilizada a fórmula descrita por Pocock (1983) para desfechos binomiais, visto que os

desfechos são dicotômicos (satisfeitos ou não satisfeitos – ver item 1.3.7):

$$n = \frac{(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 \times [p \times (1-p) + q \times (1-q)]}{(p - q)^2}$$

p = prevalência esperada do desfecho no grupo 1

q = prevalência esperada do desfecho no grupo 2

$z_{\alpha}$  = escore z do erro tipo 1

$z_{\beta}$  = escore z do poder

Assumiu-se 5% de erro tipo 1 ( $z_{\alpha} = 1,96$ ), bicaudal, e poder de 80% ( $z_{\beta} = 0,841$ ). Como a probabilidade do desfecho esperado (p) era desconhecida, atribuiu-se o valor de 0,5. Consideram-se relevantes diferenças a partir de 15 pontos percentuais, o que resultou em um valor “q” de 0,35. Dessa forma, obteve-se o tamanho amostral de 167 residências por grupo, totalizando 501 casas, 84 por cada bairro.

Devido à estratégia primária de abordagem para participação na pesquisa ter sido via postal (mais detalhes a seguir), cuja taxa de resposta costuma ser inferior a 50%, o tamanho amostral foi acrescido em aproximadamente 160% (n = 220 por bairro). Isto permitiu garantir a quantidade necessária de residências, mesmo havendo altas taxas de perdas e recusas.

Inicialmente, as ruas foram selecionadas visando abranger a maior área possível dos bairros designados. Em cada rua, foram visitadas todas as casas que aparentavam estar habitáveis e que não faziam parte de um condomínio predial (ou seja, apenas um ponto de recebimento de água para mais de uma unidade habitacional).

Um questionário foi produzido para coleta dos dados, com a finalidade de coletar informações sobre a fonte de água utilizada para beber, qualidade geral da água distribuída e percepções organolépticas e de segurança relativas à água. Além disso, o questionário continha perguntas sobre sintomas de gastroenterites e frequência de visita ao médico, para avaliar a subnotificação de casos dessas doenças. Ainda, foram solicitados dados pessoais e sociodemográficos para possíveis ajustes nas análises. Um estudo piloto com uma amostra não participante do inquérito foi realizado para verificar a reprodutibilidade e possíveis erros na formatação, sendo ajustados no questionário que foi aplicado no inquérito (Anexo B).

Cada questionário foi entregue em envelope que continha também uma folha com a explicação da pesquisa, assim como os termos

de consentimento para serem assinados (Anexo C), dos quais uma cópia ficava com o participante e outra com o pesquisador. Para a coleta de dados foram utilizadas duas estratégias: distribuição aos moradores ou na caixa postal das casas, para posterior recolhimento, e aplicação dos questionários em forma de entrevista. No caso de posterior recolhimento, foram realizadas ao menos três tentativas de coleta, preferencialmente em períodos distintos (matutino, vespertino e noturno). A coleta de dados foi realizada entre os meses de setembro e novembro de 2015.

### 1.3.2 Avaliação de água de consumo em Florianópolis

#### A. Coletas de água de consumo

Para avaliar a qualidade da água de consumo que é distribuída em Florianópolis foram selecionadas creches municipais para a realização das coletas, representando as três diferentes estações de tratamento e a distância até elas. Sendo assim, duas creches foram selecionadas para cada distância da fonte (próximo e distante), totalizando quatro creches por região (Central, Norte e Leste/Sul), sendo 12 creches o número final de pontos de coletas. As coletas de água foram autorizadas pela Gerência de Formação Permanente da Prefeitura Municipal de Florianópolis.

As coletas se sucederam em três semanas consecutivas, sendo realizada uma região por dia. Foram feitas duas campanhas de coletas, sendo uma na estação do verão (março de 2016) e outra na estação do inverno (agosto de 2016). Devido à exigência da Prefeitura a água foi coletada previamente ao filtro de entrada das creches.

Primeiramente, foi deixado escoar cerca de 5 L de água para descartar a água estocada no encanamento. Em seguida foi realizada a medição de cloro residual livre com instrumento portátil (HI96711C - Hanna Instruments). Amostras de 10L de água foram coletadas em galões com tampa, previamente higienizados, e determinado o pH (PH-1700 - Instrutherm). Foi adicionado à amostra 10 mL de tiosulfato de sódio 5% para quelar o cloro residual livre. O transporte da amostra foi realizado em temperatura ambiente para as demais análises laboratoriais.

De cada amostra, 100 mL foram utilizados para a análise imediata de coliformes totais e *E. coli* por meio do *kit* Aquateste (Laborclin) e 50 mL foram utilizados para análise de turbidez (Turbidímetro Plus Miroprocessado - Alfakit). Para a análise viral, os 10 L de água foram submetidos à concentração viral por floculação, como descrito no item 1.2.3, e os 10 mL do eluato final foram armazenados a 4°C por no máximo 5 dias.

### B. Avaliação da presença de coliformes totais e fecais

Para a análise de coliformes totais e fecais foi utilizado o *kit* Aquatest (Laborclin) seguindo as instruções do fabricante. Para isso, 100 mL de cada amostra foram depositadas em um frasco, sobre o qual foi dissolvido o substrato disponível no *kit*. Os frascos foram incubados a 37°C e observados após 24h. A alteração de cor do meio indica a presença de coliformes totais e a presença de fluorescência sob luz UV indica a presença de *E. coli* (Figura 13).

**Figura 13.** Modelo dos frascos para análise de coliformes totais e *Escherichia coli* em amostras de água. Colorações transparente, amarelada e fluorescente correspondem às amostras negativas, positivas para coliformes totais e positivas para *E. coli*, respectivamente.



Fonte: MADIGAN et al, 2012

### C. Detecção de adenovírus humano

Para a detecção de adenovírus humano foi realizado o ensaio de viabilidade por meio de placa de lise (item 1.3.5). As amostras foram preparadas em diluições não citotóxicas (item 1.3.4) e, em seguida, filtradas em membranas de 0,22 µm para eliminar fungos e bactérias e evitar contaminação durante os sete dias de incubação.

Para cada dia de coleta uma amostra de 10L foi selecionada para ser artificialmente contaminada com  $2 \times 10^6$  UFP (Unidade Formadora de Placas) de norovírus murino (MNV-1), sendo utilizada como controle de recuperação no processo de concentração. Essas amostras foram analisadas quanto à viabilidade viral por ensaio de placa de lise (item 1.2.5). Os resultados obtidos foram utilizados para calcular a eficiência de recuperação viral por meio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de recuperação} = \frac{\text{título viral inoculado antes da concentração} \times 100}{\text{título viral inoculado após a concentração}}$$

A porcentagem média de norovírus viáveis recuperados, por placa de lise, foi de 27%.

### 1.3.3 Método de concentração viral de amostras de água

A metodologia empregada para a concentração da água baseou-se no protocolo estabelecido por Calgua et al. (2008, 2013), com algumas modificações. Este método consiste na concentração de vírus presentes em 10 L de água doce até o volume de 10 mL, por meio da interação dos vírus presentes nas amostras com uma solução de leite desnatado acidificado e floculado.

À amostra de 10 L de água foi adicionada de 5g de Sal Marinho Artificial (Sigma) e acidificada com HCl 5 N até o pH 3,5. Em seguida realizou-se a adição de 10 mL de uma solução de 1% de leite desnatado (Pre-flocculated Skimmed Milk – Sigma) acidificado (pH 3,5), preparado em água destilada com 1% de Sal Marinho Artificial. Essa solução acidificada permite a formação de flocos de leite, levando à adsorção dos vírus presentes na água. Após 8 h de agitação, a amostra permaneceu mais 8h em repouso para sedimentação dos flocos com os vírus adsorvidos. Em seguida foi retirado cerca de 9,5 L do sobrenadante e o sedimentado foi centrifugado a 3.800 xg por 30 min a 4 °C (Centrífuga Avanti J-30I, Rotor JA-14 - Beckman Coulter). Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em tampão fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2 M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M, 1:2 v/v) e completado até 10 mL. As amostras concentradas foram armazenadas a 4°C por no máximo 5 dias até serem adicionadas às monocamadas de células.

### 1.3.4 Ensaio de citotoxicidade da água concentrada

Este ensaio foi realizado para determinar a menor diluição da amostra de água concentrada a ser utilizada nos ensaios de cultura celular que não apresentasse efeito citotóxico frente às células A549 e RAW264.7.

Para isso, foram preparadas placas de 24 cavidades com os cultivos celulares de A549 e RAW264.7 em quantidades de  $3 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  por cavidade, respectivamente. Após 24h, o meio de cultivo foi removido e foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de amostra de água de torneira concentrada (sem a presença dos vírus) pura e diluídas seriadamente em DMEM (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64), sempre com a adição de 1% de PS e 1% de anfotericina B. As placas foram incubadas por 1 h a 37°C sob atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , sendo homogeneizadas a cada 15 min.

Em seguida, as amostras foram aspiradas e foi adicionado meio de manutenção (DMEM suplementado com 2% SFB). As células foram

observadas em microscópio óptico para visualização de alterações morfológicas celulares (efeito citotóxico) durante um período 48 e 168h, para as células RAW264.7 e A549, respectivamente. Após esse período, o sobrenadante foi aspirado e a monocamada de células foi corada com solução de preto de naftaleno para confirmação do efeito citotóxico. A diluição considerada não citotóxica foi a maior diluição na qual não foi observado alteração morfológica das células.

### 1.3.5 Ensaio de placa de lise (UFP) para adenovírus humano

O ensaio de placa de lise para AdV foi selecionada pois permite aferir a viabilidade viral, diferentemente das técnicas moleculares convencionais. Para este ensaio foi utilizado o protocolo estabelecido por Cromeans et al. (2008), utilizando a linhagem celular A549, derivada de epitélio de adenocarcinoma pulmonar humano, as quais foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Rosina Girones Llop do Departamento de Microbiologia da Universidade de Barcelona (Espanha). Esta linhagem foi cultivada em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) com alto teor de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino [(SFB) Gibco] e 1% de solução de piruvato de sódio 100mM (Gibco). As células foram cultivadas em garrafas de cultura celular com tamanho de 180 cm<sup>2</sup> e mantidas em estufa a 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Para os ensaios de placa de lise, as células A549 foram cultivadas em placas de seis cavidades com 6x10<sup>5</sup> células por cavidade. Após 24 h, o meio de cultivo foi removido e adicionado 300 µL de fluido viral em diluições seriadas entre 10<sup>-1</sup> e 10<sup>-7</sup> ou das amostras a serem testadas, sempre em triplicata. As diluições de estoque viral e das amostras foram feitas em meio DMEM acrescido de 1% de solução de antibióticos (PS) e 1% de anfotericina B. As placas foram incubadas por 1 h a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para adsorção viral, sendo gentilmente agitadas a cada 15 min.

Em seguida, o inóculo foi removido e adicionou-se 2,5 mL por cavidade de uma solução de meio DMEM com alto teor de glicose 2X concentrado (suplementado com 4 % de SFB, 5% de MgCl<sub>2</sub> 1M, 2% de piruvato de sódio a 100 mM, 2% PS e 1% de anfotericina B) diluído 1:1 em Bacto<sup>TM</sup>-agar 0,6 % (BD Biosciences). A adição dessa camada de ágar teve por objetivo evitar o espalhamento viral, delimitando os locais onde houve infecção da célula, seguido por replicação viral e lise celular. Após a polimerização do Bacto<sup>TM</sup>-agar, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C, com atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> por sete dias.

Decorrido esse tempo, a camada contendo meio de cultura e Bacto™-agar foi retirada e o tapete celular corado por 5 min com solução de cristal violeta preparado em etanol, diluído cinco vezes em água destilada. Após o corante ser aspirado, as placas de lise foram contadas em microscópio estereoscópio. A estimativa do título viral foi estabelecida em Unidades Formadoras de Placa por mL (UFP/mL) conforme a fórmula a seguir:

$$\text{UFP/mL} = \frac{\text{número de placas contadas} \times \text{recíproca da diluição}}{\text{recíproca do volume inoculado (em mL)}}$$

### 1.3.6 Ensaio de placa de lise (UFP) para norovírus murino

O ensaio de viabilidade para o MNV-1 foi determinado pelo método de placa de lise, como descrito por Gonzalez-Hernandez, Cunha e Wobus (2012), com algumas alterações. Para isso foi utilizada a linhagem celular RAW264.7 originadas de macrófagos murinos (*Mus musculus*), as quais foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Rosina Girones Llop do Departamento de Microbiologia da Universidade de Barcelona (Espanha). O cultivo foi feito em meio DMEM suplementado com 10% SFB, 1% de L-glutamina 200mM (Sigma), 1,5% de sal HEPES 1M (Sigma) e 1% aminoácidos não essenciais 10mM 100X (Sigma). As células foram cultivadas em garrafas de cultura celular com tamanho de 180 cm<sup>2</sup> e mantidas em estufa a 37 °C, sob atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>.

Para os ensaios de placa de lise, as células RAW264.7 foram cultivadas em placas de seis cavidades com 2x10<sup>6</sup> células por cavidade. Após 24 h, o meio de cultivo foi removido e adicionado 300 µL de fluido viral em diluições seriadas entre 10<sup>-1</sup> e 10<sup>-7</sup> ou de amostras a serem testadas, em duplicata. As diluições de estoque viral ou das amostras foram feitas em meio DMEM acrescido de 1% de solução de antibióticos (PS) e 1% de anfotericina B. As placas foram incubadas por 1 h a 37 °C sob atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> para adsorção viral, sendo gentilmente agitadas a cada 15 min.

Em seguida, o inóculo foi removido e adicionou-se 2,5 mL por cavidade de uma solução de meio MEM 2X concentrado [*Minimum Essential Medium*] suplementado com 4% de SFB, 3% de HEPES, 2% de L-glutamina, 2% de aminoácidos não essenciais, 2% de PS e 2% de anfotericina B] diluído 1:1 em agarose de baixo ponto de fusão [Sea Plate (Lonza)] 3%. A adição dessa camada de agar tem por objetivo a delimitação dos locais onde houve replicação viral e lise celular. Após

solidificação da agarose as placas foram mantidas a 37 °C sob atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> por 48 h.

Para visualização e contagem das placas de lise foi adicionado 2 mL de uma solução de vermelho neutro 0,3 % (Sigma), preparado em água destilada e incubado por 2h. Em seguida, o corante foi aspirado e as placas de lise formadas foram contadas em microscópio estereoscópio. A estimativa do título viral foi estabelecida em Unidades Formadoras de Placa por mL (UFP/mL) conforme a fórmula a seguir:

$$\text{UFP/mL} = \frac{\text{número de placas contadas} \times \text{recíproca da diluição}}{\text{recíproca do volume inoculado (em mL)}}$$

### 1.3.7 Análise dos dados

Para a análise do inquérito populacional, primeiramente, os dados foram tabulados utilizando o programa EpiData 3.1, com o método de dupla digitação. A análise descritiva foi feita por meio de frequências absolutas, relativas e intervalos de confiança de 95% para as variáveis qualitativas e média e desvio-padrão para as variáveis quantitativas. Tabelas de contingência foram utilizadas para algumas análises comparativas.

Para a estatística analítica do inquérito, definiram-se como:

- a) Desfechos: qualidade geral, sabor, odor, cor, segurança, ser saudável para a família e custo da água [satisfeito (muito bom ou bom) ou não satisfeito (muito ruim, ruim, nem bom e nem ruim); sabor, odor, cor, segurança, ser saudável para a família piora no verão (sim ou não); sabor, odor, cor e insegurança como motivos para não beber água da torneira (sim ou não);
- b) Exposições: região (Central, Leste/Sul e Norte); distância (perto e longe); interação região-distância;
- c) Variáveis de ajuste: número de quartos na residência; escolaridade; idade; frequência de limpeza da caixa d'água; fonte de água utilizada para beber.

Utilizaram-se regressões logísticas binárias, simples e múltiplas. Esta metodologia foi escolhida pois permite avaliar a associação de um desfecho e sua magnitude entre os grupos, sem a interferência dos fatores de confusão (variáveis de ajuste). Dessa maneira, as variáveis de ajuste são incluídas ao modelo 1 (razão de chance bruta), podendo inserindo a relação da região, da distância e da interação entre elas (modelo 2) e finalmente incorporando as demais variáveis de ajuste (modelo 3), como descrito abaixo.

As variáveis de ajuste foram testadas quanto a sua relação com os desfechos e exposições, e aquelas que apresentaram valor- $p < 0,20$  foram selecionadas para a modelagem múltipla. As variáveis de ajuste foram incluídas no modelo de acordo com método *forward*, sendo inseridas por ordem crescente de valor- $p$ . Permaneceram no modelo final as que foram significativas ( $p < 0,05$ ) ou que reduziram o *beta* das variáveis já presentes no modelo em 10% ou mais.

Os resultados foram apresentados em valores de *odds ratio* (OR – razão de chances) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%). Se  $OR > 1,0$ , a chance de o desfecho ocorrer é maior no grupo avaliado em relação ao grupo de referência; se  $OR < 1,0$ , a chance é menor. Para as análises, a região central e a distância longe da ETA foram tomadas como referência. Isso implica que a OR apresentada entre as regiões está relacionada à distância longe da ETA. O mesmo se aplica quando comparando as distâncias longe e perto da ETA: a OR está relacionada à região Central. Para poder comparar a OR das regiões estabelecendo a distância perto como referência, a OR da região selecionada tem de ser multiplicada pelo valor de interação (região x distância)

Utilizando o atributo de sabor como um exemplo (Tabela 5), para calcular a OR comparando a região Leste/Sul contra a Central utilizando a distância perto da ETA como referência, é necessário multiplicar o correspondente valor de interação (2,90) pela respectiva OR apresentada na região Leste/Sul (0,74), resultando em uma OR de 2,14. O mesmo procedimento necessita ser feito para comparar o efeito da distância em outra região que não a Central. Novamente usando o sabor como exemplo, para calcular a OR comparando as distâncias longe e perto da ETA, dentro da região Leste/Sul, é preciso multiplicar o valor de interação (2,90) pela respectiva OR apresentada para a distância perto da ETA (0,61), resultando em uma OR de 1,77. O IC95% não pode ser calculado dessa mesma maneira, sendo realizado as regressões modelos modificando as categorias de referência para obter os intervalos apropriados.

Para a análise das concentrações de cloro na água coletada nas creches, utilizou-se o teste *t* de Student para amostras dependentes e independentes. Previamente, foi verificada homogeneidade das variâncias (por meio do teste de Levene). Análises de sensibilidade foram conduzidas utilizando os equivalentes testes não paramétricos (Mann-Whitney and Wilcoxon) e os resultados foram similares. Todas as análises foram realizadas no programa IBM SPSS 19.0 e foram considerados significativos valores- $p < 0,05$ .

## 1.4 Resultados

### 1.4.1 Inquérito populacional

#### A. Características gerais da amostra

Para avaliar a satisfação e a percepção pública da água de consumo, um questionário foi aplicado em seis bairros, representando as três diferentes estações de tratamento (Central, Leste/Sul e Norte) e a distância até elas. Foram visitadas 1.298 residências ao total, das quais 581 responderam ao inquérito, representando uma taxa de resposta de 44,8%. A Tabela 4 apresenta a quantidade de residências participantes em cada região, distância da estação de tratamento de água e bairro.

A descrição das principais características sociodemográficas está na Tabela 4. Os dados de renda familiar mensal não foram incluídos devido à baixa quantidade de respostas a esse questionamento, sendo o número de quartos utilizado como *proxy*. A média de idade das pessoas que responderam foi de 50 anos, com desvio-padrão de 15 anos. Infere-se que as pessoas da região Central tinham uma renda mensal maior em relação às demais regiões, uma vez que há mais participantes com ensino superior completo, além de ter mais quartos e mais moradores por residência. A região Leste/Sul e Norte apresentaram distribuição desses parâmetros semelhantes entre si.

Quanto à quantidade de caixas d'água presentes por residência, apenas 1% dos participantes não tinham caixa d'água, todos moradores na região Leste/Sul. A região Central foi onde se teve maior quantidade de pessoas com duas caixas ou mais (60%). Quando perguntados sobre a frequência de limpeza das caixas d'água, apenas 16% limpavam duas ou mais vezes e 30% alegaram não ter realizado a limpeza nos 12 meses prévios à aplicação do questionário. A região Norte foi a que apresentou maior frequência de limpeza, sendo que 82% limpavam ao menos uma vez (Tabela 4).

A respeito da fonte de água utilizada para beber, apenas 7% dos entrevistados ingeriam água diretamente da torneira e 56% consumiam água mineral (engarrafada) (Tabela 4). Inclusive, nas regiões com menor renda (Leste/Sul e Norte) houve um grande consumo de água mineral (63 e 54%, respectivamente). Já na região Central, apesar de a maioria também relatar que bebia água comercial, 44% fazia uso de filtro de água antes de consumir. Das 38 pessoas que bebiam água da torneira, apenas quatro (9%) relataram que ferviam a água antes do consumo. Sobre a quantidade de água ingerida diariamente, a média foi de 6 copos (1,5 L), mas a resposta com maior frequência (20%) foi de 4 copos (1,0 L). Já sobre o tratamento da água, apenas 18% confirmaram conhecer como o processo é realizado pela CASAN.

### B. Motivos relatados para não beber água da torneira

O odor e a cor foram as características que menos foram citadas como motivos para não beber água da torneira, sendo reportados por 30 e 32% da amostra, respectivamente. Já o sabor foi mencionado como motivo para 41% dos participantes. A insegurança em ingerir a água foi o principal motivo relatado, sendo que 75% das pessoas a considerou pouco confiável. A prevalência de cada motivo por região e distância do abastecimento, além da análise das relações entre os fatores, estão apresentados na Tabela 5.

Não houve evidência de associação entre morar perto ou longe da estação de tratamento e relatar o sabor como motivo de não beber água da torneira, para todas as regiões. Entre as pessoas que moravam distante das ETAs, não houve diferença entre os bairros. No entanto, dentre as pessoas que residiam próximas da ETA, as da região Leste/Sul tiveram 2,14 (IC95%: 1,12 – 4,11) vezes a chance de reportar o sabor como motivo, em relação a região Central (Tabela 5).

Dentre os moradores de residências distantes das ETAs, os da região Leste/Sul tiveram 0,32 vezes a chance de relatar o odor como motivo para não beber água da torneira em relação aos das regiões Central (IC95%: 0,15 – 0,70) e Norte (IC95%: 0,15 – 0,68). Quando perto das ETAs, as pessoas das regiões Leste/Sul e Norte tiveram, respectivamente, 2,07 (IC95%: 1,03 – 4,14) e 2,92 (IC95%: 1,47 – 5,80) vezes a chance de reportar o odor como motivo, em relação às da região Central. Além disso, na região Leste/Sul, os moradores próximos da ETA tiveram 3,42 (IC95%: 1,61 – 7,24) vezes a chance de reportar odor como motivo em relação aos que moravam distante. Nas demais regiões, não foi encontrada relação entre distância da ETA e reportar odor como motivo (Tabela 5).

**Tabela 4.** Descrição dos principais dados sociodemográficos, frequência de limpeza da caixa d'água e principal fonte de água utilizada para beber, obtidos por meio de inquérito populacional obtidas nas regiões Central, Leste/Sul e Norte de Florianópolis, SC.

Variáveis	Total (n = 581)		Central (n = 184)		Leste/Sul (n = 201)		Norte (n = 196)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Distância da ETA								
Perto	291	50,1	97	52,7	94	46,8	100	51,0
Longe	290	49,9	87	47,3	107	53,2	96	49,0
Escolaridade								
EF incompleto	37	6,5	5	2,7	8	4,0	24	12,6
EF completo	63	11,0	10	5,5	27	13,6	26	13,6
EM completo	184	32,2	54	29,7	68	34,3	62	32,5
ES completo	287	50,3	113	62,1	95	48,0	79	41,4
Nº de quartos								
1	96	16,9	25	13,7	41	20,9	30	15,7
2	205	36,0	49	26,9	85	43,4	71	37,2
3	197	34,6	69	37,9	55	28,1	73	38,2
4 ou mais	71	12,5	39	21,4	15	7,7	17	8,9
Nº moradores								
1	45	8,0	7	3,9	26	13,3	12	6,4
2	160	28,4	39	21,5	61	31,3	60	31,9
3	162	28,7	56	30,9	53	27,2	53	28,2
4 ou mais	197	34,9	79	43,6	55	28,2	63	33,5

---

 Frequência de limpeza da  
caixa d'água por ano

0	164	30,4	70	39,3	62	34,4	32	17,6
1	288	53,3	90	50,6	82	45,6	116	63,7
2	73	13,5	15	8,4	33	18,3	25	13,7
3 ou mais	15	2,8	3	1,7	3	1,7	9	4,9

 Principal fonte de água  
utilizada para beber

Torneira	38	6,6	7	3,8	16	8,0	15	7,6
Filtro	215	37,1	81	44,0	58	29,2	76	38,8
Mineral	326	56,3	96	52,2	125	62,8	105	53,6

---

EF: Ensino Fundamental. EM: Ensino Médio. ES: Ensino Superior.

**Tabela 5.** Frequência de respostas e análise de regressão logística, por região e distância do abastecimento, referente aos motivos relatados pela população de Florianópolis, SC, para não beber água da torneira.

Variáveis	n (%)	Modelo 1 <sup>a</sup>		Modelo 2 <sup>b</sup>		Modelo 3 <sup>c</sup>	
		OR	IC 95%	OR	IC 95%	OR	IC 95%
<i>Sabor</i>							
Região							
Leste/Sul	81 (45)	1,33	0,87 – 2,03	0,93	0,51 – 1,68	0,74	0,38 – 1,43
Norte	72 (40)	1,10	0,72 – 1,68	0,62	0,34 – 1,16	0,58	0,30 – 1,13
Central	67 (38)	1,00		1,00		1,00	
Distância da ETA							
Perto	116 (44)	1,24	0,88 – 1,75	0,68	0,37 – 1,25	0,61	0,32 – 1,17
Longe	104 (39)	1,00		1,00		1,00	
Região x distância							
<b>Leste/Sul, perto</b>				2,07	0,89 – 4,84	<b>2,90</b>	<b>1,14 – 7,38</b>
Norte, perto				3,02	1,27 – 7,14	3,01	1,21 – 7,46
<i>Odor</i>							
Região							
<b>Leste/Sul</b>	46 (26)	0,97	0,60 – 1,56	0,43	0,21 – 0,87	<b>0,32</b>	<b>0,15 – 0,70</b>
Norte	68 (38)	1,73	1,10 – 2,72	0,94	0,50 – 1,78	0,99	0,51 – 1,93
Central	46 (26)	1,00		1,00		1,00	
Distância da ETA							
Perto	89 (34)	1,42	0,98 – 2,06	0,55	0,28 – 1,09	0,53	0,26 – 1,08
Longe	71 (26)	1,00		1,00		1,00	
Região x distância							
<b>Leste/Sul, perto</b>				4,90	1,85 – 13,00	<b>6,44</b>	<b>2,24 – 18,51</b>
<b>Norte, perto</b>				3,41	1,37 – 8,53	<b>2,94</b>	<b>1,14 – 7,58</b>

*continua*

Variáveis	n (%)	Modelo 1 <sup>a</sup>		Modelo 2 <sup>b</sup>		Modelo 3 <sup>c</sup>	
		OR	IC 95%	OR	IC 95%	OR	IC 95%
<i>Cor</i>							
Região							
<b>Leste/Sul</b>	49 (27)	0,59	0,38 – 0,93	0,40	0,21 – 0,74	<b>0,38</b>	<b>0,20 – 0,73</b>
<b>Norte</b>	56 (31)	0,72	0,47 – 1,12	0,30	0,15 – 0,57	<b>0,30</b>	<b>0,15 – 0,59</b>
Central	68 (39)	1,00		1,00		1,00	
Distância da ETA							
Perto	86 (33)	1,01	0,70 – 1,45	0,44	0,23 – 0,81	0,46	0,24 – 0,86
Longe	87 (32)	1,00		1,00		1,00	
Região x distância							
Leste/Sul, perto				2,26	0,92 – 5,58	1,95	0,77 – 4,96
<b>Norte, perto</b>				5,64	2,29 – 13,89	5,26	<b>2,09 – 13,23</b>
<i>Insegurança</i>							
Região							
Leste/Sul	130 (72)	0,79	0,49 – 1,27	0,66	0,32 – 1,40	0,67	0,31 – 1,44
Norte	138 (77)	1,02	0,62 – 1,68	0,56	0,27 – 1,17	0,58	0,27 – 1,24
Central	135 (77)	1,00		1,00		1,00	
Distância da ETA							
Perto	193 (73)	0,77	0,52 – 1,14	0,48	0,23 – 1,00	0,49	0,23 – 1,03
Longe	210 (78)	1,00		1,00		1,00	
Região x distância							
Leste/Sul, perto				1,27	0,48 – 3,40	1,13	0,41 – 3,08
Norte, perto				3,11	1,13 – 8,57	3,08	1,09 – 8,74

<sup>a</sup>: Modelo bruto. <sup>b</sup>: Modelo contendo Região, Distância e a interação entre ambos. <sup>c</sup>: Modelo 2 ajustado por número de quartos, escolaridade, idade, frequência de limpeza da caixa d'água e fonte de água utilizada para beber.

OR: *odds ratio*. IC 95%: intervalo de confiança de 95%. Interações significativas em **negrito**.

As pessoas das regiões Leste/Sul e Norte apresentaram, respectivamente, 0,38 (IC95%: 0,20 – 0,73) e 0,30 (IC95%: 0,15 – 0,59) vezes a chance de relatar a cor como motivo de não beber água da torneira, em relação às da região Central, quando distantes da ETA. Ainda, os moradores das regiões Central e Norte que moravam perto da ETA tiveram, respectivamente, 0,46 (IC95%: 0,24 – 0,86) e 2,39 (IC95%: 1,23 – 4,64) vezes a chance de reportar a cor como motivo em relação aos que moravam distante (Tabela 5).

Quanto a relatar insegurança como motivo de não beber água da torneira, não foi demonstrada associação entre morar em uma determinada região ou distância da ETA (Tabela 5).

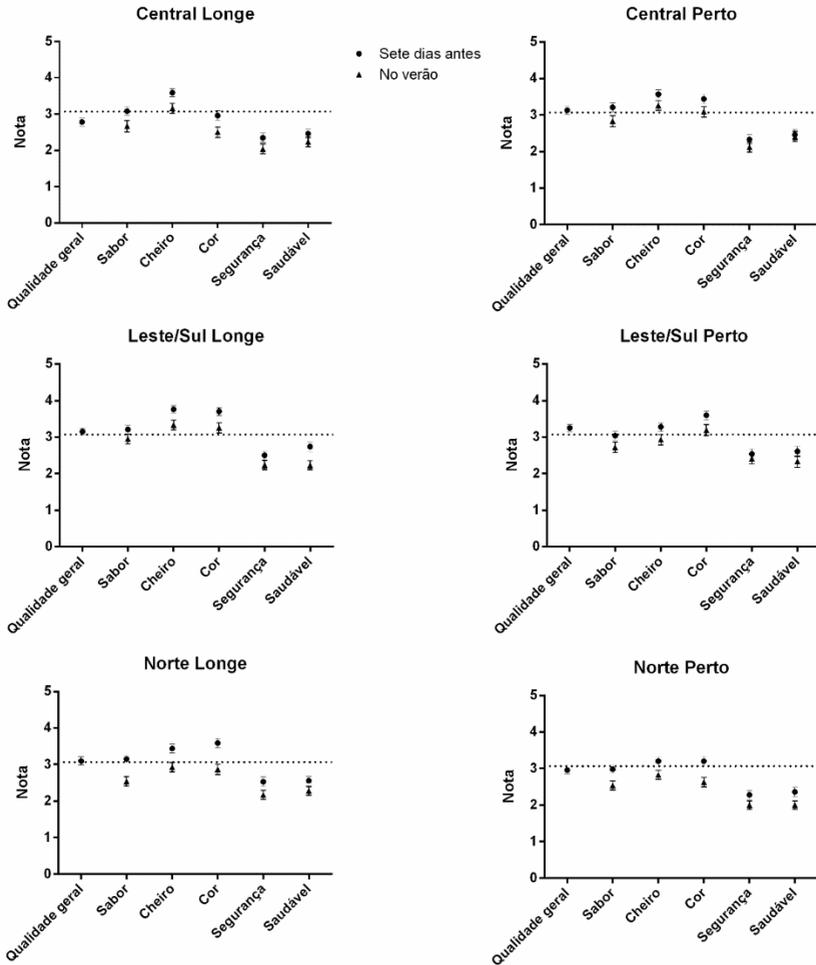
### C. Percepção da qualidade da água

Apenas 39% dos participantes consideram que a qualidade da água abastecida é satisfatória (boa ou muito boa). Quando analisados os atributos separadamente, a cor e o odor foram os que tiveram maior aceitação, com 57 e 52%, respectivamente. Somente 38% consideram o sabor da água de boa qualidade. A aprovação quanto à segurança, a ser saudável para a família e ao custo foi de 21, 25 e 25%, respectivamente.

A média das notas atribuídas para as características em cada bairro, comparada com a média amostral da qualidade geral da água, está exposta na Figura 14. A nota média do inquérito atribuída à qualidade geral da água foi próxima do valor 3 (nem boa, nem ruim), tendo pouca variação entre os bairros onde foi realizado a pesquisa. As médias das notas para o sabor, o odor e a cor da água foram iguais ou maiores que 3 em todos os bairros. No entanto, ao avaliar a água quanto à segurança e a ser saudável para a família, a média das notas foram abaixo da média geral, próximas do valor 2 (ruim).

A Tabela 6 apresenta as frequências de pessoas, por região e distância da fonte de abastecimento, que avaliaram a água como boa ou muito boa (satisfatória) para cada um dos quesitos apresentados. Também exhibe os resultados da análise de regressão logística e as relações entre os fatores.

**Figura 14.** Média das notas atribuídas em cada bairro para a qualidade geral, sabor, odor, segurança, a ser saudável para a família, durante a estação de verão e nos sete dias anteriores ao inquérito, em relação à média amostral da qualidade geral da água (linha pontilhada). Notas em escala Likert (1 – Muito Ruim; 2 – Ruim; 3 – Nem bom, nem ruim; 4 – Bom; 5 – Muito bom)



**Tabela 6.** Frequências de respostas, por região e distância do abastecimento, e análise de regressão logística referente às pessoas de Florianópolis, SC, que avaliaram a água como boa ou muito boa para os quesitos: qualidade geral da água, sabor, odor, cor, segurança, a ser saudável para família e custo.

Variáveis	n (%)	Modelo 1 <sup>a</sup>		Modelo 2 <sup>b</sup>		Modelo 3 <sup>c</sup>	
		OR	IC 95%	OR	IC 95%	OR	IC 95%
<i>Qualidade geral da água (boa ou muito boa)</i>							
Região							
Leste/Sul	83 (43)	1,30	0,86 – 1,97	1,59	0,86 – 2,94	1,36	0,69 – 2,67
Norte	70 (37)	1,01	0,66 – 1,54	1,71	0,91 – 3,21	1,53	0,79 – 2,96
Central	65 (36)	1,00		1,00		1,00	
Distância da ETA							
Perto	117 (41)	1,24	0,88 – 1,74	1,97	1,05 – 3,67	1,80	0,93 – 3,47
Longe	101 (36)	1,00		1,00		1,00	
Região x distância							
Leste/Sul, perto				0,73	0,31 – 1,70	1,03	0,41 – 2,58
Norte, perto				0,37	0,16 – 0,88	0,40	0,16 – 0,99
<i>Sabor (bom ou muito bom)</i>							
Região							
Leste/Sul	62 (40)	0,96	0,59 – 1,56	1,15	0,58 – 2,25		
Norte	54 (34)	0,76	0,46 – 1,24	0,70	0,35 – 1,41		
Central	47 (41)	1,00		1,00			
Distância da ETA							
Perto	77 (36)	0,83	0,56 – 1,22	0,91	0,43 – 1,90		
Longe	86 (40)	1,00		1,00			
Região x distância							
Leste/Sul, perto				0,69	0,26 – 1,84		
Norte, perto				1,16	0,43 – 3,14		

Variáveis	n (%)	Modelo 1 <sup>a</sup>		Modelo 2 <sup>b</sup>		Modelo 3 <sup>c</sup>	
		OR	IC 95%	OR	IC 95%	OR	IC 95%
<i>Odor (bom ou muito bom)</i>							
Região							
Leste/Sul	96 (54)	0,83	0,54 – 1,28	1,17	0,63 – 2,17		
Norte	77 (43)	0,54	0,35 – 0,83	0,62	0,34 – 1,15		
Central	93 (59)	1,00		1,00			
Distância da ETA							
Perto	122 (47)	0,69	0,49 – 0,98	0,96	0,51 – 1,81		
Longe	144 (56)	1,00		1,00			
Região x distância							
Leste/Sul, perto				0,50	0,21 – 1,20		
Norte, perto				0,76	0,32 – 1,82		
<i>Cor (boa ou muito boa)</i>							
Região							
<b>Leste/Sul</b>	119 (62)	1,54	1,01 – 2,34	2,57	1,41 – 4,70	<b>2,12</b>	<b>1,10 – 4,09</b>
<b>Norte</b>	100 (56)	1,19	0,78 – 1,82	2,51	1,34 – 4,67	<b>2,15</b>	<b>1,12 – 4,11</b>
Central	87 (52)	1,00		1,00		1,00	
Distância da ETA							
Perto	150 (56)	0,89	0,63 – 1,25	2,05	1,11 – 3,80	1,90	1,00 – 3,63
Longe	156 (58)	1,00		1,00		1,00	
Região x distância							
Leste/Sul, perto				0,36	0,16 – 0,85	0,46	0,18 – 1,14
<b>Norte, perto</b>				0,24	0,10 – 0,57	<b>0,24</b>	<b>0,10 – 0,59</b>

*continua*

Variáveis	n (%)	Modelo 1 <sup>a</sup>		Modelo 2 <sup>b</sup>		Modelo 3 <sup>c</sup>	
		OR	IC 95%	OR	IC 95%	OR	IC 95%
<i>Segurança (boa ou muito boa)</i>							
Região							
Leste/Sul	42 (23)	1,30	0,77 – 2,19	1,05	0,51 – 2,14		
Norte	38 (22)	1,25	0,73 – 2,13	1,14	0,55 – 2,38		
Central	30 (18)	1,00		1,00			
Distância da ETA							
Perto	51 (20)	0,85	0,56 – 1,30	0,68	0,31 – 1,51		
Longe	59 (22)	1,00		1,00			
Região x distância							
Leste/Sul, perto				1,56	0,54 – 4,47		
Norte, perto				1,21	0,42 – 3,56		
<i>Ser saudável para família (boa ou muito boa)</i>							
Região							
Leste/Sul	52 (30)	1,52	0,92 – 2,50	1,78	0,90 – 3,51		
Norte	38 (22)	1,04	0,62 – 1,76	1,15	0,56 – 2,36		
Central	34 (22)	1,00		1,00			
Distância da ETA							
Perto	54 (22)	0,76	0,51 – 1,14	0,93	0,44 – 2,00		
Longe	70 (27)	1,00		1,00			
Região x distância							
Leste/Sul, perto				0,70	0,26 – 1,92		
Norte, perto				0,82	0,29 – 2,33		

*continua*

Variáveis	n (%)	Modelo 1 <sup>a</sup>		Modelo 2 <sup>b</sup>		Modelo 3 <sup>c</sup>	
		OR	IC 95%	OR	IC 95%	OR	IC 95%
<i>Custo (bom ou muito bom)</i>							
Região							
<b>Leste/Sul</b>	53 (29)	1,25	0,78 – 2,02	0,26	0,12 – 0,56	<b>0,18</b>	<b>0,07 – 0,45</b>
Norte	38 (22)	0,83	0,5 – 1,37	0,45	0,22 – 0,91	0,55	0,26 – 1,17
Central	41 (25)	1,00		1,00		1,00	
Distância da ETA							
<b>Perto</b>	77 (29)	1,54	1,04 – 2,30	0,36	0,17 – 0,76	<b>0,35</b>	<b>0,16 – 0,77</b>
Longe	55 (21)	1,00		1,00		1,00	
Região x distância							
<b>Leste/Sul, perto</b>				19,00	6,57 – 55,01	<b>29,18</b>	<b>8,65 – 98,47</b>
Norte, perto				3,78	1,34 – 10,72	4,10	1,35 – 12,42

<sup>a</sup>: Modelo bruto. <sup>b</sup>: Modelo contendo Região, Distância e a interação entre ambos. <sup>c</sup>: Modelo 2 ajustado por número de quartos, escolaridade, idade, frequência de limpeza da caixa d'água e fonte de água utilizada para beber. OR: *odds ratio*. IC 95%: intervalo de confiança de 95%. Interações significativas em **negrito**.

Dos moradores distantes das ETAs, os da região Leste/Sul e Norte tiveram, respectivamente, 2,12 (IC95%: 1,10 – 4,09) e 2,15 (IC95%: 1,12 – 4,11) vezes a chance de avaliar a cor da água como boa ou muito boa, em relação aos da região Central. Já entre os que moravam perto, os da região Norte tiveram 0,51 (IC95%: 0,27 – 0,98) vezes a chance de considerar a cor satisfatória, em relação aos da região Central. Além disso, na região Norte, os moradores próximos da ETA tiveram 0,45 (IC95%: 0,12 – 0,76) vezes a chance de relatar a cor da água boa ou muito boa, em relação a quem mora distante (Tabela 6).

Dado que a ETA está longe das residências, as pessoas da região Leste/Sul tiveram 0,18 (IC95%: 0,07 – 0,45) vezes a chance de reportar que o custo da água é bom ou muito bom, em relação às da região Central, e 0,32 (IC95%: 0,12 – 0,86) vezes a chance em relação às da região Norte. Enquanto na região Central e Leste/Sul, as pessoas que residiam próximas da ETA tiveram 0,35 (IC95%: 0,16 – 0,77) e 10,15 (IC95%: 4,09 – 25,18) vezes a chance de relatar que o custo é satisfatório, em relação a quem mora distante (Tabela 6).

Não foram encontradas associações entre morar em uma determinada região ou distância da ETA para as notas atribuídas à qualidade geral, sabor, odor, segurança e a ser saudável para a família (Tabela 6).

Quando analisadas as notas atribuídas para as características da água durante a estação do verão, em todos os quesitos houve uma alta frequência de pessoas que consideraram que a água distribuída piorava. Para a cor, sabor e odor, 36, 33 e 30% das pessoas, respectivamente, deixaram de considerar satisfatória essas características durante o verão. Já em relação a segurança e a ser saudável para a família, 22 e 23% dos participantes reportaram piora, respectivamente.

A Figura 14 apresenta a média, por bairro, das notas atribuídas na época de verão comparadas com a dos sete dias anteriores à entrevista, para cada um dos atributos. Para todos, os fatores, houve uma redução da média de notas atribuídas, permanecendo abaixo da média geral na maioria dos casos. A Tabela 7 apresenta as frequências de pessoas, por região e distância da fonte de abastecimento, que reportaram que há uma piora nas características da água na estação do verão. Também exibe os resultados da análise de regressão logística e as relações entre os fatores.

Dentre os moradores distantes das ETAs, os da região Norte tiveram 2,18 (IC95%: 1,09 – 4,36) vezes a chance de relatar que o odor da água é pior no verão, em relação aos da região Central. Além disso, dado que as pessoas estavam distantes da ETA, os da região Norte

tiveram 1,91 (IC95%: 1,00 – 3,65) vezes a chance de relatar que o odor piorava no verão, em relação às da região Leste/Sul.

Os participantes que moravam na região Norte tiveram 2,32 (IC95%: 1,21 – 4,44) vezes a chance de relatar que a cor da água é pior no verão, em relação aos da região Central, dado que estão longe da ETA. Também, entre aqueles que moravam distantes da ETA, os da região Leste/Sul tiveram 0,45 (IC95%: 0,24 – 0,83) vezes a chance de relatar que a cor piorava no verão, em relação aos da região Norte.

Na região Central, os moradores próximos do centro de distribuição tiveram 0,38 (IC95%: 0,14 – 0,98) vezes a chance de reportar piora da água quanto a ser saudável para família, em relação às pessoas que moravam longe. Ainda em relação aos que moravam perto da ETA, as pessoas da região Norte tiveram 3,17 (IC95%: 1,23 – 8,18) vezes a chance de reportar piora da água quanto a ser saudável para a família, em relação aos da região Central (Tabela 7).

Não foram encontradas associações entre morar em uma determinada região ou distância ETA para a piora no verão quanto ao sabor e à segurança (Tabela 7).

**Tabela 7.** Frequências de respostas, por região e distância do abastecimento, e análise de regressão logística referente às pessoas de Florianópolis, SC, que reportaram piora na qualidade da água para os quesitos: sabor, odor, cor, segurança e a ser saudável para família.

Variáveis	n (%)	Modelo 1 <sup>a</sup>		Modelo 2 <sup>b</sup>		Modelo 3 <sup>c</sup>	
		OR	IC 95%	OR	IC 95%	OR	IC 95%
<i>Sabor</i>							
Região							
Leste/Sul	38 (26)	0,83	0,48 – 1,45	0,76	0,35 – 1,64		
Norte	61 (41)	1,62	0,96 – 2,75	1,93	0,91 – 4,06		
Central	32 (30)	1,00		1,00			
Distância da ETA							
Perto	64 (32)	0,91	0,60 – 1,38	0,93	0,41 – 2,14		
Longe	67 (34)	1,00		1,00			
Região x distância							
Leste/Sul, perto				1,20	0,40 – 3,66		
Norte, perto				0,73	0,25 – 2,12		

*continua*

Variáveis	n (%)	Modelo 1 <sup>a</sup>		Modelo 2 <sup>b</sup>		Modelo 3 <sup>c</sup>	
		OR	IC 95%	OR	IC 95%	OR	IC 95%
<i>Odor</i>							
Região							
Leste/Sul	47 (29)	1,26	0,76 – 2,10	1,14	0,56 – 2,33	1,14	0,56 – 2,33
<b>Norte</b>	62 (37)	1,87	1,14 – 3,07	2,18	1,09 – 4,36	<b>2,18</b>	<b>1,09 – 4,36</b>
Central	35 (24)	1,00		1,00		1,00	
Distância da ETA							
Perto	68 (28)	0,83	0,56 – 1,23	0,86	0,40 – 1,85	0,86	0,40 – 1,85
Longe	76 (32)	1,00		1,00		1,00	
Região x distância							
Leste/Sul, perto				1,23	0,44 – 3,40	1,23	0,44 – 3,40
Norte, perto				0,74	0,28 – 2,00	0,74	0,28 – 2,00
<i>Cor</i>							
Região							
Leste/Sul	56 (32)	1,17	0,73 – 1,87	1,04	0,54 – 1,98	1,04	0,54 – 1,98
<b>Norte</b>	77 (46)	2,07	1,31 – 3,29	2,32	1,21 – 4,44	<b>2,32</b>	<b>1,21 – 4,44</b>
Central	44 (29)	1,00		1,00		1,00	
Distância da ETA							
Perto	79 (32)	0,70	0,49 – 1,02	0,67	0,33 – 1,35	0,67	0,33 – 1,35
Longe	98 (40)	1,00		1,00		1,00	
Região x distância							
Leste/Sul, perto				1,27	0,49 – 3,29	1,27	0,49 – 3,29
Norte, perto				0,84	0,33 – 2,14	0,84	0,33 – 2,14

*continua*

								<u>Segurança</u>	
Região									
Leste/Sul	36 (21)	1,09	0,63 – 1,89	1,04	0,50 – 2,17				
Norte	44 (26)	1,47	0,86 – 2,50	1,78	0,87 – 3,67				
Central	29 (20)	1,00		1,00					
Distância da ETA									
Perto	45 (19)	0,66	0,43 – 1,02	0,75	0,33 – 1,69				
Longe	64 (26)	1,00		1,00					
Região x distância									
Leste/Sul, perto				1,09	0,36 – 3,30				
Norte, perto				0,66	0,23 – 1,94				
								<u>Ser saudável para família</u>	
Região									
Leste/Sul	38 (23)	1,42	0,81 – 2,50	1,10	0,54 – 2,25	1,30	0,61 – 2,77		
Norte	44 (27)	1,73	1,00 – 3,01	1,09	0,53 – 2,25	1,15	0,55 – 2,42		
Central	25 (18)	1,00		1,00		1,00			
Distância da ETA									
<b>Perto</b>	45 (20)	0,72	0,46 – 1,11	0,35	0,14 – 0,90	<b>0,38</b>	<b>0,14 – 0,98</b>		
Longe	62 (26)	1,00		1,00		1,00			
Região x distância									
Leste/Sul, perto				1,98	0,60 – 6,56	1,67	0,48 – 5,77		
<b>Norte, perto</b>				3,12	0,97 – 10,05	<b>2,76</b>	<b>0,84 – 9,06</b>		

<sup>a</sup>: Modelo bruto. <sup>b</sup>: Modelo contendo Região, Distância e a interação entre ambos. <sup>c</sup>: Modelo 2 ajustado por número de quartos, escolaridade, idade, frequência de limpeza da caixa d'água e fonte de água utilizada para beber.  
 OR: *odds ratio*. IC 95%: intervalo de confiança de 95%. Interações significativas em **negrito**.

#### D. Notificação de casos de gastroenterites

Almejando detectar as notificações de casos de gastroenterites, foi avaliado o número de pessoas por domicílio que apresentaram sintomas (náuseas, diarreia e vômito) e, quando detectados, aqueles que visitaram um médico. A tabela de contingência abaixo (Tabela 8) cruza os dados da quantidade de questionários que declararam ter pessoas em casa que apresentaram os sintomas referidos e quantos alegaram ter se dirigido ao médico.

No total, 97 pessoas apresentaram os sintomas referidos, sendo 10 crianças menores de 5 anos e 18 pessoas com 60 anos ou mais. Do total, apenas 48 (50%) foram levadas ao médico. Das pessoas que apresentaram sintomas, apenas 9 (9%) bebiam água diretamente da torneira. Ainda em relação a doenças, 93% dos participantes alegaram conhecer que elas podem ser transmitidas pelo consumo de água.

**Tabela 8.** Tabela de contingência da quantidade de questionários respondidos que reportavam o número de pessoas que apresentaram sintomas de gastroenterites (náuseas, diarreia e vômito) na casa e quantas delas foram levadas ao médico.

		Número de pessoas com sintomas levadas ao médico					Total
		0	1	2	3	4	
Número de pessoas com sintomas	1	24	20	0	0	0	44
	2	6	5	4	0	0	15
	3	2	1	0	2	0	5
	4	0	0	0	0	2	2
	Total	32	26	4	2	2	66

#### 1.4.2 Avaliação da qualidade da água em creches municipais

Para avaliar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos da água, foram selecionadas creches municipais que representariam cada região e distância das ETAs. Assim, foi coletado água antes de ser filtrada em 12 creches, por três semanas consecutivas, nas estações do verão e do inverno. Totalizou-se 71 amostras, pois uma das creches estava fechada, por motivo de greve, durante a primeira campanha de coleta do verão. No local de amostragem foram medidos o pH e a concentração de cloro residual livre e, posteriormente, no laboratório foram feitos os procedimentos para análise de turbidez, adenovírus humano, coliformes totais e *E. coli*.

A Tabela 9 exhibe os resultados obtidos no verão para os parâmetros analisados da água que é recebida em cada creche, em

comparação com os limites permitidos pela legislação. Apenas uma amostra não estava em conformidade quanto a turbidez da água (15,98uT), apresentando coloração amarelada e partículas em suspensão.

Já para o pH, somente 34% (12) das amostras estiveram em concordância e as demais estiveram sempre abaixo do limite, chegando até 4,9. Na região Leste/Sul, nenhuma amostra estava conforme à legislação, enquanto nas regiões Central e Norte, 58 e 45% estavam regulares.

Com relação ao cloro residual livre presente na água, 5 amostras (14%), estiveram abaixo do limite estabelecido, todas nas creches que representam a região Leste/Sul, distante da ETA. Quanto aos parâmetros microbiológicos, três amostras (8,6%) foram positivas para coliformes totais, sendo que duas delas foram detectadas na segunda campanha de coleta da região Leste/Sul, distante da fonte de captação, cuja água não apresentava cloro residual. Adenovírus humano viável foi detectado somente em uma amostra (38 UFP/L), também da região Leste/Sul, a qual continha concentração de cloro abaixo do permitido (Tabela 9).

Já a Tabela 10 apresenta os resultados dos parâmetros avaliados nas mesmas creches durante a estação do inverno. Uma alta prevalência de amostras em desconformidade quanto ao pH foi observada (55%). Novamente, todas as amostras da região Leste/Sul estiveram abaixo do limite estabelecido pelo Anexo XX da Portaria de Consolidação n.º 5. Quanto à turbidez, 16% das amostras apresentaram valores superiores ao permitido.

Apenas duas amostras estiveram em desacordo em relação ao cloro residual livre presente na água. No entanto, 55% das amostras foram positivas para coliformes totais, apesar de negativas para *E. coli* e adenovírus humano viáveis. Destaca-se que antes de iniciar a segunda campanha de coleta da região Leste/Sul houve uma forte chuva, sendo possível detectar coliformes totais em todas as posteriores amostragens (Tabela 10).

**Tabela 9.** Parâmetros físico-químicos, coliformes totais, *Escherichia coli* e adenovírus humano viável (HAdV) em água de consumo coletada na estação de verão em creches municipais. Florianópolis, Brasil, março, 2016.

Região	Distância da ETA	Creche	Cloro residual livre (mg.L <sup>-1</sup> )			pH			Turbidez (uT)			Coliformes totais			<i>E. coli</i>			HAdV (UFP/L)		
			Coleta de verão n°																	
			1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Central	Perto	1	3,60	3,60	4,00	5,0	6,7	6,7	0,25	1,19	0,98	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2	2,52	4,00	3,60	5,0	5,9	6,0	1,01	0,55	0,36	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Longe	3	2,99	1,31	4,00	5,0	6,4	6,7	2,16	1,61	1,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		4	3,90	1,99	2,90	5,0	6,6	6,5	1,98	1,74	1,32	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leste/Sul	Perto	5	1,37	2,04	1,69	5,2	4,9	5,2	1,26	2,34	2,45	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		6	2,84	2,48	2,56	5,6	5,1	5,5	1,13	4,22	2,56	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Longe	7	0,06	-	0,08	5,1	5,4	4,9	1,64	1,73	2,40	-	+	-	-	-	-	38	-	-
		8	-	-	0,49	5,2	5,0	5,0	2,13	1,66	2,16	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Norte	Perto	9	1,58	1,65	1,10	5,5	6,4	5,4	1,79	2,38	1,37	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		10	1,35	1,87	1,49	5,2	6,3	5,4	1,35	0,99	>10,0	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Longe	11	NA	1,57	1,07	NA	6,4	5,2	NA	1,57	1,39	NA	-	-	-	-	-	-	-	-
		12	1,67	1,36	1,55	5,5	6,0	5,8	1,13	1,68	1,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Limites da legislação*			0,20 – 5,00			6,0 – 9,5			Abaixo 5,00			Ausência			Ausência			Não existe		

Amostragem realizada em três semana consecutivas (valores das colunas), uma região por dia.

uT: unidade de turbidez; NA: Não amostrado; (-): abaixo do limite de detecção da técnica

\* Anexo XX da Portaria de Consolidação n° 5 do Ministério da Saúde.

**Tabela 10.** Parâmetros físico-químicos, coliformes totais, *Escherichia coli* e adenovírus humano viável (HADV) em água de consumo coletada na estação de inverno em creches municipais. Florianópolis, Brasil, agosto, 2016.

Região	Distância da ETA	Creche	Cloro residual livre (mg.L <sup>-1</sup> )			pH			Turbidez (uT)			Coliformes totais			<i>E. coli</i>			HADV (UFP/L)		
			Coleta de inverno n°																	
			1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Central	Perto	1	1,43	2,23	1,35	7,0	6,1	6,2	0,53	2,38	1,55	-	-	+	-	-	-	-	-	-
		2	2,52	2,01	2,18	6,7	6,6	6,4	1,14	0,66	1,33	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	Longe	3	1,67	2,06	2,53	6,6	6,6	7,0	4,64	2,35	0,96	-	-	+	-	-	-	-	-	-
		4	2,47	2,19	2,77	6,4	6,4	7,1	1,74	1,42	2,24	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Leste/Sul	Perto	5	2,05	2,53	2,85	5,0	5,0	5,2	2,21	3,60	2,48	-	+	+	-	-	-	-	-	-
		6	2,50	2,83	3,15	4,3	4,5	5,1	2,18	4,34	3,09	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	Longe	7	1,16	0,78	1,05	4,8	5,0	5,3	1,86	2,64	2,67	-	+	+	-	-	-	-	-	-
		8	-	0,82	0,91	4,7	4,9	5,1	>10,0	5,66	2,59	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Norte	Perto	9	-	1,20	2,05	6,1	5,3	5,8	7,02	1,25	1,89	-	+	+	-	-	-	-	-	-
		10	1,49	1,16	2,82	6,1	5,4	5,9	0,85	1,22	>10,0	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	Longe	11	1,74	1,33	2,35	6,0	5,0	5,8	1,79	>10,0	0,75	-	+	+	-	-	-	-	-	-
		12	1,62	1,21	0,80	6,2	5,4	5,8	5,41	1,12	1,20	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Limites da legislação*			0,20 – 5,00			6,0 – 9,5			Abaixo 5,00			Ausência			Ausência			Não existe		

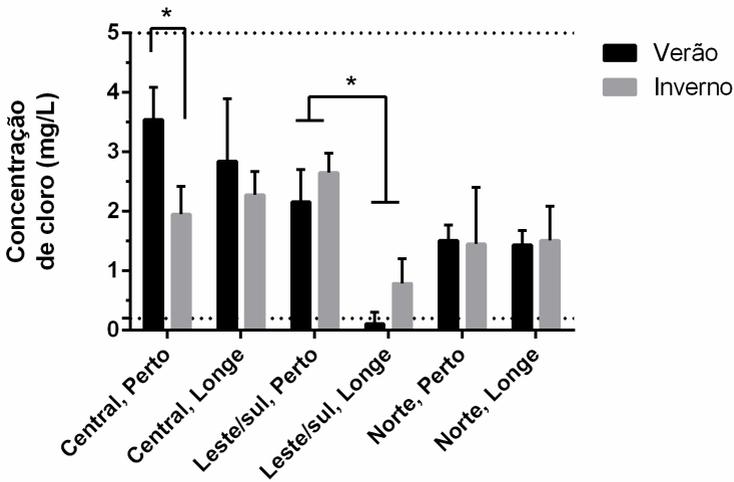
Amostragem realizada em três semana consecutivas (valores das colunas), uma região por dia.

uT: unidade de turbidez; NA: Não amostrado; (-): abaixo do limite de detecção da técnica

\* Anexo XX da Portaria de Consolidação n°5 do Ministério da Saúde.

Em relação à concentração de cloro na água de consumo, durante o verão a região Central apresentou uma maior concentração em relação às demais regiões, com média de 3,20 mg/L. Também na região Central, próximo da ETA houve uma diferença significativa entre a quantidade de cloro entre as estações, sendo maior no verão (Figura 15). Observou-se também uma diferença entre a concentração de cloro dentro da região Leste/Sul, sendo inferior nas amostras avaliadas distante da ETA (Figura 15).

**Figura 15.** Média da concentração de cloro na água de consumo em creches municipais, durante as campanhas de coleta de verão e inverno, distribuído por região e distância das ETAs em Florianópolis, SC, 2016. Linhas pontilhadas representam os limites estabelecidos pela legislação.



\*  $p < 0,01$

Os resultados obtidos neste capítulo foram compilados e submetidos à revista *Water Policy* (Anexo D). O manuscrito foi examinado pelos revisores, que foram prontamente respondidos. No momento aguarda a reavaliação do artigo pelos revisores.

## 1.5 Discussão

Pesquisas públicas podem fornecer informações valiosas sobre a qualidade da água e satisfação populacional. Além disso, podem ser úteis para a compreensão e tomada de decisões pelos setores responsáveis pelo abastecimento, buscando a melhoria do serviço oferecido (DORIA, 2010). Devido à capacidade da população de detectar variações na qualidade da água, propõe-se que os órgãos de distribuição considerem utilizar os consumidores como vigilantes da qualidade da água (WHELTON et al., 2004; DIETRICH, 2006).

No presente trabalho, apenas 39% dos participantes do inquérito reportaram que a qualidade geral da água distribuída era boa ou muito boa. Ou seja, a maioria não demonstrou satisfação com o produto. A aparente falta de qualidade da água de consumo observada pela população deste estudo resulta na baixa avaliação quanto ao custo da água, sendo que apenas 25% reportaram que é bom ou muito bom.

A insatisfação também afeta a frequência de pessoas que bebem a água distribuída. Apenas 7% bebem água diretamente da torneira e a maioria (57%) compram água mineral para consumo (Tabela 4). Em geral, essa insatisfação é devida à falta de segurança, já que apenas 21% dos entrevistados se sentiram seguros no uso e 25% consideraram a água saudável para o consumo familiar. Isto se relaciona com o fato de 75% das pessoas reportarem a insegurança como o principal motivo de não beber água da torneira. Das características organolépticas, o sabor obteve a pior avaliação, com 38% de pessoas satisfeitas com este atributo. Também foi considerado o segundo maior motivo para não beber água da torneira (41%).

Quanto ao odor, apesar de haver uma maior aceitação (média de 52%), dos moradores distantes das ETAs, os da região Leste/Sul tem menos chances de reportar o odor como motivo de não beber a água distribuída, em relação às demais regiões e também em relação aos que moravam na mesma região, mas próximos à ETA (Tabela 5). Isso pode estar relacionado com o fato de as concentrações de cloro nesse bairro estarem abaixo de 0,5 mg/L, chegando até ter valores nulos (Tabelas 9 e 10). Ainda quanto ao odor da água distribuída, os moradores da região Norte têm maior chance de reportá-lo como motivo para não beber a água, além de considerar insatisfatório e que piora no verão, em relação à região Central (Tabelas 5, 6 e 7).

Com relação à cor da água, apesar de ter, em média, a maior apreciação (57%), foi a única dos fatores organolépticos que apresentou relação da satisfação com a região e a distância da fonte. Dentre os moradores que moravam distante da distribuição, os da região Central

tiveram mais chances de apresentar insatisfação em relação aos das demais regiões. Já entre quem morava próximo do centro de distribuição e na região Norte tiveram maior chance de atribuir notas menores do que quem morava distante (Tabela 6). Além disso, de quem morava longe da distribuição, a região Central teve menor chance em reportar a cor como motivo para não beber água da torneira, em relação às demais regiões, no entanto uma maior chance em relação aos que moravam na mesma região, mas próximos da ETA (Tabela 5).

A insatisfação com a qualidade da água distribuída aumenta na estação do verão, sendo que entre 30 e 36% relataram piora nas características sensoriais da água. Tanto para o odor quanto para a cor, das pessoas que moravam distantes das ETAs, as da região Norte relataram com maior frequência que estes atributos pioram no verão, em relação às demais regiões. Devido à grande insatisfação quanto à água ser segura e saudável para a família, estas foram as características que tiveram menor índice de redução de notas referentes ao verão, com 22 e 23%, respectivamente (Tabela 7).

O aumento populacional durante a estação de verão pode estar relacionado com a qualidade da água. A população de Florianópolis chega a mais de um milhão durante o veraneio. Para suprir o abastecimento a todos, o processo de tratamento de água pode ser prejudicado, gerando uma maior insatisfação dos moradores durante essa estação.

Um estudo nos Estados Unidos que avaliou 1754 consumidores de água engarrafada concluiu que 39% têm preferência em relação à água da torneira por causa do gosto, enquanto em outro estudo 34% reportaram que os fatores organolépticos são importantes para a escolha da água para beber. (DIETRICH, 2006). Esses dados corroboram os encontrados no presente trabalho, em que 41% dos entrevistados não bebem água da torneira por causa do sabor. Também, a média das frequências de pessoas que reportaram os fatores organolépticos (sabor, odor e cor) na decisão de não beber água da torneira foi de 34%.

Merkel, Bicking e Sekhar (2012) realizaram entrevistas com pais de escolas nos Estados Unidos, obtendo 135 respostas. Destas, 55 pessoas bebem água diretamente da torneira e outras 81 fazem uso da filtração. Também concluíram que a avaliação da qualidade e da segurança da água estavam acima da média. Contudo, o sabor e a percepção de risco de doenças obtiveram as menores notas atribuídas, assim como no presente trabalho.

Doria, Pidgeon e Hunter (2009) compararam a percepção entre consumidores de Portugal e Reino Unido, com aproximadamente 203

participantes em cada país. Em ambos, a qualidade e os fatores organolépticos obtiveram notas acima da média, sendo a cor melhor avaliada no Reino Unido. Também foi verificado que em Portugal a maioria consome água engarrafada, enquanto no Reino Unido consomem mais a água da torneira.

No Canadá, uma pesquisa avaliou 2009 consumidores distribuídos em quatro cidades, sendo duas abastecidas por água de rio e as outras duas por água de lago. Em média, cerca de 50% tomavam água da torneira e apenas 5% água engarrafada. Os consumidores de água proveniente do rio tiveram cerca 56% de satisfação quanto ao sabor, aproximadamente 20 pontos percentuais a menos daqueles que recebiam água de lago. Dos motivos para não beber água diretamente da torneira, a média foi de 70% por fatores organolépticos. Por meio de regressão logística foi demonstrado que o sabor foi o principal motivo, seguido do risco e fonte de captação (LEVALLOIS; GRONDIN; GINGRAS, 1999). No presente estudo não foi detectado relação entre a qualidade e a fonte da água, no entanto, o sabor foi o principal fator organoléptico para a não ingestão de água da torneira.

Turgeon et al. (2004) compararam a satisfação pública em duas cidades do Canadá com fontes diferentes e a distância da distribuição, utilizando regressão logística. Também foi feita a medição de cloro residual livre, tendo a média se mantido entre 0,5 mg/L nos setores próximos da distribuição e 0,2mg/L nas extremidades. Dessa forma, os autores encontraram uma relação entre a distância, a presença de cloro e a satisfação da água, sendo que os moradores mais próximos tinham uma menor satisfação com o sabor e uma maior percepção de risco.

Destes trabalhos citados, a maioria relata que há segurança pela população em beber água da torneira e que não é o principal motivo para o consumo de água engarrafada. No entanto, o presente estudo demonstrou que 75% dos entrevistados não bebem água da torneira por insegurança e apenas 21% consideram a água segura para o consumo. Esse dado concorda com o realizado no Reino Unido e Portugal, no qual a percepção de risco obteve nota média de 2,2 (em uma escala de 1 a 7) nos dois países.

A constante variação da qualidade da água distribuída faz com que as pessoas não a considerem satisfatória, pois os consumidores são capazes de detectar variações de pH, minerais e matéria orgânica (DIETRICH, 2006). Em Florianópolis, foram detectadas variações de pH, cloro, turbidez e de patógenos na água (Tabela 9). No entanto, é complexo identificar a relação entre os parâmetros físico-químicos e microbiológicos com a percepção pública da água. Isso se deve por

outros fatores, não mensurados nessa pesquisa, como a diferença de composição mineral, química e microbiológica das três diferentes fontes de captação e a qualidade e número de reparos das redes de distribuição de cada sistema. De acordo com Dietrich (2006), em geral, as causas de alterações na percepção pública são agentes químicos e microbiológicos da água no ponto de captação, produtos químicos adicionados ou removidos durante o tratamento e contaminações durante a distribuição.

No Brasil ainda são escassos os estudos de percepção pública e satisfação da água distribuída pelo município. De Queiroz et al. (2013) entrevistaram 10 pessoas que consomem água mineral em três cidades diferentes e reportaram que o sabor foi a principal causa por comprarem água envasada. Outro estudo entrevistou 40 pessoas em quatro bairros, sendo 10 em cada um. Como conclusões dos autores, maioria dos participantes consumiam água filtrada devido a desconfiança quanto ao sabor e a presença de material suspenso. Também relatam que a percepção varia de acordo a qualidade e origem da água (DA SILVA et al., 2010). Freitas et al. (2012) também entrevistaram 61 pessoas em uma comunidade de 3200 habitantes. Os autores reportaram que 52% consideravam a água boa, mas metade não faz uso dela para beber.

Devido às limitações metodológicas e de logística e ao desconhecimento do desfecho esperado, o tamanho amostral do presente estudo permitiu detectar somente diferenças de 15 pontos percentuais entre os grupos. Também, não foi possível fazer inferências para a população total de Florianópolis, pois havia diferenças dos dados sociodemográficos com relação aos do censo de 2010 do IBGE. O método de entrega aos moradores e na caixa postal resulta em menores taxas de resposta do que entrevistas. Ambas consomem maior tempo, além de serem mais laboriosas e caras, em relação às pesquisas por telefone e internet, mas trazem resultados mais precisos, com menos vieses (JONES; BAXTER; KHANDUJA, 2013). Assim, considerou-se o número de 581 respostas satisfatório, sendo superior a outros estudos realizados no Brasil e no mundo. Assim, o presente estudo pode ser utilizado como de base para novas pesquisas.

Das coletas de água realizadas nas creches municipais, a concentração de cloro residual livre foi maior na região Central do que nas demais regiões, principalmente na estação do verão (Tabela 9). Possivelmente, deve-se ao fato de o sistema Central ter a maior rede de distribuição, pois a água é captada e tratada no município da Palhoça. Estima-se que tenha cerca de 15 km até o ponto de coleta mais proximal e 25 km até o ponto mais distal. Assim, é esperado que nos primeiros

bairros após o tratamento e distribuição desse sistema, a concentração de cloro seja ainda mais alta.

As creches mais próximas das ETAs apresentaram um valor maior de cloro do que as creches mais distantes, com exceção da região Norte (Figura 15). Presume-se que essa diferença não foi detectada devido ao fato do sistema Norte ter o menor raio de atendimento em relação às demais regiões, com cerca de 10 km de raio de distância entre a fonte de captação e o ponto mais distal. Já os sistemas Leste/Sul e Central têm cerca de 19 e 25 km, respectivamente, do ponto mais distante de coleta até a respectiva estação de tratamento. Esse dado também pode estar relacionado com o fato de que os moradores próximos do centro de distribuição terem menor chance de avaliar o odor da água como bom ou muito bom, em relação aos que moravam distantes.

As amostras de água que abastecem as creches possuem pH com caráter ácido, sendo mais de 60% delas estando abaixo do permitido pela legislação (Tabelas 9 e 10). Em relação à concentração de cloro, a maioria das amostras esteve em conformidade com a legislação, apesar de algumas estarem acima do recomendado (2mg/L). No entanto sete delas estavam abaixo do limite estabelecido, sendo seis delas na região Leste/Sul, distante do centro de distribuição (Tabela 9).

Três amostras (8%) foram positivas para coliformes totais na estação de verão e 55% no inverno. Ressalta-se que na campanha de inverno as amostras positivas foram observadas após um período de chuva intensa. Além disso, no verão, a creche 7 teve uma amostra positiva para adenovírus, a qual a concentração de cloro era nula, com 38 vírus viáveis por litro de água.

Apenas uma amostra de água foi positiva para adenovírus humano viável. Acredita-se que seja devido às altas concentrações de cloro detectadas juntamente com o pH mais ácido, que favorecem a formação de ácido hipocloroso, o qual tem maior poder e eficiência na desinfecção da água (Figura 7) (CHEREMISINOFF, 2002; PAGE; SHISLER; MARINÃS, 2010). A cinética de inativação de patógenos com cloro em relação ao pH é amplamente estudada e conhecida. Diversos estudos demonstraram a desinfecção de águas de consumo, do mar, residuais e tampões salinos em diferentes faixas de pH, frente aos principais vírus entéricos, como adenovírus e norovírus (THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2003; PAGE; SHISLER; MARIÑAS, 2009; KAHLER et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2015). Todos concluíram que quanto menor o pH, mais rápida ou menor concentração de cloro é necessária para a inativação.

Apenas uma amostra coletada, na estação do verão, esteve acima do padrão estabelecido quanto à turbidez e 16% durante a campanha de inverno (Tabelas 9 e 10). Nessas amostras, em geral a água apresentava material suspenso, além da coloração amarelada. Provavelmente, as variações de turbidez se devem às condições e reparos na rede de distribuição, onde há infiltração de matéria orgânica, podendo inclusive conter patógenos entéricos. Além disso, a alta turbidez, devido à matéria orgânica, e as altas concentrações de cloro já presente na água podem gerar subprodutos indesejados e tóxicos.

A região Leste/Sul apresentou todas as 24 amostras irregulares para o pH, atingindo valores abaixo de 5,0. Também foi a região com o maior número de amostras com cloro abaixo do permitido, sempre nas creches distantes da ETA. Além disso, 41% das amostras foram positivas para coliformes totais e uma para adenovírus humano. Já a região Central foi a que menos apresentou mostras em desconformidade com a legislação, a qual apenas cinco na coleta de verão estiveram com o pH abaixo de 6,0.

De acordo com os dados divulgados pela CASAN, em março de 2016 (coletas de verão) 10% das amostras da região Central estavam em desacordo com a legislação vigente para a turbidez, porém atendiam aos padrões de cloro. Na região Leste/Sul, 10 e 21% das amostras realizadas estavam em desconformidade para turbidez e cloro residual livre, respectivamente. Já na região Norte, apenas o cloro foi discordante aos padrões físico-químicos estabelecidos, apresentando 18% das amostras além dos limites. Quanto aos testes microbiológicos no mesmo mês, os coliformes totais não atenderam à portaria somente na região Norte (CASAN, 2017).

Em agosto de 2016 (coletas de inverno), nas regiões Central e Norte os padrões de potabilidade foram atendidos. No entanto, na região Leste/Sul, 10% das amostras estavam com a turbidez acima do permitido e não atendiam aos padrões de coliformes totais e de *E. coli*. Ressalta-se que os dados dispostos pela companhia não incluem os valores de pH (CASAN, 2017).

Não existem estudos que fazem a relação direta de turbidez da água e subprodutos da cloração. No entanto, alguns autores relatam que a turbidez tem relação com a presença de patógenos e que a desinfecção da água por cloro tem correlação negativa com a turbidez (LECHEVALLIER; EVANS; SEIDLER, 1981; RIZZO; BELGIORNO; CASALE, 2005). Outros trabalhos comentam que tanto a turbidez quanto o pH podem prever os níveis de trihalometanos na água de consumo, sendo que águas mais ácidas teriam menores concentrações de

THMs e maior teor ácidos haloacéticos (KING; MARRETT, 1996; LIANG; SINGER, 2003). Em Florianópolis, Budziak e Carazek (2007) quantificaram os trihalometanos totais na água de consumo nos três sistemas de abastecimento. O sistema Leste/Sul apresentou altas concentrações de THMs, devido à alta concentração de algas no ponto de captação (Lagoa do Peri). Inclusive, os valores extrapolavam o limite estabelecido pela legislação de 100 µg/L.

A legislação de água de consumo (Anexo XX da Portaria de Consolidação n<sup>o</sup> 5) determina a quantidade e frequência de amostragem necessária para analisar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos da água. Na saída do tratamento é necessária uma amostra a cada duas horas para avaliar a cor, pH, turbidez e cloro. Já para o odor e o gosto é feita uma única amostragem por trimestre. Quanto aos parâmetros microbiológicos, são exigidas duas amostras semanais, sendo recomendado quatro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

No sistema de distribuição, a legislação regulamenta 105 amostras mensais para as análises de cloro residual, turbidez, coliformes totais e termotolerantes, para abastecimento superior à 250 mil habitantes, sendo necessário uma amostra a mais para cada 5 mil habitantes. Para a cor da água, são necessárias 40 amostras (mais uma para cada 25 mil habitantes), com frequência mensal. Já para o pH, sabor e odor é dispensada a análise. Apesar do tamanho amostral realizado neste estudo ser inferior ao recomendado, devido à fatores de logística e infraestrutura, é possível notar que a água chega em condições desfavoráveis para o consumo. A detecção de coliformes totais e de adenovírus humano indicam uma possível contaminação do processo de tratamento e distribuição.

No Brasil não existem muitos trabalhos avaliando a qualidade da água da torneira, principalmente quanto a presença de vírus entéricos. No Estado do Paraná, de 37 amostras de água tratada, todas apresentavam pH 6,8, cloro abaixo de 0,5 mg/L e ausência de coliformes totais (YAMAGUCHI et al., 2013). No Rio de Janeiro, de 244 amostras analisadas, 116 continham coliformes totais, sendo que 47 foram positivas para coliformes termotolerantes. Ainda, das 55 amostras positivas a água tinha menos de 0,2mg/L de cloro, e mesmo as amostras que continham mais de 1,2mg/L foram possíveis detectar coliformes totais (D'AGUILA et al., 2000).

Rigotto et al. (2010) avaliaram a presença de vírus entéricos em diversas amostras de água em Florianópolis, sendo que na água tratada não foi detectado rotavírus nem vírus da hepatite A. No entanto,

obtiveram 33% de amostras positivas para adenovírus humano, porém por meio de técnica molecular, diferentemente do método realizado no presente trabalho. Resultado semelhante foi obtido no Rio Grande do Sul, onde de 73 amostras de água da torneira coletadas 23% foram positivas para adenovírus e 16% para rotavírus (KLUGE et al., 2014)

Surtos de gastroenterites causadas pelo consumo de água são relatados em todo o mundo. Ligon e Bartram (2016) reuniram 475 trabalhos publicados que reportaram 1519 surtos de doenças veiculares pela água. Destes, 9% foram causados por vírus, 16% por protozoários e 23% por bactérias, sendo os demais desconhecidos ou por múltiplas causas. Ainda, os autores concluem que o número de surtos associados à rede de distribuição é maior que os relativos à captação e tratamento. Esses dados corroboram com os encontrados por Craun et al. (2010) que avaliaram os surtos de doenças nos Estados Unidos no período de 1971 a 2006. Em outro estudo realizado entre 2011 e 2012 nos Estados Unidos, 431 surtos foram atribuídos ao consumo de água, sendo 32% causados por vírus (BEER et al., 2015).

No Brasil, entre 1998 e 2007 foram notificados, em média, 321 casos por 100 mil habitantes de internações por gastroenterite aguda, sendo Santa Catarina com valor médio de 267 casos por 100 mil habitantes (FIOCRUZ, 2011). Em Florianópolis, Cesa, Fongaro e Barardi (2016) reuniram dados de doenças veiculadas pela água entre 2002 e 2009 em postos de saúde municipais. A média obtida no período foi de 48 casos a cada mil habitantes, sendo as doenças diarreicas as mais frequentes. De acordo com o Instituto Oswaldo Cruz, entre 2001 e 2012 Florianópolis teve uma média de 3,1 casos de hepatite A transmitidas pela água, para cada 100 mil habitantes, por ano. Ainda assim, os dados são incompletos, sendo que os casos de hepatite A são notificados apenas quando são detectados eventuais surtos (FIOCRUZ, 2012).

Com os dados coletados no presente inquérito não foi possível fazer uma relação de casos de gastroenterites e a água de consumo. No entanto, é notável que há uma subnotificação de casos no sistema de saúde, uma vez que 50% que relataram ter sintomas procuraram auxílio médico (Tabela 8). Ligon e Bartram (2016) demonstraram que, em geral, os países com maiores relatos de surtos são desenvolvidos, como Estados Unidos, Canadá e Reino Unido. Isso pode estar relacionado ao maior controle e identificação de doenças do que em países subdesenvolvidos e não necessariamente ao maior número de casos. No Brasil, a subnotificação de doenças infecciosas é comum e quando notificada, pode ser feita com atrasos, dificultando a identificação da

fonte e a tomada de decisão. Além disso, o agente etiológico das gastroenterites não é frequentemente especificado, sendo que podem ser categorizadas apenas como infecções intestinais mal definidas (GRISOTTI, 2010).

Ressalta-se a importância de prosseguir com pesquisas relacionadas à água de consumo, visando a melhoria da qualidade e da satisfação pública. É relevante reiterar, a necessidade da avaliação de vírus entéricos viáveis tanto em amostras ambientais, quanto em estudos de desinfecção.

## **1.6 Conclusões**

- O inquérito determinou a insatisfação dos consumidores quanto à água distribuída em Florianópolis, sendo a insegurança, sobre os demais fatores avaliados, a principal causa dessa insatisfação, seguida pelo sabor.
- Apenas 7% da população consome água diretamente da torneira. A insegurança foi o principal motivo para não beber água da torneira, relatado por 75%, seguido pelo sabor (41%);
- Há uma piora na satisfação quanto a qualidade da água distribuída na estação verão, reportada por cerca de 30% dos participantes;
- A água distribuída em Florianópolis esteve diversas vezes aquém dos padrões de potabilidade. 63% das amostras de água estiveram em discordância com a legislação de água de consumo nas características físico-químicas avaliadas.
- No total, 23 amostras foram positivas para coliformes totais e uma para adenovírus viáveis, indicando uma possível contaminação no sistema de tratamento ou distribuição da água.
- Infere-se uma relação entre o odor e a concentração de cloro detectada na água. Em geral, a água nos bairros próximos das ETAs tem maior concentração de cloro, refletindo numa pior avaliação do odor pelos moradores.

## **CAPÍTULO 2**

# **USO DE TANQUE COM LUZ ULTRAVIOLETA COMO ALTERNATIVA DE TRATAMENTO DE ÁGUA**

## 2.1 Hipótese

A hipótese deste capítulo foi: o tanque com tratamento com luz UV pode ser uma alternativa eficiente na inativação de microrganismos, inclusive dos vírus entéricos e na redução de cloro residual livre da água

## 2.2 Objetivos específicos

- Verificar a eficiência de um tanque de tratamento com luz UV na inativação de vírus entéricos;
- Determinar o decaimento da concentração de cloro durante a circulação de água no tanque de tratamento;
- Elaborar um modelo do tanque de tratamento com luz UV para uso domiciliar ou em escala descentralizada.

## 2.3 Material e métodos

### 2.3.1 Avaliação da eficiência dos tanques de desinfecção com UV na inativação viral

Para os ensaios de desinfecção viral em água de consumo por luz UV, foi utilizado um tanque com capacidade de 300 L de água, com um fluxo aproximado de 1800 L/h (Figura 16). O tanque continha uma lâmpada UV de 36 W acoplada, monocromática (254 nm – UVC) que aplicava uma dose aproximada de 44 mJ/cm<sup>2</sup> por passagem da água. Assim, a dose acumulada por hora foi de 264 mJ/cm<sup>2</sup>. A água no tanque teve sua temperatura controlada em 18°C, para evitar variações experimentais.

**Figura 16.** Imagens do tanque de 300L com luz UV acoplada utilizado para os ensaios de desinfecção vira



O tanque foi preenchido com 300 L de água da torneira e foram determinados os parâmetros de temperatura, pH, condutividade, oxigênio dissolvido (antes e durante a circulação da água) (sonda

multiparâmetro – YSI-85), cloro residual livre, turbidez e coliformes totais. Após as análises, foram adicionados 10 mL de uma solução de tiosulfato de sódio 10% com a finalidade de quelar o cloro residual, seguida de nova medição para confirmação. Ao atingir a temperatura desejada foram inoculados adenovírus recombinante (rAdV-GFP -  $4 \times 10^6$  UFF/L) e Norovírus Murino (MNV-1-  $8,0 \times 10^5$  UFP/L), como modelos de vírus entéricos de genoma DNA e RNA, respectivamente. Essas quantidades foram escolhidas, pois permitiam mensurar até 4 logs de decaimento, o que significaria uma desinfecção de 99,99% dos vírus semeados.

Imediatamente após a homogeneização dos vírus foi retirada uma amostra de 10 L de água, representando o tempo 0h, e, em seguida a lâmpada UV foi acionada. Após 3, 6 e 12 h de recirculação foram realizadas novas amostragens de 10 L de água. As amostras coletadas nos tanques foram imediatamente concentradas (item 1.3.3) e o eluato final foi inoculado em monocamadas de células HEK293A e RAW264.7 para avaliação da infecciosidade viral por microscopia de fluorescência (rAdV-GFP) e placa de lise (MNV-1).

Como controle, foi realizado o mesmo desenho experimental, porém sem a aplicação da luz UV. Em cada experimento, 10 L de água da torneira sem cloro foi artificialmente contaminada com  $1 \times 10^7$  FFU/mL e  $2 \times 10^6$  UFP/mL de rAdV-GFP e MNV-1, respectivamente, concentrada e avaliada a infecciosidade, representando o controle da recuperação viral durante o processo de concentração. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### 2.3.2 Cultivo de células

Para a produção dos estoques virais e para os ensaios de viabilidade viral foram utilizadas as linhagens celulares HEK293A e RAW264.7, permissivas aos rAdV-GFP e MNV-1, respectivamente. As células foram cultivadas em garrafas de cultura celular com tamanho de 180 cm<sup>2</sup> e mantidas em estufa a 37 °C, sob atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>.

A linhagem celular HEK293A, derivadas de rim embrionário humano, possuem o gene *E1* dos adenovírus integrado ao seu genoma, permitindo a replicação de adenovírus com deleção desse gene. Essas células foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Para o cultivo das células HEK293A foi utilizado meio DMEM, suplementado com 10 % de soro fetal bovino [(SFB) Gibco], 1% de solução sal HEPES 1 M (Sigma). Já as células RAW264.7 foram cultivadas de acordo com o item 1.2.4.

### 2.3.3 Produção de estoques virais

Para a produção de rAdV-GFP e MNV-1, as células foram cultivadas em garrafas de cultura celular de 180 cm<sup>2</sup> até atingirem cerca de 90% de confluência e em seguida foram infectadas com os respectivos vírus para a produção dos estoques virais a serem utilizados em ensaios posteriores.

Nos respectivos cultivos celulares, 1,0x10<sup>7</sup> Unidades Formadoras de Focos (UFF) de rAdV-GFP e 2x10<sup>6</sup> Unidades Formadoras de Placa (UFP) de MNV-1 foram adicionados e em seguida incubados por 1 h para adsorção em estufa a 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período de incubação, foram adicionados 25 mL de meio de manutenção, que difere do meio de cultivo apresentado acima apenas na concentração de SFB (2%). As células foram mantidas em estufa e observadas diariamente em microscópio óptico invertido (Olympus) para visualização de efeitos citopáticos (alterações morfológicas que caracterizam a infecção viral). Como controle negativo foi utilizada uma garrafa com monocamada de células não infectadas.

O tempo de incubação variou entre 36 h e 48 h para obtenção de 90-100% de efeito citopático. Nesse estágio as garrafas foram congeladas em freezer -80°C e degeladas a 25°C por três vezes para promover a lise das células e liberar os vírus intracelulares. Em seguida o meio foi centrifugado a 3500 xg por 5 min para sedimentação dos restos celulares. Após a centrifugação o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C.

### 2.3.4 Ensaio de citotoxicidade da água concentrada

Este ensaio foi realizado para determinar a menor diluição da amostra de água concentrada a ser utilizada nos ensaios de cultura celular que não apresentasse efeito citotóxico frente às células de estudo. A avaliação decorreu como descrito no item 1.3.4. com modificação apenas para a linhagem celular HEK293A. Para tal, a quantidade de células utilizada foi de 2x10<sup>5</sup> por cavidade e o período para determinação do efeito citotóxico foi de 24h.

### 2.3.5 Ensaio para determinar a viabilidade viral

O estudo da viabilidade de MNV-1 foi realizado por meio de ensaio de placa de lise, seguindo protocolo descrito no item 1.3.6. Já o ensaio de viabilidade do rAdV-GFP foi sucedido por meio de observação de fluorescência, de acordo com metodologia estabelecida

previamente no laboratório (GARCIA; NASCIMENTO; BARARDI, 2015).

As células HEK293A foram cultivadas em placas de 48 cavidades em concentração final de  $1,5 \times 10^5$  células por cavidade. Após 24h ao plaqueamento, o meio de cultivo foi removido e foram adicionados 100  $\mu$ L de fluido viral em diluições seriadas entre  $10^{-1}$  e  $10^{-7}$  ou de amostras a serem testadas, em duplicata. As diluições de estoque viral ou das amostras foram feitas em meio DMEM acrescido de 1 % de solução de antibióticos [(PS) penicilina G 100 U/mL; sulfato de estreptomicina 100  $\mu$ g/mL (Cultilab)] e 1% de anfotericina B 250  $\mu$ g/mL (Gibco). As placas foram incubadas por 1 h a 37 °C sob atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> para adsorção viral, sendo homogeneizadas a cada 15 min.

Após a adsorção viral, foram adicionados 400  $\mu$ L por cavidade de meio de manutenção por cavidade (DMEM, 2 % SFB, 1% Hapes, 1 % PS e 1 % anfotericina). Depois de 24 h de incubação, o sobrenadante foi aspirado e imediatamente foi realizada a visualização em microscópio de fluorescência invertido (Olympus). As células fluorescentes foram contadas em aumento de 100x e a estimativa do título viral foi estabelecida em Unidades Formadoras de Foco por mL (UFF/mL) conforme a fórmula a seguir.

$$\text{UFF/mL} = \frac{\text{número de células fluorescentes} \times \text{recíproca da diluição}}{\text{recíproca do volume inoculado (em mL)}}$$

### 2.3.6 Avaliação do decaimento do cloro no tanque de tratamento

Para determinar o decaimento de cloro residual livre durante a recirculação da água, o tanque de tratamento foi preenchido com 300 L de água de torneira, acondicionada à 18 °C e adicionado 25 mL de cloro comercial (aproximadamente 2,5%). Após a homogeneização do cloro no tanque, foi feita medições da concentração no tempo inicial (0h) e depois de 1, 3, 6, 12, 24 e 36h de recirculação da água.

### 2.3.7 Análise dos dados

Para as análises dos experimentos de desinfecção da água no tanque de tratamento e de decaimento do cloro residual livre, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) fatorial de medidas repetidas, seguida de regressão linear simples. Para ambas, previamente, foram verificados os pressupostos de normalidade dos resíduos (por meio do teste de

Shapiro-Wilk), de esfericidade (por meio do teste de Mauchly) e de homogeneidade das variâncias (por meio do teste de Levene), sendo que todos foram atendidos. Quando necessário, o teste de Bonferroni foi utilizado como teste *post hoc*. Todas as análises foram realizadas no programa IBM SPSS 19.0 e foram considerados significativos valores- $p < 0,05$ .

## 2.4 Resultados

### 2.4.1 Eficiência do tanque de tratamento na desinfecção de vírus

Visando utilizar o tanque como proposta de um produto para o melhoramento de água tratada, foi realizado um ensaio de desinfecção de rAdV-GFP e MNV-1. Tanques de 300L foram preenchidos com água de torneira e foram medidos os parâmetros de temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade, pH, cloro residual livre e coliformes totais no ato do preenchimento e após circulação da água para estabilização da temperatura (Tabela 11). Todas as análises de coliformes totais foram negativas. Para assegurar a eficiência do tratamento com luz UV foi feita a medição de turbidez após a circulação, garantindo que sempre tivesse valor igual a 0,0 uT.

**Tabela 11.** Valores médios (e desvio padrão) dos parâmetros físico-químicos da água antes e após a sua circulação no tanque de tratamento por luz UV.

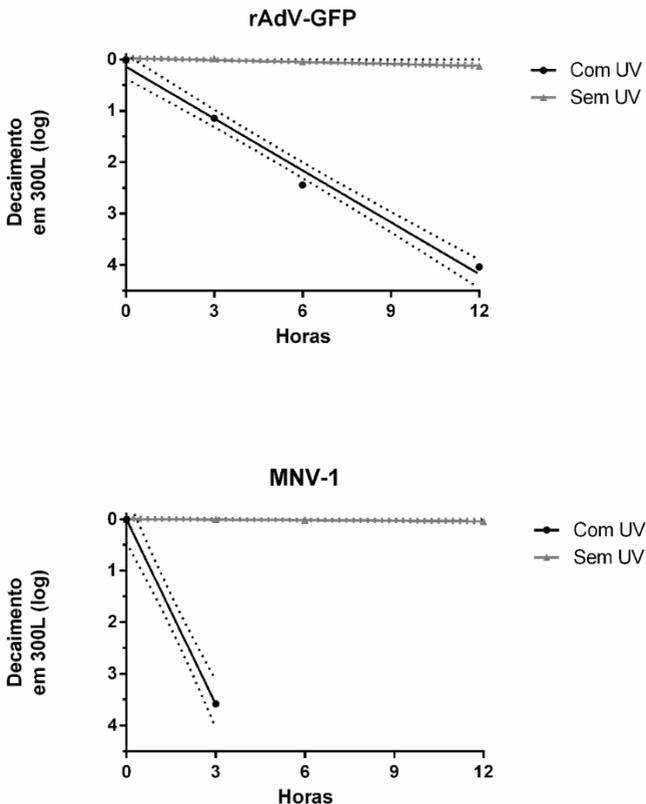
<b>Parâmetros</b>	<b>Anterior à circulação</b>	<b>Posterior à circulação</b>
Temperatura (°C)	22,5 (0,8)	18,1 (0,1)
Oxigênio dissolvido (mg/L)	7,5 (0,6)	8,4 (0,1)
Condutividade (µS)	59,3 (3,8)	64,2 (13,7)
pH	7,0 (0,1)	7,0 (0,1)
Cloro residual livre (mg/L)	0,1 (0,1)	-

(-): Abaixo do limite de detecção da técnica

Quando estabilizada a temperatura, foram adicionados os vírus em quantidade suficiente para observar a inativação de 4 logs (99,99%) e foram avaliados os tempos de 0, 3, 6 e 12h com e sem o uso da luz UV. Para o rAdV-GFP, a concentração média inicial foi de  $4,22 \times 10^6$  UFF/L e após as três primeiras horas de tratamento houve um decaimento de 1,14 logs ( $2,89 \times 10^5$  UFF/L), alcançando 4,03 logs de decaimento ( $3,54 \times 10^2$  UFF/L) ao final das 12h (Figura 17). A análise de regressão linear permitiu gerar a seguinte equação de decaimento:  $Y = 0,137 + 0,336X$ , apresentando  $R^2 = 0,9795$ .

Já a concentração média inicial de MNV-1 foi de  $1,10 \times 10^6$  UFP/L e foi observado um decaimento mais acentuado. Após 3h de circulação, houve um decréscimo médio na concentração de norovírus viável de 3,58 logs ( $3,81 \times 10^2$  UFP/L), não sendo mais possível detectá-lo nos tempos seguintes (Figura 17). Sem a aplicação da luz UV, ambos os vírus permaneceram estáveis durante as 12h.

**Figura 17.** Quantidade média (pontos) e intervalo de confiança (linha pontilhada) de rAdV-GFP (FFU) e MNV-1 (PFU) presentes em 300L de água no tanque de tratamento, com e sem tratamento de luz UV.



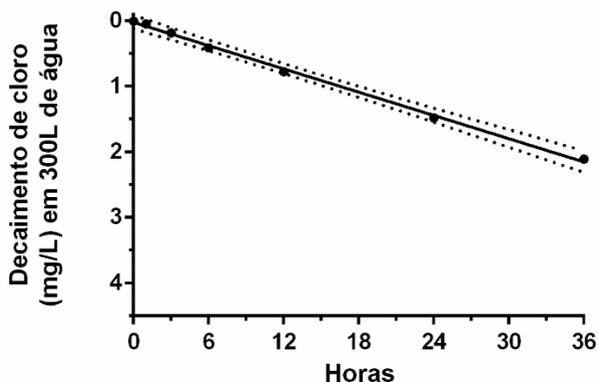
Para todos os tratamentos e replicatas foi realizado um controle do processo de concentração dos vírus. Para isso, 10L de água sem cloro foram artificialmente contaminados com quantidades conhecidas de

rAdV-GFP e MNV-1 e avaliado como as demais amostras. As inferências das quantidades dos vírus presentes nos 300L do tanque foram baseadas na porcentagem de recuperação. O adenovírus teve maior percentual de recuperação, com média de 53%, enquanto o norovírus teve média de 26%.

#### 2.4.2 Decaimento do cloro residual livre no tanque de tratamento

Para determinar o decaimento de cloro residual livre durante a recirculação da água, o tanque de tratamento foi preenchido com água, adicionado cloro e medida a concentração por até 36h. Foi observado um decaimento linear da concentração de cloro, permitindo gerar a seguinte equação:  $Y = 0,019 + 0,059X$ , apresentando valor de  $R^2$  de 0,9564 (Figura 18). Atingiu-se um decaimento superior a 2 mg/L após 36h e com 12h de recirculação (tempo necessário para total inativação do adenovírus) o decaimento foi de 0,77 mg/L.

**Figura 18.** Decaimento médio (pontos) e intervalo de confiança (linha pontilhada) da concentração de cloro livre presente em 300L de água no tanque de tratamento



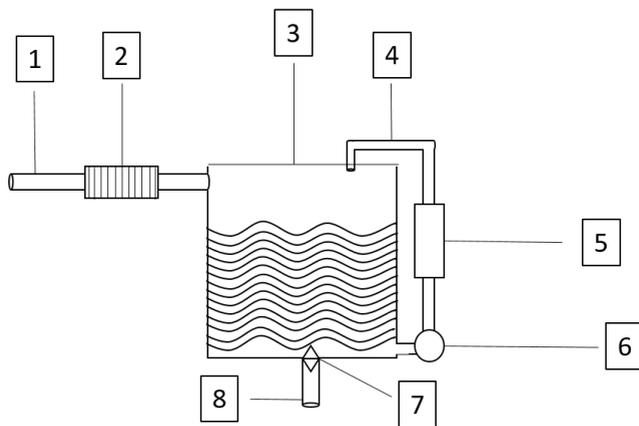
#### 2.4.3 Modelo do tanque de tratamento

Devido a eficiência do tanque com luz UV na inativação de patógenos, foi elaborado um modelo de sistema de tratamento de água para consumo (Figuras 19 e 20). O modelo consiste em um tanque que comporta 100L (40x40x75cm), onde há um filtro anterior à entrada no

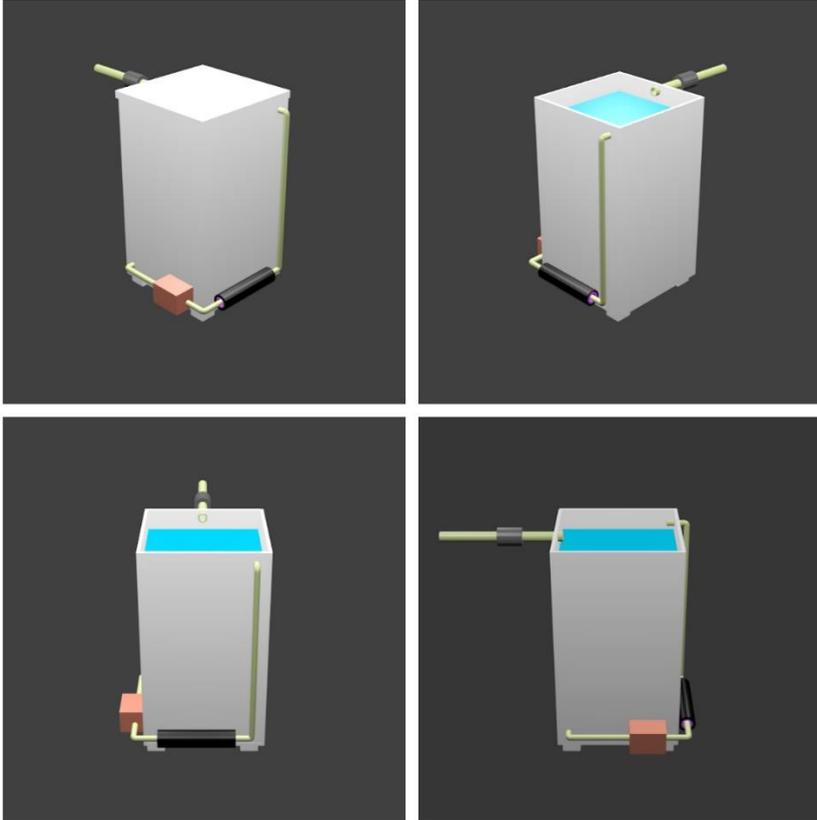
tanque, para remoção de partículas e redução da turbidez. Em seguida, a água circula por uma tubulação externa ao tanque, com auxílio de uma bomba, com fluxo aproximado de 30L/min. Durante a circulação, a água passa por um reator contendo uma lâmpada de 36W de luz UV, aplicando uma dose aproximada de 45mJ/cm<sup>2</sup> a cada passagem. A água então retorna ao tanque e após 2 a 4 horas a água pode ser disponibilizada para consumo, garantindo uma redução de partículas, patógenos e cloro residual livre. Este produto pode ser escalonado para outras proporções.

A partir do modelo de tanque tratamento de água desenvolvido foi elaborado um projeto de patente, submetido junto à Secretaria de Inovação da Universidade Federal de Santa Catarina (SINOVA/UFSC). Após a elaboração e submissão do formulário (maio de 2016), aguardou-se a avaliação do pedido. Por complicações entre a SINOVA e a empresa responsável pela avaliação da patente, apenas em agosto de 2017 foi obtido um parecer. O pedido foi inicialmente negado por ter similaridade com outras patentes já registradas, sendo passível de contestação. Devido ao curto prazo, optou-se por não realizar a réplica e submeter os resultados para uma revista científica internacional.

**Figura 19.** Modelo de tanque desenvolvido para tratamento de água e redução de cloro. (1) Tubo de abastecimento; (2) Filtro de partículas; (3) Tanque de acondicionamento; (4) Tubo de recirculação; (5) Reator com lâmpada de ultravioleta; (6) Bomba de água; (7) Válvula de despejo; (8) Tubo de despejo.



**Figura 20.** Modelo em três dimensões do tanque desenvolvido para o tratamento de água e redução de cloro. Tubulações em verde; Filtro de partículas em cinza; Bomba de água e vermelho; Reator com lâmpada UV em preto e roxo.



Os resultados obtidos neste capítulo foram compilados e submetidos à revista *Water Science and Technology: Water Supply* (Anexo E). No momento, o manuscrito está sob avaliação do editor da revista.

## 2.5 Discussão

Com relação ao tanque de tratamento de água com UV, os resultados obtidos demonstraram a eficiência desse sistema em inativar adenovírus humano e norovírus murino após poucas horas de recirculação. Além disso, observou-se um decaimento da concentração de cloro residual livre ao final do tratamento, podendo contribuir para aumentar a satisfação ao consumir, estimulando o consumo dessa água.

Outros reservatórios com tratamento de luz ultravioleta com potenciais fins domésticos já foram propostos. Entretanto, esses tanques possuem a câmara de luz ultravioleta submersa ou sobre a água armazenada não propiciando, dessa forma, uma irradiação homogênea em todo o compartimento, podendo não inativar a totalidade de patógenos presentes na água. Ainda, não se determina o tempo mínimo necessário de contato com a luz UV para a desinfecção da água (MASSHOLDER, 1997; JUNG, JOONG, YOUNG, 2005; GEORGE; TYLER, 2006; RAYMOND, ENGELHARD, 2008; MARCHI, 2015).

A eficiência da inativação do adenovírus na água por luz UV é bem conhecida. Hijnen, Beerendonk e Medema (2006) reuniram diversos estudos que avaliaram o decaimento de diferentes vírus em amostras ambientais de água, demonstrando que o adenovírus é o mais resistente à inativação por luz UV, necessitando de doses superiores a  $170 \text{ mJ/cm}^2$  para redução de 99,99% de vírus infecciosos. Ryu et al. (2015), por meio de técnica de cultivo celular integrado à PCR (ICC-qPCR) detectaram 4 logs de decaimento de adenovírus viáveis com dose de  $172 \text{ mJ/cm}^2$  de luz UV a 254nm. Carratalà et al. (2013) verificaram o decaimento de adenovírus humano em diversas matrizes de água, observando um decaimento viral de mais de 6 logs em 24 h com aplicação de UVB.

O MNV-1 tem maior resistência ao tratamento por UV entre os Calicivirus utilizados como modelos virais para estudos de infecciosidade, necessitando de dose aproximada de  $40 \text{ mJ/cm}^2$  para inativação de 4 logs (LEE; ZOH; KO, 2008; PARK; LINDEN; SOBSEY, 2011). Outros trabalhos relatam a ação mais eficiente da UVC na inativação de norovírus murino, em relação a UVB e UVA. Park et al. (2015) demonstraram que, em uma superfície metálica, a UVC é capaz de inativar cerca de 3 logs de MNV-1 com a dose de  $90 \text{ mJ/cm}^2$ . Já Lee e Ko, (2013) observaram que a UVA não afeta a viabilidade de MNV-1, enquanto uma dose de aproximadamente  $200 \text{ mJ/cm}^2$  de UVB inativou 3 logs de norovírus murino em água e tampão.

A luz UV tem ação comprovada em proteínas virais, porém depende da dose e do comprimento de onda. De acordo com Eischeid e Linden (2011) a proteína hexon e as fibras do adenovírus humano são as mais susceptíveis aos danos pela luz UV, seguido de pequenas proteínas do capsídeo, quando exposto a um comprimento de 254 nm. Os autores sugerem também que há alterações estruturais visíveis em microscópios de transmissão. Outro estudo comprovou que quanto menor forem os comprimentos de onda, menor a dose necessária para a inativação do AdV, com pequena influência no material genético (BECK et al., 2014).

Para MNV-1, foi verificado que pulsações de luz (200 – 1000 nm) causam quebras aleatórias da proteína VP1, gerando a desestruturação do vírus (VIMONT; FLISS; JEAN, 2015). Beck et al. (2015) relataram que a diferença na ação dos distintos comprimentos de onda de luz UV sobre a inativação de adenovírus humano e do bacteriófago MS2, se deve à complexidade do capsídeo viral do vírus humano, composto por 13 estruturas proteicas fundamentais, tornando-o mais resistente. Outro trabalho determinou que presença de genoma RNA contribui para danos em proteínas específicas, sugerindo uma transferência de energia a partir do RNA às proteínas virais em MS2 após exposição à luz UV a 254 nm (WIGGINTON et al., 2012). Dessa forma, as rupturas das proteínas podem impedir as interações com as células hospedeiras, interrompendo as fases iniciais da replicação viral.

Apesar da luz UV atuar por meio de danos nas proteínas, a degeneração do material genético é o principal fator que contribui para a inativação viral, tanto para vírus com genoma de DNA quanto os de RNA. Para MNV-1, um estudo demonstrou que a quantidade de RNA intacto diminui com a aplicação de pulsação de luz (200 – 1000 nm). Além disso, notou-se que os fragmentos gênicos encontrados eram menores de 200 nucleotídeos (VIMONT; FLISS; JEAN, 2015). Beck et al. (2015) comprovaram que o bacteriófago MS2, também com genoma de RNA simples fita, é inativado principalmente pelo dano no genoma, não havendo diferenças entre o comprimento de onda da luz UV aplicada.

Para o adenovírus humano, Beck et al. (2014) verificaram que a menor dose necessária para obter a maior taxa de dano em DNA foi 260 nm, próximo do comprimento de máxima absorção pelo material genético (254 nm). No entanto, os autores notaram que com comprimentos de onda maiores ou menores, a eficiência da UV para danificar o DNA é diminuída. Eischeid, Meyer e Linden (2009) demonstraram que a lâmpada de UV policromática (200 – 300 nm) gerou a mesma quantidade de dano ao DNA de adenovírus do que a

lâmpada monocromática (254 nm), com cerca de 2 danos por kilobase, quando exposto à dose de 50 mJ/cm<sup>2</sup>.

O adenovírus, por ser um vírus de genoma DNA dupla fita, pode ter seu genoma reparado pela célula hospedeira. As células utilizadas nos ensaios de viabilidade *in vitro* possuem sistemas de reparo de DNA celular, podendo reparar danos causados pela luz UV no material genético do adenovírus (LECHEVALLIER; AU, 2004). Estudos demonstram que os adenovírus expostos à luz UV são mais sensíveis quando testados em células deficientes no sistema de reparo de DNA (III; DAY, 1974; RAINBOW, 1980, 1989). Dessa forma acredita-se que, devido à utilização de uma lâmpada monocromática (254 nm), os danos causados no genoma do rAdV-GFP nas primeiras horas de desinfecção são, em parte, reparados pelas células HEK293A, o que não ocorre com o MNV-1, de genoma RNA. Sendo assim foi necessária uma maior dose acumulada, ou seja, maior tempo de circulação no tanque com luz UV para a inativação do adenovírus em relação ao norovírus. Ensaio utilizando lâmpadas policromáticas, para avaliar se há redução no tempo de inativação de ambos os vírus, seriam indicados.

Sabe-se que o norovírus têm a capacidade de se ligar à carboidratos, como antígenos dos grupos sanguíneos presentes em tecidos de moluscos e superfícies de folhas de alface, dessa forma tornando-se mais resistentes à inativação (ESSEILI; WANG; SAIF, 2012; LE GUYADER et al., 2006). Trabalhos que avaliaram o potencial de desinfecção de ostras por meio de depuradora de 300L acoplada com luz UV, demonstraram que o norovírus murino obteve 4 logs de decaimento na água do mar em até 24h, sem a presença dos moluscos (GARCIA, NASCIMENTO, BARARDI, 2015). No entanto, quando investigado a desinfecção de MNV-1 nos tecidos de ostras após a depuração, foi observado um decaimento mais lento e gradual, sendo inclusive menos inativado em comparação ao adenovírus (PILOTTO, 2015).

Jean et al. (2011) avaliaram a inativação de MNV-1, por pulsação de luz UV, em tampão fosfato puro acrescentado de 5% de SFB, mimetizando a presença de matéria orgânica. Obtiveram um decaimento total (> 5 logs) com aplicação de 60 mJ/cm<sup>2</sup> na suspensão com apenas tampão fosfato, enquanto MNV-1 apresentou entre 2,3 e 3,6 logs de decaimento na presença de SFB. Assim, a matéria orgânica presente na água é um fator importante para o aumento da viabilidade dos vírus, influenciando diretamente na eficiência do tratamento com a luz UV.

O decaimento de bactérias não foi realizado no presente estudo devido ao fato dos vírus terem maior resistência à luz UV, como apresentado na Tabela 3. Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), para a desinfecção de 4logs (99,99%) por luz UV é necessário aplicar uma dose 186mJ/cm<sup>2</sup> para os vírus, enquanto que para oocistos de *Cryptosporidium* e esporos bacterianos são requeridos 22 e 62mJ/cm<sup>2</sup>, respectivamente (USEPA, 2011).

A dose mínima de luz UV geralmente prescrita para a desinfecção de águas é dependente das características da instalação do sistema de tratamento, do tempo de exposição, da eficiência de absorção de UV pela água e da espécie de microrganismo estudada (HASSEN et al., 2000). A variação desses fatores entre os diversos estudos pode explicar diferenças nos resultados de desinfecção da água.

A adsorção dos vírus na parede dos tanques pode ter influência sobre decaimento viral observado. Um estudo realizado com poliovírus inoculado em água subterrânea armazenada em um tanque de polipropileno mostrou que após 10 dias havia 20 vezes mais vírus na parede do tanque do que na água (GASSILLOUD; GANTZER, 2005). Apesar de factível, a constante circulação da água, a rápida inativação e a constante viabilidade dos vírus observada nos ensaios sem tratamento com luz UV, permitem inferir que a adsorção nas paredes do tanque de depuração não foi um fator determinante para a inativação viral no presente estudo.

A pesquisa de vírus entéricos humanos no ambiente tem crescido consideravelmente nos últimos anos, principalmente pela facilidade na detecção e mensuração de genomas virais por técnicas moleculares (REYNOLDS, MENA, GERBA, 2008). Porém, a detecção de material genético não revela o real risco de contaminação, uma vez que os vírus podem estar inativados. Assim, a aplicação de técnicas que são precedidas pela infecção celular *in vitro*, quando possível, são muito importantes para avaliar o potencial infeccioso dos vírus entéricos (RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2012; BOSCH et al., 2008; BAERT, DEBEVERE, UYTENDAELE, 2009). Para isso, alguns modelos virais têm sido utilizados, sobretudo nos estudos de desinfecção e estabilidade em diferentes matrizes, como o adenovírus humano e o norovírus murino (CANNON et al., 2006; CROMEANS; KAHLER; HILL, 2010; KAHLER et al., 2010).

O emprego do adenovírus humano recombinante em amostras ambientais ainda é pouco relatado. Li, Shi e Jiang (2010) compararam a eficiência de diferentes técnicas de concentração inoculando o rAdV-GFP em diversas matrizes. Outros estudos realizados no grupo de

trabalho do presente projeto utilizaram o adenovírus recombinante como modelo para avaliar a desinfecção em água de consumo por cloro e água do mar por luz UV (GARCIA, NASCIMENTO, BARARDI, 2015; NASCIMENTO et al., 2015).

Neste sentido, o rAdV-GFP é um bom modelo viral para estudos de desinfecção e estabilidade no campo da virologia ambiental, uma vez que não requer anticorpos para a detecção da fluorescência, tornando a técnica mais econômica e prática. Além disso, a não necessidade do emprego de anticorpos para sua detecção evita a perda de células durante as extensivas lavagens realizadas nos métodos convencionais e diminui a formação de ligações inespecíficas. Ainda, comparando com o ensaio de placa de lise, a microscopia de fluorescência foi igualmente sensível, porém menos laboriosa detectando células infectadas (fluorescentes) em apenas 24 h (GARCIA, NASCIMENTO, BARARDI, 2015).

É importante ressaltar a importância de realizar o ensaio de viabilidade viral imediatamente após a concentração para evitar perda de vírus infecciosos durante o armazenamento. Recomenda-se armazenar amostras ambientais para análises virais por no máximo 48 h a 4 °C ou a - 80°C por períodos mais longos (OLSON; AXLER; HICKS, 2004). No entanto, a formação de cristais de gelo é responsável pela perda inicial de títulos virais em amostras congeladas, sendo que é aumentada quando as amostras são estocadas a -20 °C. (GOULD, 1999). Assim, estudos que avaliam a viabilidade de vírus após armazenamento podem subestimar o título viral.

O método de concentração de água do mar com leite desnatado acidificado está bem estabelecido e trabalhos relatam uma recuperação média de cópias genômicas de 50% para AdV e 80% para MNV-1 (CALGUA et al., 2008; 2013). Quanto à capacidade de concentrar vírus viáveis, Garcia, Nascimento e Barardi (2015) relataram uma recuperação média aproximada de 30% para rAdV-GFP e MNV-1. No presente trabalho, a técnica utilizada obteve média de recuperação de 53% de rAdV-GFP viáveis. Já para MNV-1, a média de recuperação de vírus viáveis foi de 28%.

A recirculação da água foi capaz reduzir as concentrações de cloro residual livre na água em aproximadamente 0,8mg/L, ao final do tempo de desinfecção. No entanto, os ensaios foram realizados em temperatura controlada de 18°C. Acredita-se que na aplicação deste tanque em escala real, a maior temperatura da água pode favorecer a evaporação e atingir um decaimento da concentração de cloro superior à observada. Esta redução de cloro residual livre pode influenciar na

percepção de sabor e odor de águas tratadas com cloro, quando consumida.

Portanto, o tanque proposto neste trabalho se mostrou eficiente para inativar microrganismos da água e reduzir a concentração de cloro, tornando-a segura e satisfatória para o consumo. Devido à comprovada contaminação da água por coliformes e adenovírus nas coletas das creches municipais, este tanque tem potencial de ser empregado como um sistema de tratamento doméstico. Ainda, pode ser utilizado em escala descentralizada, como em comunidades isoladas e áreas rurais.

## **2.6 Conclusões**

- O tanque com luz UV contendo 300L, foi capaz de inativar 99,99% ou mais de adenovírus e norovírus após 12h de tratamento.
- A recirculação da água no tanque reduziu a concentração de cloro residual livre em 0,77 mg/L após 12h, podendo melhorar a percepção de sabor e odor;
- O tanque pode ser escalonado para diferentes tamanhos, sendo um possível produto a ser utilizado em domicílios e em escala descentralizada

## **CAPÍTULO 3**

# **COMPOSTOS NATURAIS E SINTÉTICOS VISANDO A DESINFECÇÃO DE ÁGUAS NATURAIS**

### 3.1 Hipótese

A hipótese deste capítulo foi: a NCT, BAT e GSE são agentes desinfetantes inócuos e podem ser utilizados na desinfecção da água de consumo sendo capazes de inativar microrganismos, inclusive os vírus entéricos.

### 3.2 Objetivos específicos

- a. Avaliar a atividade virucida dos compostos N-clorotaurina (NCT), Bromoamina-T (BAT) e extrato de semente de uva (GSE) frente ao adenovírus humano recombinante (rAdV-GFP);
- b. Estabelecer a curva de decaimento da atividade oxidativa da NCT e da BAT na presença de matéria orgânica;
- c. Verificar a citotoxicidade dos compostos NCT, BAT e GSE em diversas concentrações em duas linhagens celulares humanas *in vitro*;

### 3.3 Material e métodos

#### 3.3.1 Características e preparação dos compostos NCT, BAT e GSE

A N-clorotaurina (NCT) é um composto cristalino que tem coloração branca, peso molecular de 181,57 g/mol e apresenta alta solubilidade em água. A estabilidade do sal está relacionada à temperatura, sendo que quanto menor a temperatura do sistema, maior a estabilidade do composto. A -20°C, ocorre uma perda de 10% da capacidade oxidativa após dois anos e, entre 2 e 5°C, não antes de um ano. A solução aquosa (a 1%) também é estável, com perda de aproximadamente 10% da capacidade oxidativa por ano, quando armazenada em geladeira (GOTTARDI; NAGL, 2002). Para os experimentos de inativação viral e avaliação da capacidade oxidativa a NCT foi preparada em água destilada, em concentração de 2% (peso/volume) e diluída para obtenção das concentrações de 1,0 e 0,5%. Para os ensaios de citotoxicidade, a NCT foi preparada a 16% em água destilada esterilizada realizada diluições seriadas até as concentrações de uso (Tabela 12).

A Bromoamina-T (BAT) é um composto com peso molecular de 300,84 g/mol, possui coloração amarela e também é muito solúvel em água. Tanto a substância pura quanto a solução aquosa podem permanecer em temperatura ambiente por até seis meses, sem perda da capacidade oxidativa. No entanto, é recomendado o armazenamento sob proteção da luz solar (dados não publicados). Para os experimentos de

inativação viral, a BAT foi preparada em concentração de 0,02% (p/v) em água destilada e diluída para obtenção das concentrações de 0,01 e 0,005%. Já nos ensaios de avaliação da capacidade oxidativa e de citotoxicidade, a BAT foi preparada a 2 e 1% (p/v), seguidas de diluições seriadas, quando necessário.

O extrato bruto de semente de uva (GSE) recebe o nome comercial de Gravinol-S e foi gentilmente doado pela empresa Optipure, Chemco Industries (Los Angeles, CA). O GSE exibe uma coloração marrom e, de acordo com as especificações da empresa, apresenta valores mínimos de 95% de flavonoides em sua composição. Para todos os experimentos o extrato foi preparado em concentração de 4% (p/v, equivalente a 40 mg/mL) em DMSO (Dimetilsulfóxido) e diluído em água destilada até as concentrações de uso (entre 0,08 e 0,00125%).

### 3.3.2 Avaliação da eficiência dos compostos (NCT, BAT e GSE) na inativação de rAdV-GFP em água destilada

Os testes de atividade virucida pelos compostos foram realizados durante o doutorado sanduíche na Universidade Médica de Innsbruck, Áustria, sob supervisão do Prof. Dr. Markus Nagl.

Para os experimentos de inativação viral em água destilada frente a diferentes concentrações dos compostos (NCT, BAT e GSE), foram preparados quatro tubos contendo 1,3 mL de água destilada artificialmente contaminada com rAdV-GFP (aproximadamente  $3,8 \times 10^6$  UFF). Em três tubos foram adicionados 1,3 mL dos compostos, separadamente, a fim de atingir as concentrações finais desejadas. Para a NCT, as concentrações finais utilizadas foram de 1,0, 0,5 e 0,25% e para a BAT e o GSE foram de 0,01, 0,005 e 0,0025%. Como controle, em um dos tubos foi adicionado 1,3 mL de água destilada.

Os tubos foram mantidos a temperatura ambiente (20°C) e amostragens de 500 µL foram feitas imediatamente após a adição dos compostos (tempo 0) e após 15, 30, 60 e 120 min de tempo de contato. Quando necessário, períodos mais curtos foram utilizados. As amostras foram prontamente homogeneizadas com 500 µL de uma solução de bloqueio específica para cada composto (Metionina/Histidina 1% para NCT e BAT; DMEM com 15% de SFB para GSE). Como controle positivo, a solução de bloqueio foi homogeneizada com o composto específico antes da adição de rAdV-GFP.

Em seguida, realizou-se o ensaio de viabilidade do rAdV-GFP por meio de observação de fluorescência (GARCIA; NASCIMENTO; BARARDI, 2015), descrita no item 2.2.5. As diluições utilizadas para a

determinação do título viral em cada amostra foram entre 1:4 e 1:10.000 ( $10^{-4}$ ). Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes.

### 3.3.3 Avaliação da atividade oxidativa de NCT e BAT na presença de matéria orgânica

Os ensaios da atividade oxidativa dos compostos na presença de matéria orgânica foram realizados durante o doutorado sanduíche na Universidade Médica de Innsbruck, Áustria, sob supervisão do Prof. Dr. Markus Nagl.

Para determinar a curva de decaimento da atividade oxidativa de NCT e BAT na presença de matéria orgânica foi utilizada a técnica de titulação iodométrica. Nesta técnica, o iodeto de potássio (KI) em excesso molar é adicionado ao composto oxidante, formando iodo. Na presença de tiosulfato de sódio ocorre a redução da capacidade oxidativa, podendo então ser mensurada.

Os compostos NCT e BAT foram avaliados em duas concentrações diferentes (1 e 2%). Para simular a presença de matéria orgânica na água, foi utilizado peptona em diversas concentrações. As proporções da concentração de peptona usadas em relação à concentração dos compostos foram as seguintes: 0,5:1; 1:1 e 2:1. Assim, quando os compostos foram avaliados a 1%, foram testadas as concentrações de peptona de 0,5, 1 e 2%, e quando os compostos foram testados a 2%, as concentrações de peptona foram de 1, 2 e 4%.

Para avaliar o efeito do pH e da possibilidade de ingestão e contato dos compostos com o suco gástrico, utilizou-se peptona em pH neutro (6,8) e ácido (2,5), este ajustado com HCl 0,1 N. Os tempos de contato dos compostos com a peptona para a avaliação da atividade oxidativa foram 0, 1, 2, 5, 10, 15, 30 e 60 min. Água destilada, em pH neutro e ácido, foi utilizada como controle. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas independentes.

Os experimentos foram realizados como segue: em um recipiente foram adicionados 500  $\mu$ L de NCT ou BAT, nas concentrações selecionadas, e 500  $\mu$ L de uma solução de peptona ou água (controle). Nos tempos determinados, foram adicionados 10 mL de água destilada, 200  $\mu$ L de ácido acético 50% e sal de iodeto de potássio em excesso molar. A titulação era imediatamente realizada em um titulador potenciométrico de alto desempenho (TIM960 – Radiometer Analytical). Neste aparelho, uma solução de tiosulfato de sódio 0,1N era adicionada até o ponto de virada da curva de potencial elétrico. O volume de tiosulfato de sódio necessário para atingir este ponto é diretamente relacionado com a capacidade oxidativa da amostra testada.

O cálculo da capacidade oxidativa (cox) dos compostos foi realizado por meio da fórmula a seguir:

$$\text{cox (Mol/L)} = \frac{\text{volume de tiosulfato de sódio consumido} \times 0,05}{\text{volume de solução do composto (0,5mL)}}$$

Em seguida, as concentrações foram transformadas em porcentagens em relação ao controle (sem peptona, tempo 0 h):

$$\text{cox (\%)} = \frac{\text{cox (Mol/L) da amostra testada} \times 100}{\text{cox (Mol/L) do controle}}$$

### 3.3.4 Determinação da quantidade de fenólicos totais e da atividade antioxidante de GSE na presença de matéria orgânica

Para avaliar o comportamento da atividade do GSE na presença de matéria orgânica foram aplicadas as técnicas colorimétricas de quantificação do teor de fenólicos totais por Folin-Ciocalteu e a capacidade de captação de radicais livres com DPPH. Novamente a peptona, em pH 6,8 e 2,5, foi utilizada para simular a presença de matéria orgânica. Em ambas as técnicas, a concentração de peptona foi 10 vezes superior à de GSE.

O teor de fenólicos totais foi mensurado pela técnica de Folin-Ciocalteu descrita por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999) e adaptada para placas de 96 cavidades. Em cada cavidade foram adicionados 6,25 µL de peptona ou água ultrapura (controle) e 6,25 µL de GSE (concentração final de 0,02%). Após 0, 5, 15, 30, 60, 90 e 120 min de contato, 50 µL de água foram acrescentados seguido de 12,5 µL de reagente Folin-Ciocalteu. Depois de seis minutos, foram adicionados 100 µL da solução de carbonato de sódio (NaCO<sub>3</sub>) a 7% e 100 µL de água. A placa foi incubada por 90 minutos em abrigo da luz e, ao final deste período, foram medidas as absorbâncias a 720 nm em espectrofotômetro (SpectraMax M2 – Molecular Devices). Uma curva analítica foi construída a partir de soluções aquosas de ácido gálico na faixa de 25 a 250 µg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicatas, e os resultados expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico (mg EAG).

Para determinar a capacidade de captação de radicais livres pelo GSE na presença de matéria orgânica, foi empregado a metodologia de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) descrito por Brand-Williams,

Cuvelier e Berset (1995) e modificado por Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998). Para isso, 20  $\mu\text{L}$  de peptona ou água ultrapura (controle) foram acondicionados em microtubos e foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de GSE (concentração final de 0,01%). Após 0, 15, 30, 60, 90 e 120 min de tempo de contato foi acrescentado 1.560  $\mu\text{L}$  de uma solução metanólica de DPPH a 60  $\mu\text{M}$ . As preparações foram acondicionadas ao abrigo da luz por 60 min e, ao final deste período, 340  $\mu\text{L}$  de cada foram transferidas para cavidades de uma placa de 96 poços de quartzo (SpectraPlate – Molecular Devices). Em seguida, as absorvâncias foram medidas a 515 nm em espectrofotômetro (SpectraMax M2 – Molecular Devices). Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados expressos em porcentagem de captação de radicais livres.

### 3.3.5 Avaliação da citotoxicidade dos compostos (NCT, BAT e GSE) *in vitro*

Para determinar a citotoxicidade dos compostos foi realizado o ensaio colorimétrico com sulforrodamina B (SRB), descrito por Vichai e Kirtikara (2006), com modificações de Silva (2009) e executado pela Laurita Boff do Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC. Os compostos foram testados frente a duas linhagens celulares humanas, não tumorais: fibroblasto de gengiva (HGF) e células epiteliais de rim embrionário (HEK293A). Estas células foram selecionadas por terem relação com a possível ingestão dos compostos após o tratamento da água. O cultivo de HGF foi feito em DMEM suplementado com 10% de SFB e as de HEK293A em DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de sal de HEPES 1M.

O ensaio foi realizado da seguinte maneira: as células HGF e HEK293A, foram cultivadas em placas de 96 cavidades nas densidades de  $3,0 \times 10^4$  e  $2,0 \times 10^4$  células por cavidade, respectivamente. Após 24 h de crescimento, foi removido o meio e adicionado 100  $\mu\text{L}$  dos compostos diluídos em meio MEM em diferentes concentrações (Tabela 12), seguida de incubação de 24 h a 37 °C, sob atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ .

**Tabela 12.** Concentrações dos compostos testados (em porcentagem - p/v) nos ensaios de citotoxicidade em células HGF e HEK293A.

NCT (%)	BAT (%)	GSE (%)
8,00	1,00	0,08
4,00	0,50	0,04
2,00	0,25	0,02
1,00	0,125	0,01
0,50	0,08	0,005
0,25	0,04	0,0025
0,125	0,02	0,00125
0,0625	0,01	
0,03125	0,005	
	0,0025	
	0,00125	

Depois deste período, foi adicionado 66,6 µL de ácido tricloroacético a 10% em cada cavidade, para fixação das células, e incubado por 1 h à 4 °C. As cavidades foram gentilmente lavadas com água destilada por quatro vezes e deixadas a temperatura ambiente para secagem. Em seguida, as células fixadas foram coradas com 100 µL da solução ácida de sulforrodamina B 0,057% por 30 min. O corante não ligado às proteínas foi removido através de quatro lavagens sucessivas com uma solução aquosa de ácido acético a 1%, e a placa foi seca novamente por 24 h.

A partir disso, procedeu-se a extração do corante ligado às proteínas, com a adição de 100 µL, em cada cavidade, de uma solução tampão de Tris Base 10 mM (pH 10,5). A placa foi agitada por 10 min à temperatura ambiente para que todo o corante fosse dissolvido e as absorbâncias foram medidas em um espectrofotômetro (SpectraMax – Molecular Devices) a 510 nm. Os valores de absorbância medidos para as diferentes concentrações de cada composto foram transformados em porcentagens de viabilidade celular (X%), em relação ao controle celular, o qual é considerado 100% viável, pela seguinte fórmula:

$$X\% = \frac{\text{DO composto testado} \times 100}{\text{DO controle celular}}$$

onde DO representa a Densidade Óptica.

Em seguida, os percentuais calculados referentes às diferentes concentrações das amostras, foram analisadas por regressão não linear, sendo possível determinar os valores de CC50, ou seja, a concentração de cada amostra que reduziu em 50% a viabilidade celular.

### 3.3.6 Análise dos dados

Para as análises dos experimentos de inativação viral pelos compostos e do decaimento da atividade dos mesmos foi utilizado análise de variância (ANOVA) fatorial de medidas repetidas. Previamente, foram verificados os pressupostos de normalidade dos resíduos (por meio do teste de Shapiro-Wilk), de esfericidade (por meio do teste de Mauchly) e de homogeneidade das variâncias (por meio do teste de Levene), sendo que todos foram atendidos. Quando necessário, o teste de Bonferroni foi utilizado como teste *post hoc*. e foram considerados significativos valores- $p < 0,05$ .

Para avaliar a diferença entre pH no decaimento da atividade dos compostos, foi empregado o teste *t* de Student para cada tempo de amostragem. Os pressupostos também foram verificados e atendidos. Devido ao teste de múltiplas hipóteses, foi aplicado a correção de Bonferroni, sendo considerados significativos valores- $p < 0,0016$  para os ensaios com NCT e BAT e  $< 0,0036$  para os ensaios com GSE. Todas as análises foram realizadas no programa IBM SPSS 19.0.

## 3.4 Resultados

### 3.4.1 Avaliação da eficiência dos compostos (NCT, BAT e GSE) na inativação de rAdV-GFP em água destilada

Foram avaliadas três concentrações dos diferentes compostos quanto à inativação de rAdV-GFP em água destilada por até 120 min. Os valores médios do decaimento da infecciosidade viral frente ao tratamento com a NCT, BAT e GSE, em diferentes concentrações e tempos avaliados estão expostos nas Tabelas 13, 14 e 15, respectivamente.

Para a NCT, nas concentrações de 0,5 e 1,0%, atingiu-se 99% (2 logs) de inativação de rAdV-GFP após 120 min (Figura 21). Contudo, a atividade deste composto aparenta diminuir ao decorrer do ensaio, visto que entre 60 e 120 minutos não apresenta linearidade no decaimento viral, exceto na concentração de 0,25% (Figura 21). Nesta concentração, observou-se 1,2 logs de inativação ao tempo final.

**Tabela 13.** Decaimento médio (e desvio padrão) de rAdV-GFP (em  $\log_{10}$ ) frente ao tratamento com NCT em diferentes concentrações em água destilada, por até 120 minutos de exposição.

Concentração de NCT	Tempo (min)			
	15	30	60	120
1%	0,45 (0,06)	0,95(0,16)	1,50 (0,17)	2,51 (0,20)
0.5%	0,28 (0,13)	0,60 (0,17)	1,22 (0,21)	2,04 (0,25)
0.25%	0,02 (0,07)	0,29 (0,09)	0,62 (0,11)	1,22 (0,08)

**Tabela 14.** Decaimento médio (e desvio padrão) de rAdV-GFP (em  $\log_{10}$ ) frente ao tratamento com BAT em diferentes concentrações em água destilada, por até 120 minutos de exposição.

Concentração de BAT	Tempo (min)							
	1	2	5	10	15	30	60	120
0.01%	1,90 (0,03)	2,58 (0,12)	3,63 (0,11)	4,73 (0,11)	-	NA	NA	NA
0.005%	0,79 (0,02)	NA	NA	NA	1,72 (0,14)	2,41 (0,14)	2,60 (0,23)	2,42 (0,19)
0.0025%	0,11 (0,03)	NA	NA	NA	0,27 (0,05)	0,40 (0,04)	0,46 (0,05)	0,49 (0,02)

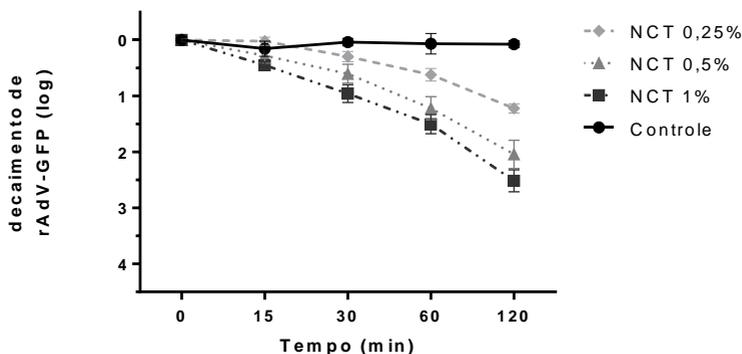
(-): Abaixo do limite de detecção da técnica

NA: Não Avaliado

**Tabela 15.** Decaimento médio (e desvio padrão) de rAdV-GFP (em  $\log_{10}$ ) frente ao tratamento com GSE em diferentes concentrações em água destilada, por até 120 minutos de exposição.

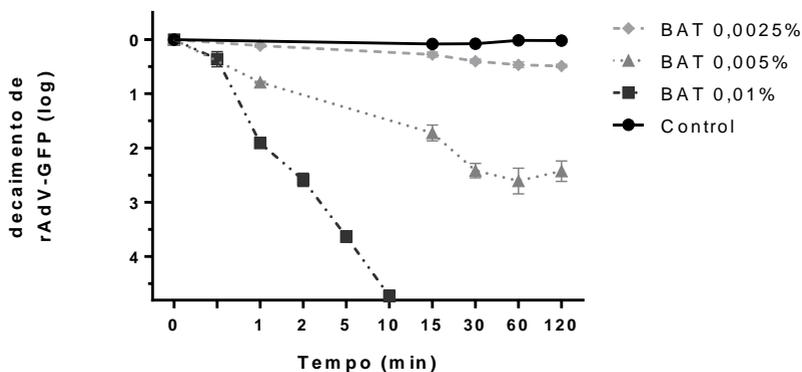
Concentração de GSE	Tempo (min)			
	15	30	60	120
1%	0,76 (0,04)	1,16 (0,07)	1,63 (0,15)	2,51 (0,10)
0.5%	0,38 (0,11)	0,64 (0,09)	0,88 (0,03)	1,53 (0,06)
0.25%	0,14 (0,06)	0,39 (0,01)	0,57 (0,07)	0,71 (0,05)

**Figura 21.** Decaimento de rAdV-GFP ( $\log_{10}$ ) frente ao tratamento com NCT em diferentes concentrações em água destilada.



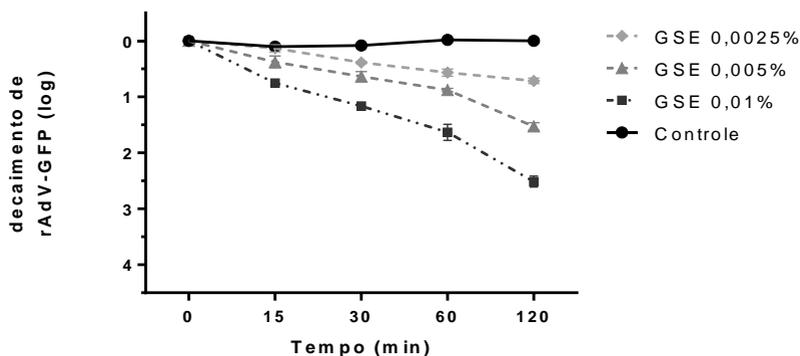
Para a BAT à 0,0025% a inativação de adenovírus após 120 min foi de apenas 0,5 log (Figura 22). Utilizando a concentração de 0,005%, 2,4 logs de inativação foram constatados após 30 min. Porém, observou-se uma estabilidade na viabilidade viral até os 120 min, indicando uma perda da atividade oxidativa do composto (Figura 22). Inicialmente, notou-se a ausência de rAdV-GFP viáveis após 15 minutos utilizando a concentração de 0,01%. Dessa forma, tempos de exposição menores foram selecionados (0,5, 1, 2, 5 e 10 min). Certificou-se um rápido decaimento viral e após 10 min houve uma inativação superior a 99,99% (4,73 logs) (Figura 22).

**Figura 22.** Decaimento de rAdV-GFP ( $\log_{10}$ ) frente ao tratamento com BAT em diferentes concentrações em água destilada.



Assim como os demais compostos, o GSE também não apresentou linearidade no decaimento viral, principalmente entre 60 e 120 min, representando uma possível perda de atividade. No entanto, observou-se uma inativação de 2,5, 1,5 e 0,7 logs com as concentrações de 0,01, 0,005 e 0,0025%, respectivamente, após 120 min (Figura 23).

**Figura 23.** Decaimento de rAdV-GFP ( $\log_{10}$ ) frente ao tratamento com GSE em diferentes concentrações em água destilada.



### 3.4.2 Avaliação da atividade oxidativa de NCT e BAT na presença de matéria orgânica

Visando a aplicação destes compostos em tratamento de águas naturais, determinou-se o efeito da matéria orgânica sobre a atividade

oxidativa de NCT e BAT. Assim, duas concentrações (1 e 2%) destes compostos foram testadas na presença de diferentes proporções de peptona, em pH neutro e ácido, por um período de 60 min por meio de titulação iodométrica (item 3.2.3).

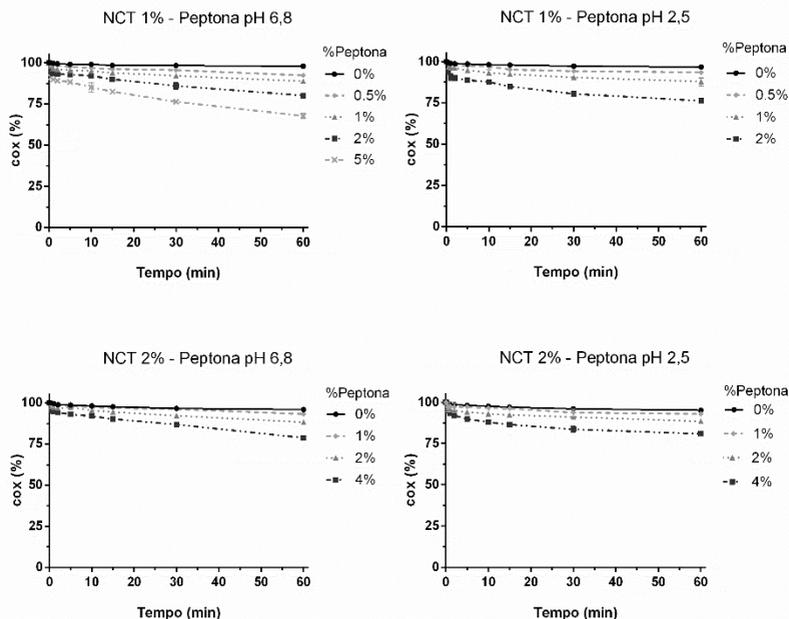
A capacidade oxidativa da NCT teve um vagaroso decaimento durante o tempo avaliado em todas as concentrações testadas (1 e 2%), alcançando cerca de 80% de sua atividade quando exposta ao dobro de peptona (proporção 1:2) (Figura 24). Devido à estabilidade observada, testou-se a NCT a 1% na presença de peptona a 5%, em pH 6,8. Neste caso, após 60 min a NCT ainda apresentou 67% de capacidade oxidativa. Não foi observado diferença entre os ensaios em peptona neutra e ácida (Figura 24). A Tabela 16 apresenta os valores médios da capacidade oxidativa da NCT na presença das diferentes proporções de peptona. Os valores de desvio padrão não são apresentados, pois foram todos iguais ou inferiores a 0,04.

**Tabela 16.** Decaimento médio da capacidade oxidativa (em %) de NCT a 1 e 2% na presença de diferentes concentrações de peptona em pH 6,8 e 2,5.

	<b>Tempo (min)</b>							
	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>60</b>
<b>NCT 1%</b>	<b>pH 6,8</b>							
Peptona 0%	100	99,7	99,4	99,1	99,1	98,4	98,2	97,4
Peptona 0.5%	98,8	98,5	98,4	97,4	96,8	96,2	95,5	92,8
Peptona 1%	98,7	97,5	96,0	95,1	94,7	93,9	92,4	89,0
Peptona 2%	95,1	93,7	93,2	93,0	92,8	90,3	86,7	81,0
Peptona 5%	91,8	90,9	90,3	89,6	87,3	83,3	76,7	69,3
<b>NCT 1%</b>	<b>pH 2,5</b>							
Peptona 0%	99,3	99,0	98,7	98,6	98,1	98,0	97,3	96,4
Peptona 0.5%	99,3	98,1	97,7	97,5	97,0	95,1	94,2	93,4
Peptona 1%	96,7	96,3	96,0	94,7	93,2	92,3	90,4	87,8
Peptona 2%	93,9	90,6	90,0	88,9	87,7	84,9	80,4	76,6
<b>NCT 2%</b>	<b>pH 6,8</b>							
Peptona 0%	100	99,6	98,9	98,6	98,1	97,7	96,7	96,0
Peptona 1%	98,5	98,2	98,4	98,2	97,2	96,9	96,1	93,2
Peptona 2%	97,7	97,3	96,8	97,2	95,3	94,4	92,2	88,5
Peptona 4%	95,6	94,7	94,2	93,0	91,9	90,1	86,9	79,2
<b>NCT 2%</b>	<b>pH 2,5</b>							
Peptona 0%	99,2	98,9	98,5	98,2	97,6	97,1	96,0	95,4
Peptona 1%	96,9	97,6	97,2	97,3	96,5	96,2	93,7	92,9
Peptona 2%	96,5	95,6	94,9	94,1	93,0	92,4	91,0	88,3
Peptona 4%	95,0	93,2	92,0	89,9	87,9	86,5	83,6	80,6

Os valores de desvio padrão foram iguais ou inferiores a 0,04 em todas as amostragens.

**Figura 24.** Média e desvio padrão do decaimento da capacidade oxidativa (%) de NCT a 1 e 2% na presença de diferentes concentrações de peptona em pH 6,8 e 2,5.



A BAT apresentou uma perda mais rápida em sua capacidade oxidativa. Nas concentrações de 1 e 2% de peptona a atividade oxidativa do composto estava abaixo de 50% nos primeiros cinco minutos, em pH neutro (Tabela 17 e Figura 25). Quando em contato com a peptona a 0,5%, a capacidade oxidativa do composto se estabilizou entre 45 e 30% após 60 min. Não foi observado diferença na perda da atividade oxidativa entre as duas concentrações de BAT utilizadas (1 e 2%) (Figura 25). A Tabela 17 apresenta os valores médios da capacidade oxidativa da BAT na presença das diferentes concentrações de peptona.

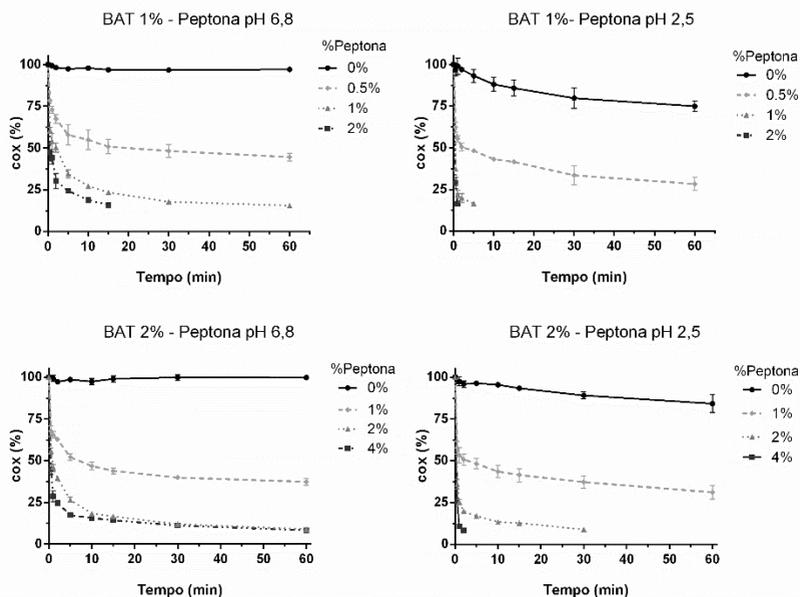
**Tabela 17.** Decaimento médio da capacidade oxidativa (em %) de BAT a 1 e 2% na presença de diferentes concentrações de peptona em pH 6,8 e 2,5.

	<b>Tempo (min)</b>							
	<b>0.5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>60</b>
<b>BAT 1%</b>	<b><u>pH 6,8</u></b>							
Peptona 0%	100	99,3	98,2	97,4	97,8	96,9	96,7	97,7
Peptona 0.5%	78,5	72,9	67,5	57,9	54,9	50,8	48,2	43,3
Peptona 1%	60,6	54,1	50,4	34,4	27,1	23,4	17,8	15,5
Peptona 2%	47,2	44,3	30,3	24,4	18,9	10,6	-	-
<b>BAT 1%</b>	<b><u>pH 2,5</u></b>							
Peptona 0%	96,9	99,0	97,0	93,2	88,0	85,8	79,7	74,9
Peptona 0.5%	62,4	55,4	50,4	48,2	43,2	41,5	33,5	26,2
Peptona 1%	37,4	22,2	19,9	-	-	-	-	-
Peptona 2%	28,9	-	-	-	-	-	-	-
<b>BAT 2%</b>	<b><u>pH 6,8</u></b>							
Peptona 0%	100	99,4	97,2	98,6	97,5	99,0	99,9	100,4
Peptona 1%	67,7	65,4	62,7	52,2	46,8	43,8	39,9	37,0
Peptona 2%	55,7	46,1	39,5	26,5	18,3	16,6	12,1	8,7
Peptona 4%	44,9	28,7	24,7	17,4	15,6	14,3	11,1	-
<b>BAT 2%</b>	<b><u>pH 2,5</u></b>							
Peptona 0%	97,9	100,0	96,9	96,6	94,5	92,5	90,7	84,1
Peptona 1%	57,9	53,3	50,7	48,3	43,5	41,4	37,2	31,8
Peptona 2%	36,0	25,2	19,8	17,0	13,4	12,7	-	-
Peptona 4%	25,8	10,7	-	-	-	-	-	-

(-): Abaixo do limite de detecção da técnica

Os valores de desvio padrão foram iguais ou inferiores a 0,09 em todas as amostragens.

**Figura 25.** Média e desvio padrão do decaimento da capacidade oxidativa (%) de NCT a 1 e 2% na presença de diferentes concentrações de peptona em pH 6,8 e 2,5.



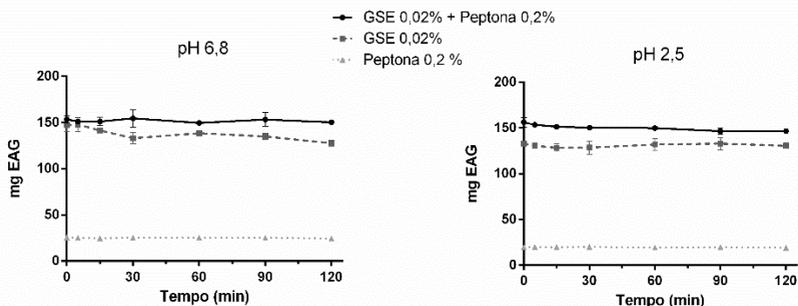
Ao contrário da NCT, a atividade oxidativa da BAT apresentou um decaimento mais acentuado quando avaliada em pH 2,5 (Figura 25). Nas menores concentrações de peptona testadas, rapidamente não foi mais possível determinar a capacidade oxidativa (abaixo do limite de detecção da técnica). Nas concentrações menores de peptona observou-se novamente a tendência de estabilizar a atividade oxidativa da BAT. Na amostra controle, sem a peptona, foi possível notar a perda da atividade somente pela ação do pH ácido (Figura 25).

### 3.4.3 Determinação da quantidade de fenólicos totais e da atividade antioxidante de GSE na presença de matéria orgânica

Objetivando a aplicação destes compostos em tratamento de águas naturais, determinou-se o efeito da matéria orgânica sobre a atividade da GSE por um período de até 120 min. Primeiramente foi avaliada se a peptona complexaria com o extrato ocorrendo a

consequente perda do teor de fenólicos totais (TFT), por Folin-Ciocalteu. O teor médio de fenólicos totais do GSE a 0,02% foi de 135 mg EAG (miligramas equivalentes de ácido gálico). A Figura 26 apresenta a curva de decaimento do TFT de GSE. Não foi observada variação significativa do TFT na presença de peptona a 0,2% por todo o período avaliado. Também não houve diferença quando a peptona foi utilizada em pH 6,8 e 2,5.

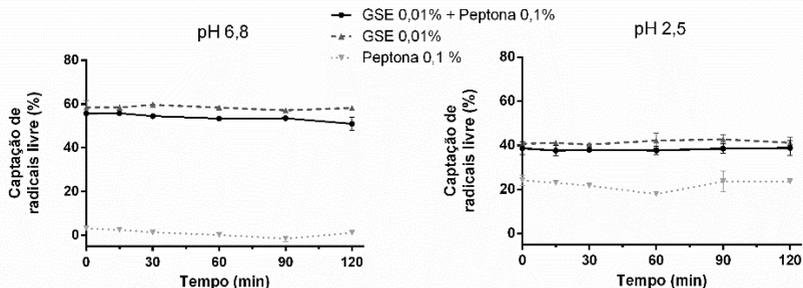
**Figura 26.** Curva de decaimento do teor de fenólicos totais do extrato de semente de uva (GSE) em contato com a peptona em pH 6,8 e 2,5.



Não havendo perda do TFT, foi mensurada a capacidade antioxidante, por DPPH, nas mesmas condições. A Figura 27 exibe a porcentagem de captação de radicais livre do GSE a 0,01% em contato com a peptona 0,1% por até 120 min. Em pH 6,8, o extrato de semente de uva nesta concentração captou entre 55 e 60% dos radicais livres, porém não foi observado um decaimento significativo da capacidade antioxidante no período avaliado.

Quando avaliado em pH 2,5, o GSE teve uma menor capacidade de captação de radicais livre, variando entre 36 e 46%. Porém, não foi observado o decaimento da atividade antioxidante durante os 120 min de contato com a peptona. Portanto, assume-se que a peptona não altera a atividade do GSE ao longo do tempo, nas concentrações testadas, mas há uma diminuição da atividade em pH ácido.

**Figura 27.** Curva de decaimento da porcentagem de captação de radicais livres do extrato de semente de uva (GSE) em contato com a peptona em pH 6,8 e 2,5.



#### 3.4.4 Avaliação da citotoxicidade dos compostos (NCT, BAT e GSE) *in vitro*

Para avaliar a citotoxicidade dos compostos em ensaios *in vitro*, diversas concentrações dos mesmos foram testadas frente a fibroblastos de gengiva humana (HGF) e células epiteliais de rim embrionário humano (HEK 293). Essas duas linhagens celulares foram escolhidas por estarem disponíveis no Laboratório de Virologia Aplicada por serem de células que mimetizam duas regiões anatômicas relevantes à presença *in vivo* dos compostos: a mucosa oral, pela ingestão e o trato renal pela excreção dos mesmos. Os valores médios de CC50 (concentração em que há perda de 50% da viabilidade celular) dos compostos em cada célula, comparados com as concentrações utilizadas nos experimentos de inativação de adenovírus estão relacionados na Tabela 18.

A NCT foi o composto que apresentou maior citotoxicidade, com valores de CC50 entre 10 e 100 vezes menores do que as concentrações utilizadas nos ensaios de inativação de rAdV-GFP. A BAT foi o composto com menor toxicidade para as duas células testadas e, juntamente com o GSE, tiveram os valores de CC50 superiores às concentrações previamente empregadas.

**Tabela 18.** Valores médios (e desvio padrão) de CC50 dos compostos NCT, BAT e GSE frente às linhagens celulares HGF e HEK 293 comparadas às concentrações utilizadas para os experimentos de inativação de adenovírus.

Compostos	Valores de CC50		Concentrações utilizadas no experimento de inativação
	HGF	HEK293	
NCT	0,021% (0,003)	0,001% (0,000)	1,0 – 0,25%
BAT	0,220% (0,040)	0,117% (0,001)	0,01 – 0,0025%
GSE	0,155% (0,011)	0,026% (0,005)	0,01 – 0,0025%

CC50: Concentração do composto que reduz em 50% a viabilidade celular

HGF: Fibroblasto de gengiva humano

HEK293: Células epiteliais de rim embrionário humano

### 3.5 Discussão

Os três compostos testados neste trabalho foram eficientes na inativação de adenovírus em água destilada, sendo que BAT a 0,01% foi o que se mostrou mais eficaz ocasionando um decaimento mais acentuado e rápido. Quanto à estabilidade desses compostos na presença de matéria orgânica, a NCT e o GSE permaneceram estáveis por mais tempo do que a BAT, que apresentou uma perda da capacidade oxidativa pronunciada. Em relação à citotoxicidade destes compostos, apenas a NCT demonstrou ser citotóxica para as linhagens celulares testadas em ensaios *in vitro*.

As cloraminas são compostos naturalmente presentes em granulócitos e monócitos humanos. Elas são formadas a partir da reação do ácido hipocloroso (HOCl), sintetizado por essas células, com compostos nitrogenados endógenos, como os aminoácidos. Dentre estes, a taurina é o mais prevalente em neutrófilos, representando cerca de 50%. A reação com este aminoácido gera a N-clorotaurina, um oxidante mais fraco que o HOCl, porém mais estável (WEISS et al., 1982; GRISHAM et al., 1984; GOTTARDI; NAGL, 2010).

A atividade microbicida da N-clorotaurina é bem conhecida. Gottardi e Nagl (2010) reportaram o decaimento superior a 5 logs na viabilidade de cepas de *Staphylococcus aureus* (inclusive resistente a meticilina), *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* quando tratado com NCT

a 1% por 1h. Quando testado em solução ácida (pH 5) a atividade bactericida foi potencializada (NAGL et al., 2000). Os fungos, em geral, são mais resistentes à inativação pela NCT. Também sob tratamento a 1%, algumas espécies do gênero *Candida* e *Aspergillus*, além de *Penicillium commune* necessitaram de 4h para atingir entre 3 e 4 logs de decaimento (GOTTARDI; NAGL, 2010). Protozoários (*Acanthamoeba* spp., *Leishmania* spp. e *Trichomonas vaginalis*) também demonstraram um rápido decaimento (menos de 1h) quando expostos à NCT 1%.

A ação da NCT na inativação de vírus também já foi reportada previamente. Em testes realizados com herpes simplex vírus (HSV-1 e HSV-2) foi observado a inativação de mais de 99,9% (3 logs) após 15 minutos utilizando NCT a 1%. Para o vírus da influenza e o HIV-1, o decaimento foi ainda mais acentuado, reduzindo mais de 5 logs no mesmo intervalo de tempo (NAGL; LARCHER; GOTTARDI, 1998; GOTTARDI; NAGL, 2010).

Especificamente para adenovírus humano sorotipo 5, Nagl, Larcher e Gottardi (1998) reportaram redução de 4 logs após 1h de tratamento com NCT a 1%. No presente estudo, foi constatado apenas 1,5 e 2,5 logs de decaimento após 1 e 2h, respectivamente, sob as mesmas condições (Figura 21). A variação na origem e sorotipo do adenovírus humano podem ser a causa das diferenças nos resultados observados. Em outro estudo com diversos sorotipos de adenovírus humanos, utilizando o mesmo tempo de contato e concentração de NCT, foi observado uma variação na redução entre 3 e 6 logs (ROMANOWSKI et al., 2006). A diferença nas técnicas de determinação do título viral nestes trabalhos também pode fornecer divergência nos resultados. Nagl, Larcher e Gottardi (1998) utilizaram imunofluorescência e células HeLa, enquanto Romanowski et al. (2006) fizeram uso de placa de lise e células A549. Na presente pesquisa, foram utilizadas células HEK293 e o adenovírus recombinante que expressa a proteína GFP.

Os adenovírus humanos podem ser cultivados e isolados usando diversas linhagens celulares incluindo BGMK, Caco-2, HeLa, HEp-2, KB, A549 PLC/PRF/5 e HEK293. No entanto, a eficiência da replicação do vírus em culturas de células varia de acordo com os sorotipos, assim como a susceptibilidade das linhagens celulares podem variar ligeiramente. A linhagem celular recomendada pela Agência Proteção Ambiental dos Estados Unidos para monitoramento da água é a BGMK. No entanto, tem sido um consenso de que HEK293, A549, PLC/PRF/5 e Caco-2 apresentam um melhor desempenho para avaliar infecciosidade de adenovírus (JIANG, 2006; JIANG et al., 2009). Em especial, as

células HEK293 tendem a ser mais apropriadas para a avaliação ambiental de contaminação por adenovírus humano, inclusive para os sorotipos fastidiosos (40 e 41) (JIANG et al., 2009).

Apesar da NCT ser um oxidante fraco, apresenta a capacidade de penetrar em membranas de patógenos. Dentro desses organismos, ela reage com compostos sulfatados, com destaque para os tiois (cisteína) e tioéteres (metionina), que são facilmente oxidados. Estes compõem diversos substratos vitais dentro dos patógenos, principalmente as enzimas e estruturas essenciais para sobrevivência. Dessa forma, a NCT é capaz de rapidamente inativar esses microrganismos (PESKIN; WINTERBOURN, 2001; GOTTARDI; DEBABOV; NAGL, 2013). Acredita-se que essa atividade oxidante em proteínas do capsídeo seja o principal fator de inativação do adenovírus. Essa reação de oxidação é irreversível, causando a perda da capacidade oxidativa (GOTTARDI; DEBABOV; NAGL, 2013). Dessa forma, a oxidação do capsídeo leva a perda de atividade do composto, impedindo que haja um decaimento linear da infecciosidade do adenovírus, sendo possível observar nos tempos de 60 e 120 min (Figura 21 e Tabela 13).

Um estudo preliminar foi realizado durante o presente trabalho, utilizando uma técnica de contabilização de microrganismos de DNA dupla fita, por citometria de fluxo, em água da torneira tratada com NCT a 1%. Após 1, 2 e 4h de contato, a ação do NCT foi interrompida e foi observado que não houve um decaimento na contagem de DNA total. No entanto, não foi constatado o crescimento microbiano na amostra tratada, mesmo após 8 dias da interrupção do tratamento. Esses resultados preliminares indicam que há perda da viabilidade microbiana, impedindo a replicação, porém sem efeitos iniciais ao DNA. No entanto, ao tratar a água da torneira por 2 dias ininterruptos, nenhum DNA foi detectado, indicando que a contínua presença de NCT na água pode ter efeitos tardios no material genético (resultados não apresentados).

A presença de matéria orgânica pode interferir diretamente na redução da capacidade oxidativa da NCT, diminuindo o poder de inativação de patógenos. No presente estudo foi constatado uma perda da capacidade oxidativa de 20 a 33% em concentrações de peptona de 2 e 5 vezes superior à de NCT, respectivamente, após 60 min (Figura 24). Gottardi e Nagl (2013) também reportaram alta estabilidade da NCT (aproximadamente a 0,15%) em peptona a 0,05%, em pH 6,8, após 10 min. Já na presença de 0,15% de SFB em pH 6,8, a atividade oxidante da NCT decaiu cerca de 20% no primeiro minuto de contato, mas permaneceu estável até o fim dos 10 minutos. Da mesma forma, os

autores não observaram diferença quando foi utilizando peptona e SFB em pH ácido (pH 4,5).

Estudos demonstram que a curva de decaimento de *S. aureus* e *E. coli*, após tratamento com NCT, é reduzida na presença de matéria orgânica. Este comportamento foi observado tanto na presença de peptona quanto com diferentes concentrações de sangue (10, 25, 50, 75 e 100%), sendo que, ao aumentar a concentração, maior foi o tempo necessário para a inativação dos patógenos (MARTINI et al., 2012; GOTTARDI; KLOTZ; NAGL, 2014).

Dados prévios de citotoxicidade corroboram os resultados observados no presente trabalho. Em geral, concentrações entre 0,01 e 0,02% de NCT são bem tolerados pelas células (dados não publicados). Apesar das concentrações utilizadas nos ensaios de inativação viral apresentarem citotoxicidade frente às duas linhagens celulares aqui testadas. No entanto, mais estudos devem ser realizados quanto à toxicidade aguda e crônica, visto que há uma diversidade de estudos clínicos que utilizam NCT a 1% sem efeitos colaterais.

A NCT apresenta alta tolerabilidade, sendo utilizada em uma diversidade de estudos clínicos. Ela apresentou a capacidade de reduzir inflamação em casos de otite aguda, sendo aplicada diretamente no canal do ouvido externo (NEHER et al., 2004). Ademais, Kanayama et al. (2002) demonstraram a capacidade da NCT regular citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL2, devido à oxidação da I $\kappa$ B $\alpha$ , inibindo a ativação do NF- $\kappa$ B, *in vitro*.

Outros estudos reportam a alta tolerância à NCT no trato urinário, na pele e ausência de toxicidade em mucosa nasal, *in vitro* (NAGL et al., 1998; 2003; HOFER et al., 2003; GOTTARDI, NAGL, 2010). Infecções do trato urinário por *P. aeruginosa*, foram tratadas com NCT a 1% via cateter, e foi observado um efeito bactericida e boa tolerabilidade ao composto (NAGL et al., 1998). Também a NCT foi eficiente ao tratar, de maneira tópica, úlceras na perna de pacientes, reduzindo o revestimento purulento sem apresentar toxicidade (NAGL et al., 2003). Além disso, a aplicação da solução aquosa de NCT a 1% em olhos de humanos e de coelhos se mostraram eficazes no tratamento de conjuntivites, apresentando nenhum ou mínimos efeitos adversos, como ardência após aplicação (NAGL et al., 2000; TEUCHNER et al., 2005; ROMANOWSKI et al., 2006).

Uma das desvantagens da aplicação da NCT, nas concentrações testadas, no tratamento da água é a geração de um odor semelhante ao do cloro e um forte sabor adstringente, quando imediatamente avaliado. No entanto, seria necessário avaliar se após o período de tratamento, o

odor e o sabor são perdidos. Contudo, o alto poder oxidativo na inativação de patógenos, a estabilidade na presença de matéria orgânica e a notória tolerabilidade, principalmente quando aplicado de forma tópica, permite inferir que a NCT tem potencial para ser utilizada no tratamento de águas com maior carga de matéria orgânica, como águas residuais, visando seu descarte ou uso para irrigação, como exemplos.

Poucos estudos reportam a atividade microbicida da Bromoamina-T. Porém, ela é um análogo da Cloramina-T (CAT), que já tem sua atividade antimicrobiana bem descrita. Contudo, já é conhecida a superior atividade de compostos bromados em relação aos análogos clorados. De acordo com Gottardi et al. (2014) a alta reatividade de compostos bromados infere que a inativação de patógenos seja mais rápida. Neste mesmo trabalho, os autores demonstraram que *E. coli* e *S. aureus* são sempre inativadas mais rapidamente nos compostos que possuem bromo em relação aos que possuem cloro.

Um estudo reportou a inativação de 4 logs de *E. coli* e *S. aureus* após 20 minutos, utilizando BAT em uma concentração aproximada de 0,0003%. Para a CAT, foram necessárias concentrações 25 e 10 vezes superiores para obter os mesmos resultados (GOTTARDI et al., 2014). Outra pesquisa que avaliou a atividade microbiana de BAT determinou que concentrações inferiores a 0,0025% foram eficientes na inativação de 5 logs de *C. albicans*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, após 1h de tratamento a 37°C (WALCZEWSKA et al., 2017). Também foi observada a redução da viabilidade de diversos fungos (resultados não publicados). No entanto, não há estudos reportando a ação da BAT em vírus. Assim, os dados para adenovírus aqui apresentados são inéditos e demonstraram a alta eficiência, reduzindo mais de 4 logs em 10 minutos, na concentração de 0,01% (Figura 22).

Ao contrário da NCT, a BAT apresentou um rápido decaimento da capacidade oxidativa na presença de matéria orgânica. Esse comportamento também foi observado por Gottardi e Nagl (2013), onde a atividade da BAT (aproximadamente a 0,3%) teve um rápido decaimento com um minuto de contato com peptona a 0,05% e SFB 0,15%, atingindo uma estabilidade de cerca de 50 e 10% da capacidade oxidativa, respectivamente. Neste mesmo estudo, notou-se uma acentuação da curva quando em pH ácido (pH 4,5), corroborando os dados obtidos no presente trabalho. Gottardi et al. (2014), também reportaram que a atividade microbicida da BAT é significativamente reduzida na presença de material proteico.

Em relação à citotoxicidade da BAT, os dados obtidos indicam uma tolerabilidade nas concentrações utilizadas nos ensaios de

inativação viral (Tabela 18). A concentração citotóxica calculada foi entre 5 e 10 vezes maior do que a relatada por Walczewska et al. (2017). Neste trabalho, os autores reportam que até a concentração 0,01% não há alteração na viabilidade celular de macrófagos murino J774.A1, mas em concentrações superiores a 0,015% há uma redução significativa.

Nas concentrações testadas e imediatamente após a adição da BAT, a água exibe uma cor amarela clara, mas com sabor e odor inferiores à apresentada com a NCT, sendo passível de ingestão. Da mesma forma, será necessário avaliar se essas características permanecem após o período de tratamento. No entanto, a baixa estabilidade na presença de matéria orgânica indica que este composto apresenta potencial para desinfecção de águas que tenham sido previamente tratadas.

A ação antibacteriana do GSE já é bem descrita na literatura. Concentrações de 0,008% foram capazes de inibir o crescimento de *Bacillus* spp. *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (JAYAPRAKASHA; SELVI; SAKARIAH, 2003; KAO et al., 2010; ADÁMEZ et al., 2012). Al Habib et al. (2010) verificaram a inibição de crescimento de MRSA em concentrações superiores a 0,03% de GSE. *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *E. coli*, *S. aureus* e *Brochothrix thermosphacta* também tiveram o crescimento inibido quando expostos ao extrato de semente de uva (CORRALES; HAN; TAUSHCER, 2009).

De acordo com D'Souza (2014), existe um recente interesse em utilizar produtos naturais antimicrobianos no controle e prevenção da transmissão de vírus entéricos humanos. Diversos estudos utilizaram fitocompostos, como de oxicoço e mirtilo (gênero *Vaccinium*), romã (*Punica granatum*) e extrato de semente de uva (gênero *Vitis*) para avaliar a ação direta na inativação viral. Em geral, todos apresentaram um efeito virucida frente à norovírus murino, calicivírus felino ou bacteriófago MS2.

Ainda poucos estudos reportam ação do extrato de semente de uva na inativação viral. Su e D'Souza (2011) e Joshi, Su e D'Souza (2015) demonstraram que uma solução etanólica foi capaz de inativar até 5 logs de calicivírus felino em concentrações 0,025%, após 2h. No entanto, os vírus MNV-1, MS2 e vírus da hepatite A, foram mais resistentes, com cerca de 1 a 2 logs de inativação após o mesmo período, com concentrações de GSE entre 0,025 e 0,1%. Em outro trabalho, foi observado um decaimento superior a 3 logs da infeciosidade de MNV-1 e de 1 log de cópias genômicas de norovírus humano GII.4, após 1h de tratamento com o extrato a 0,1% (LI et al., 2012).

No presente trabalho foi observada uma inativação de adenovírus de 2,5 logs após 2 h de tratamento, em concentração de 0,01% (Figura 23). No entanto, o extrato foi dissolvido inicialmente em DMSO, diferentemente das pesquisas anteriores, que utilizaram soluções aquosas/etanólicas ou PBS para dissolução. A diferença no solvente pode ser um motivo para detectar semelhantes níveis de decaimento viral, porém com concentrações menores. Optou-se pelo emprego do DMSO no presente trabalho devido a sua alta eficiência em solubilizar o GSE, sem formação de precipitado, observado quando dissolvido em água. A diferença estrutural entre os vírus também pode ser um fator para apresentar divergências entre as concentrações e curvas de decaimento entre os constatados aqui e nos demais trabalhos. Ressalta-se que nenhum estudo foi ainda realizado avaliando a ação virucida do GSE frente ao adenovírus humano, sendo que esses resultados são dados inéditos.

O mecanismo de ação do extrato de semente de uva na inativação viral ainda não é precisamente conhecido. Em geral, os vírus envelopados são mais susceptíveis do que os não-envelopados a tratamentos com fitocompostos (BRIGHT; GILLING, 2016). Sabe-se que há uma alta afinidade de interação de compostos fenólicos com proteínas (OZDAL; CAPANOGLU; ALTAY, 2013; JAKOBEK, 2015). Este fator pode indicar que os compostos do GSE podem se ligar às proteínas do capsídeo viral e impedir a adsorção às células.

Su e D'Souza (2011) verificaram que a redução da infecciosidade é maior quando os vírus são tratados previamente com o GSE do que após a adsorção à célula, indicando uma ação no capsídeo viral. Li et al. (2012) observaram um aumento no diâmetro do norovírus e um aumento de fragmentos proteicos, indicando degradação do capsídeo. No entanto, Joshi, Su e D'Souza (2015) não verificaram alterações morfológicas nos vírus estudados após tratamento com GSE, sugerindo que há um bloqueio dos receptores. Apesar de não ter evidências da ação do GSE direta no material genético, resultados preliminares apontam que há uma diminuição na detecção de DNA dupla fita na água da torneira tratada com GSE por 8h e 72h consecutivas (resultados não apresentados).

A aplicação do GSE para o tratamento de amostras ambientais (alimentos e águas) é ainda incipiente. O extrato foi utilizado em concentrações de 0,025 e 0,1% em água utilizada para lavar alfaces e pimenta. Como resultado, os autores observaram um decaimento viral superior a 3 logs na superfície destas plantas após 1 min de lavagem (SU; D'SOUZA, 2013). Li et al. (2012) avaliaram a inativação de

MNV-1 em água de lavagem de alface e água de torneira. Foi constatado que há uma inativação de 1 e 2 logs na água de torneira com concentrações de 0,02 e 0,2% de GSE, respectivamente, após 1h de tratamento, sendo o decaimento semelhante na água de lavagem.

Sugere-se que a ação antimicrobiana do GSE pode permanecer estável, mesmo em águas com maior carga orgânica. Quando aplicado em água de lavagem de alface, contendo diferentes concentrações de demanda química de oxigênio (entre 500 e 1500 mg/L), não foi observado diferença significativa na inativação de MNV-1, em relação à água da torneira. No entanto, trabalhos também reportam que a ação virucida é inibida quando o GSE na presença de leite (LI et al., 2012; JOSHI; SU; D'SOUZA, 2015). O uso de DMEM suplementado com 15% de SFB como solução de bloqueio da ação do GSE nos experimentos de inativação é um indicativo que altas cargas orgânicas podem influenciar a atividade microbicida. Porém, aparenta exibir alta tolerabilidade visto que, com concentrações de peptona 10 vezes superior ao de GSE, não há alteração no teor de fenólicos totais e na atividade antioxidante (Figuras 26 e 27).

Apesar de não ser observado diferença no teor de fenólicos totais de GSE nos dois pH testados, a captação de radicais livres foi significativamente menor em contato com a peptona ácida (pH2,5) (Figuras 26 e 27). Sabe-se que a variação de pH pode influenciar a atividade antioxidante de fitocompostos (JOVANOVIĆ et al. 1994). Outros estudos também reportaram que compostos fenólicos em pH mais ácido perdem tal atividade (KUNAMOTO et al., 2001; GLISZCZYŃSKA-SWIGŁO; MUZOLF, 2007; GOSH; CHAKRABORTY, 2015). Bayliak et al. (2016) concluíram que o pH alcalino também pode afetar a estabilidade de compostos fenólicos, reduzindo a atividade antioxidante. Acredita-se que a perda da estabilidade oxidante do composto e a alteração estrutural podem ser responsáveis pela diminuição da capacidade antioxidante em pH ácido (HUANG et al., 1996; VAN ACKER et al., 1996; GOSH; CHAKRABORTY, 2015).

Quanto à toxicidade, o GSE apresentou valores de CC50 em concentração de 0,15% para a linhagem celular HGF e 0,02% para a HEK293. Para células CRFK (epitélio de rim felino), RAW264.7 (macrófago murino) e FRhK4 (epitélio de rim de macaco) as concentrações que foram observadas citotoxicidade foram 0,06, 0,04 e 0,08%, respectivamente (SU; D'SOUZA, 2011). Estudos em camundongos e ratos mostraram que o consumo de GSE não apresentou toxicidade aguda oral e efeitos adversos, sendo determinado que cerca 2

g/kg de peso corporal/ dia é a dose necessária para causar letalidade nos animais estudados (BENTIVEGNA; WHITNEY, 2002; YAMAKOSHI et al., 2002; LLUÍS et al., 2011). Em humanos, foram testados a ingestão de GSE e resveratrol (polifenol presente na semente de uva) por aproximadamente 4 semanas em doses de até 5 g por dia e não foi observado toxicidade ou efeitos colaterais severos (BROWN et al., 2010; SANO, 2017).

A adição de GSE na água gera coloração marrom clara, sem odor e com sabor suave, mas com possibilidade de ingestão. Essas características organolépticas podem variar após o período de tratamento, mas futuras investigações necessitam ser realizadas. De forma aplicada, a eficiência na inativação de patógenos, a alta estabilidade na presença de matéria orgânica e baixa toxicidade, permitem recomendar o GSE para o tratamento de diferentes águas naturais, com baixa e alta cargas de matéria orgânica.

Os resultados obtidos demonstram o potencial do uso de compostos naturais e sintéticos na desinfecção de águas naturais. No entanto, mais pesquisas necessitam ser realizadas para poder aplicar a NCT, a BAT e o GSE de forma segura. Neste trabalho, apenas foi possível inferir a ação dos compostos na presença de matéria orgânica. Assim, ensaios de inativação de microrganismos precisam ser feitos em diferentes águas naturais, com variadas concentrações de matéria orgânica. Além disso, é necessário investigar se existe a formação de subprodutos ao tratar amostras com esses compostos. Futuramente, a combinação deles também poderá ser estudada para o tratamento, reduzindo a concentração individual de cada. Ainda, os benefícios da ingestão destes compostos também podem ser avaliados, visto suas propriedades anti-inflamatórias (NCT e BAT) e antioxidante (GSE).

### 3.6 Conclusões

- O composto NCT foi capaz de inativar adenovírus em água e tem sua atividade oxidativa diminuída vagarosamente na presença de matéria orgânica, podendo ser recomendado para águas sujas. Contudo, mais estudos de toxicidade devem ser realizados;
- A BAT foi a mais eficiente na inativação de adenovírus, porém tem uma perda acentuada da atividade oxidativa na presença de matéria orgânica. Também não apresentou citotoxicidade nas concentrações testadas, tendo potencial para a desinfecção de águas previamente tratadas;
- O GSE foi eficiente na inativação viral e não apresentou citotoxicidade nas concentrações testadas. Sua estabilidade na presença de matéria orgânica sugere que tem potencial para o tratamento de águas tratadas e sujas.

## DISCUSSÃO GERAL

Milhões de pessoas não tem água potável para consumo, nem água encanada e tratada em casa. A problemática da qualidade da água se agrava quando bilhões de pessoas não tem instalações sanitárias adequadas. Além disso, grande parte dos dejetos e esgotos são despejados nos corpos d'água sem o devido tratamento, levando à contaminação dos mananciais superficiais e subterrâneos (ONU 2010; 2011).

A população que recebe água tratada em casa, ela passa por um tratamento físico-químico e desinfecção. No entanto, mesmo que o tratamento seja eficiente, não há garantia que a água chegue com qualidade nas residências, pois pode haver contaminação durante a rede de distribuição. Craun et al. (2010) reportaram que, dos surtos relacionados ao consumo de água entre 1971 e 2006 nos Estados Unidos, em 50% foram detectadas falhas no tratamento ou distribuição.

As normas de potabilidade da água são regidas por leis internacionais e nacionais. No Brasil a norma em vigor está presente no Anexo XX da Portaria de Consolidação nº5, de 28 de setembro de 2017, do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). No entanto, de acordo com Associação Internacional da Água, os padrões de potabilidade deveriam atender a proteção da saúde humana e a aceitabilidade do consumidor (AIA, 2004).

Neste sentido, pesquisas públicas sobre a percepção e satisfação são essenciais para identificar quão satisfeitos estão os consumidores com o produto que lhes é oferecido. Além do conhecimento fornecido, estudos deste modelo podem servir de base para propostas de melhorias pelos órgãos responsáveis pelo serviço, visto que a população tem a capacidade de detectar diferenças na qualidade da água (DIETRICH, 2006; DORIA, 2010). Porém, estas pesquisas no Brasil são escassas ou pouco representativas. Trabalhos reportam o a entrevista entre 30 e 60 pessoas, sendo o sabor e material suspenso as principais causas de insatisfação (DA SILVA et al., 2010; FREITAS et al., 2012; DE QUEIROZ et al., 2013).

O presente trabalho realizou um inquérito com 581 participantes em Florianópolis e identificou que menos de 7% consomem água diretamente da torneira, sendo a insegurança e o sabor os principais motivos. Além disso, menos de 40% estavam satisfeitos com a qualidade da água distribuída e cerca de 30% avaliam que a água piora na estação do verão. Ainda, por meio de regressão logística, pode-se observar que os moradores que viviam próximos das estações de

tratamento tem menores chances reportar o odor como satisfatório em relação àqueles que moravam distante.

As coletas de água mostraram que grande número de amostras em desacordo com a legislação de água de consumo, principalmente nos parâmetros físico-químicos. Ademais, pode-se inferir que há falhas no sistema de tratamento ou distribuição devido a presença de coliformes totais (32% das amostras) e adenovírus humano viável. Assim, é necessário que haja um esforço em diminuir a contaminação dos mananciais e durante a distribuição. Recomenda-se uma maior fiscalização pelos órgãos responsáveis para que água atenda os padrões de potabilidade estabelecidos. que sejam realizadas amostragens mais frequentes em períodos específicos, como no verão e após fortes chuvas, onde há um aumento na contaminação da água. Sugere-se também que sejam realizadas mais análises de sabor, cor e odor do que o estabelecido pela legislação, visando a satisfação do consumidor.

O uso do tanque com luz ultravioleta proposto neste trabalho poderia ser um produto a ser utilizado em domicílios, redes de ensino infantil e hospitais, visto que pode haver contaminação durante a rede de distribuição. Ele garantiria a diminuição da turbidez, retendo material suspenso no filtro, e em poucas horas seria capaz de inativar possíveis microrganismos presentes na água. Também reduziria a concentração de cloro residual livre, melhorando a percepção de sabor e odor do consumidor.

No entanto, 15% da população brasileira não recebe água tratada e encanada em casa (IBGE, 2015). Em geral essas pessoas vivem em áreas descentralizadas, onde o consumo de água é realizado diretamente de águas providas de mananciais, sem tratamento prévio. Devido às altas concentrações de matéria orgânica nessas águas, o cloro pode não ser a melhor opção de desinfecção, por formar subprodutos tóxicos, como os trihalometanos. Nestes casos, o tanque de luz UV proposto também seria uma alternativa para garantir um consumo seguro.

Outra alternativa para a desinfecção de água em áreas descentralizadas ou em situações emergenciais é o uso dos compostos naturais e sintéticos. Neste trabalho foi proposto estudar três deles: a N-clorotaurina (NCT), a Bromoamina-T (BAT) e o extrato de semente de uva (GSE). Alguns estudos já reportavam a ação microbicida destes compostos e ausência de toxicidade em ensaios *in vivo* (YAMAKOSHI et al., 2002; GOTTARDI & NAGL, 2010; SU & D'SOUZA, 2011; GOTTARDI, et al., 2013).

Contudo, a aplicação destes compostos objetivando o tratamento e remediação de água é incipiente. Joshi, Su e D'souza (2015) aplicaram o GSE em água de torneira e água de lavagem de alface. Já para a NCT e a BAT a proposta desta aplicação foi originalmente proposto no presente trabalho. Os três compostos se demonstraram eficientes na inativação de vírus, porém apresentaram diferença na estabilidade na presença de matéria orgânica. Assim, sugere-se potenciais aplicações para eles, desde águas mais sujas, como residuárias ou para irrigação, como para consumo direto. Mas mais estudos necessitam ser conduzidos para avaliar a efetividade e segurança nestas aplicações.

A água de consumo é considerada um direito humano, a qual deveria ser garantida em quantidade suficiente, segura, acessível, aceitável e a um preço um justo. Assim, as empresas responsáveis pelo tratamento e distribuição de água deveriam considerar a satisfação do consumidor e garantir que os padrões de potabilidade sejam cumpridos. Ainda, a pesquisa de alternativas seguras de tratamento e desinfecção de água são essenciais, principalmente para as pessoas que vivem em áreas descentralizadas. Portanto, a busca do aprimoramento da qualidade da água de consumo é necessária até que os problemas relacionados a elas sejam minimizados para todas as pessoas.

## PPERPECTIVAS

A pesquisa pública de satisfação e percepção da qualidade da água é importante para compreender a aceitabilidade do consumidor e buscar melhorias no serviço de tratamento e distribuição. Sendo o primeiro estudo desta magnitude no Brasil, espera-se que o presente trabalho possa ser utilizado como um substrato para futuras pesquisas nesta área.

A partir dos dados reportados sobre os parâmetros físico-químicos e microbiológicos da água de consumo em Florianópolis, é sugerido aumentar a fiscalização das análises. Além disso, a inspeção e manutenção mais frequente das redes de distribuição poderia diminuir a contaminação da água.

Espera-se que o tanque com luz UV possa ser utilizado como um produto em domicílio, o qual faria a inativação de patógenos que possam estar presentes, além de reduzir a concentração de cloro devido a circulação da água. Também pode ser utilizado em escala descentralizada, como em comunidades isoladas e rurais.

O estudo de compostos naturais e sintéticos visando a remediação de águas ainda é incipiente. A NCT, a BAT e o GSE testados neste trabalho apresentaram potencial para o tratamento de diferentes tipos de água. No entanto, novas investigações devem averiguar a inativação de patógenos em diferentes fontes de água, a formação de subprodutos e benefícios e malefícios do consumo. Da mesma forma, novos compostos podem ser estudados visando o tratamento de água de consumo em situações emergenciais ou para serem usadas na irrigação ou ainda no descarte seguro.

## REFERÊNCIAS

- ADÁMEZ, J. D. et al. *In vitro* estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (*Vitis vinifera* L.). **Food control**, v. 24, n. 1-2, p. 136 – 141, 2012.
- AIA – Associação Internacional da Água. **The Bonn Charter for Safe Drinking Water**. IWA, London, p. 1 – 20, 2004.
- AL-HABIB, A. et al. Bactericidal effect of grape seed extract on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 35, n. 3, 357 – 364, 2010.
- AMARAL, L. A. et al. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 3, p. 510-514, 2003.
- ANA – Agência Nacional de Águas. **Atlas do abastecimento urbano de água**. 2010. Disponível em: <<http://atlas.ana.gov.br/Atlas/forms/analise/Geral.aspx?est=4>>, acessado em dezembro de 2017.
- ASHBOLT, N. J. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. **Toxicology**, v. 198, n. 1-3, p. 229–238, 2004.
- ASHBOLT, N. J. Microbial Contamination of Drinking Water and Human Health from Community Water Systems. **Current Environmental Health Reports**, v. 2, n. 1, p. 95–106, 2015.
- BAERT, L.; DEBEVERE, J.; UYTENDAELE, M. The efficacy of preservation methods to inactivate foodborne viruses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, n. 2-3, p. 83–94, 2009.
- BARCELLOS, C. M. et al. Avaliação da qualidade da água e percepção higiênico-sanitária na área rural de Lavras, Minas Gerais, Brasil, 1999-2000. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 9, p. 1967–1978, 2006.
- BAYLIAK, M. M.; BURDYLIUK, N. I.; LUSHCHAK, V. I. Effects of pH on antioxidant and prooxidant properties of common medicinal herbs. **Open Life Sciences**, v. 11, n. 1, p. 298 – 307, 2016.
- BECK, S. E. et al. Wavelength dependent UV inactivation and DNA damage of adenovirus as measured by cell culture infectivity and long range quantitative PCR. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 1, p. 591–598, 2014.
- BECK, S. E. et al. Comparison of UV-Induced Inactivation and RNA Damage in MS2 Phage across the Germicidal UV Spectrum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 5, p. 1468-1474, 2015.
- BEER, K. D. et al. Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks Associated with Drinking Water – United States, 2011-2012. **Morbidity**

- and Mortality Weekly Report**, v. 64, n. 31, p. 842–848, 2015.
- BENTIVEGNA, S. S.; WHITNEY, K. M. Subchronic 3-month oral toxicity study of grape seed and grape skin extracts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 12, p. 1731 – 1743, 2002.
- BOFILL-MAS, S. et al. Quantification of Human and Animal Viruses to Environmental Samples. **BioMed Research International**, v. 2013, 11p. 2013.
- BOSCH, A. et al. 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.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food and Science Technology**, v. 28, p. 25 – 30, 1995.
- BRASIL. **Boas práticas no abastecimento de água: procedimentos para a minimização de riscos à saúde**. Brasília, DF: 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Análise de indicadores relacionados à água para consumo humano e doenças de veiculação hídrica no Brasil, ano 2013, utilizando a metodologia da matriz de indicadores da Organização Mundial da Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.
- BRIGHT, K. R.; GILLING, D. H. Natural virucidal compounds in foods. In: GOYAL S.; CANNON J. (eds) **Viruses in Foods. Food Microbiology and Food Safety**. Springer: Cham, p. 449 – 469, 2016.
- BROWN, V. A. et al. Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics and effect on the insulin-like growth factor axis. **Cancer Research**, v. 70, n. 22, p. 9003 – 9011, 2010.
- BUDZIAK, D.; CARASEK, E. Determination of trihalomethanes in drinking water from three different water sources in Florianopolis-Brazil using purge and trap and gas chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 4, p. 741–747, 2007.
- CALGUA, B. et al. 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. et al. 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, n. 8, p. 2797–810, 2013.
- CANNON, J. L. et al. Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: A comparison of murine norovirus and feline calicivirus. **Journal of food protection**, v. 69, n. 11, p. 2761–2765, 2006.

- CANTOR, K. P. et al. Bladder cancer, drinking water source, and tap water consumption: a case-control study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 79, n. 6, p. 1269–79, 1987.
- CARRATALÀ, A. et al. Environmental effectors on the inactivation of human adenoviruses in water. **Food and Environmental Virology**, v. 5, n. 4, p. 203–214, 2013.
- CASAN – Companhia Catarinense de Águas e Saneamento. **Relatório anual de qualidade da água distribuída**, p. 1 – 4, 2015.
- CASAN – Companhia Catarinense de Águas e Saneamento. 2017. Disponível em: <<http://www.casan.com.br/#0>>, acessado em dezembro de 2017.
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention. 2011. Morbidity and Mortality Weekly Report: **Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines**, v. 60.
- CEPED - Centro Universitário de Estudos e Pesquisas sobre Desastres. Atlas brasileiro de desastres naturais 1991 a 2010: volume Brasil. **Relatórios Técnicos**, 94pp., 2012.
- CESA, M. DE V. **Água e outros fatores socioambientais na ocorrência das doenças de veiculação hídrica na Ilha de Santa Catarina**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina. 273p. 2013.
- CESA, M.; FONGARO, G.; BARARDI, C. R. M. Waterborne diseases classification and relationship with social-environmental factors in Florianópolis city - Southern Brazil. **Journal of Water and Health**, v. 14, n. 2, p. 340–348, 2016.
- CHEREMISINOFF, N.P. **Handbook of Water and Wastewater Treatment Technologies**. Butterworth Heinemann, Woburn, MA, USA, 2002.
- CORCORAN, E. et al. **Sick water? The central role of wastewater management in sustainable development**. United Nations Environment Programme, UN-HABITA. 88p. 2010.
- CORRALES, M.; HAN, J. H.; TAUSCHER, B. Antimicrobial properties of grape seed extracts and their effectiveness after incorporation into pea starch films. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 425 – 433, 2009.
- CRAUN, G. F. et al. Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 507–528, 2010.
- CROMEANS, T. L. et al. Development of plaque assays for adenoviruses 40 and 41. **Journal of Virological Methods**, v. 151, n. 1, p. 140–145, 2008.

- 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. 1028–1033, 2010.
- D'AGUILA, P. S. et al. Avaliação da qualidade de água para abastecimento público do Município de Nova Iguaçu. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, n. 3, p. 791–798, 2000.
- D'SOUZA, H. D. Phytocompounds for the control of human enteric viruses. **Current Opinion in Virology**, v. 4, p. 44 – 49, 2014.
- DA SILVA, S. R. et al. Relationship (or its lack) between population and a water and sanitation service: A study of users' perception in Vitória (ES) Brazil. **Journal of Water and Health**, v. 8, n. 4, p. 764–778, 2010.
- DE QUEIROZ, J. T. M. et al. Perceptions of bottled water consumers in three Brazilian Municipalities. **Journal of Water and Health**, v. 11, n. 3, p. 520–531, 2013.
- 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.
- DIETRICH, A. M. Aesthetic issues for drinking water. **Journal of Water and Health**, v. 4, n. SUPPL. 1, p. 11–16, 2006.
- DORIA, M. F. Bottled water versus tap water: Understanding consumer's preferences. **Journal of Water and Health**, v. 4, n. 2, p. 271–276, 2006.
- DORIA, M. F. Factors influencing public perception of drinking water quality. **Water Policy**, v. 12, n. 1, p. 1–19, 2010.
- DORIA, M. F.; PIDGEON, N.; HUNTER, P. R. Perceptions of drinking water quality and risk and its effect on behaviour: A cross-national study. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 21, p. 5455–5464, 2009.
- EISCHEID, A. C.; LINDEN, K. G. Molecular indications of protein damage in adenoviruses after UV disinfection. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 3, p. 1145–1147, 2011.
- EISCHEID, A. C.; MEYER, J. N.; LINDEN, K. G. UV disinfection of adenoviruses: Molecular indications of DNA damage efficiency. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 23–28, 2009.
- EITZINGER, C. et al. N-chlorotaurine, a long-lived oxidant produced by human leukocytes, inactivates shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **PLOS one**, v. 7, n. 11, p. 13, 2013.

- EPAGRI-CIRAM – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – Centro de Informações de Recursos Ambientais e Hidrometeorologia de Santa Catarina. **Atlas Climatológico**, 2015. Disponível em: <<http://www.ciram.epagri.sc.gov.br/>>, acessado em dezembro de 2017.
- ERSOY, Y. et al. Outbreak of adenovirus serotype 8 conjunctivitis in preterm infants in a neonatal intensive care unit. **The Journal of hospital infection**, v. 80, n. 2, p. 144–9, 2012.
- ESPOSITO, D.H., et al. An outbreak of pneumonia associated with emergent human adenovirus serotype 14 - Southeast Alaska, 2008. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, p. 214–222, 2010.
- ESSEILI, M. A.; WANG, Q.; SAIF, L. J. Binding of human GII.4 norovirus virus-like particles to carbohydrates of romaine lettuce leaf cell wall materials. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 3, p. 786–794, 2012.
- FAWELL, J. Contaminants in drinking water. **British Medical Bulletin**, v. 68, n. 1, p. 199–208, 2003.
- FERREIRA, A. P.; DA CUNHA, C. L. N. Exposure assessment and the risk associated with trihalomethanes exposure assessment and the risk associated with compounds in trihalometanos na água potável. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 25, n. 1, p. 5–12, 2012.
- FIOCRUZ – Fundação Instituto Oswaldo Cruz. **Avaliação do Desempenho do Sistema de Saúde**. 2011. Disponível em: <<http://www.proadess.icict.fiocruz.br/>>, acessado em dezembro de 2017.
- FIOCRUZ – Fundação Instituto Oswaldo Cruz. **Sistema de avaliação da qualidade da água, saúde e saneamento**. 2012. Disponível em: <<http://www.aguabrasil.icict.fiocruz.br/index.php>>, acessado em dezembro de 2017.
- FONGARO, G. et al. Evaluation and molecular characterization of human adenovirus in drinking water supplies: viral integrity and viability assays. **Virology journal**, v. 10, p. 166, 2013.
- FONGARO, G. et al. Molecular and Cell Culture Methods for evaluation of Viral Contamination in Environmental Samples Using Human Adenoviruses as Model. In: **Epidemiology II – Theory, Research and Practice**. 1 ed. iConcept Press. 2014.
- FREITAS, I. S. et al. Percepção social acerca da qualidade da água de abastecimento público da comunidade do Planalto Renascer, Quixadá/Ce. **VII Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação**. 5p. 2012.
- GARCIA, L. A. T.; NASCIMENTO, M. A.; BARARDI, C. R. M.

Effect of UV light on the inactivation of recombinant human adenovirus and murine norovirus seeded in seawater in shellfish depuration tanks.

**Food and environmental virology**, v. 7, n. 1, p. 67–75, 2015.

GASSILLOUD, B.; GANTZER, C. Adhesion-aggregation and inactivation of Poliovirus 1 in groundwater stored in a hydrophobic container. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 2, p. 912–20, 2005.

GEORGE, C. S.; TYLER, A. L. **Water dispensing apparatus with water recirculation line**. World Intellectual Property Organization. US n°2006006104, 7 jul. 2004, 12 jan. 2006.

GLEICK, P. H. The Myth and Reality of Bottled Water. **The World's Water, The Biennial Report on Freshwater Resources: 2004-2005**, p. 17–43, 2004.

GLISZCZYŃSKA-SWIGŁO A.; MUZOLF, M. pH-Dependent radical scavenging activity of folates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 20, p. 8237 – 8246, 2007.

GOMES, K.; EBRARY, I. Wastewater management: A UN-Water Analytical Brief. **UN Water**, p. 55, 2009.

GONZALEZ-HERNANDEZ, M.B.; CUNHA, J.B.; WOBUS, C.E. Plaque assay for murine norovirus. **Journal of Visualized Experiments**, v. 66, s/p. 2012.

GOSH, S.; CHAKRABORTY, R. Determination of pH-dependent antioxidant activity of palm (*Borassus flabellifer*) polyphenol compounds by photoluminol and DPPH methods: a comparison of redox reaction sensitivity. **3 Biotech**, v. 5, n. 5, p. 633 – 640, 2015.

GOTTARDI, W.; DEBABOV, D.; NAGL, M. *N*-chloramines, a promising class of well-tolerated topical anti-infectives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 1107 – 1114, 2013.

GOTTARDI, W.; KLOTZ, S.; NAGL, M. Superior bactericidal activity of *N*-bromine compounds compared to their *N*-chlorine analogues can be reversed under protein load. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 6, p. 1427 – 1437, 2014.

GOTTARDI, W.; NAGL, M. Chemical properties of *N*-chlorotaurine sodium, a key compound in the human defence system. **Archiv der Pharmazie - Pharmaceutical and Medicinal Chemistry**, v. 335, n. 9, p. 411 – 421, 2002.

GOTTARDI, W.; NAGL, M. *N*-chloritaurine, a natural antiseptic with outstanding tolerability. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 399 – 409, 2010.

GOTTARDI, W.; NAGL, M. Active halogen compounds and proteinaceous material: loss of activity of topical anti-infectives by

- halogen consumption. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 213 – 218, 2013.
- GOULD, E. A. Methods for long-term virus preservation. **Molecular biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 57–66, 1999.
- GREEN, K. Y. Caliciviridae: the noroviruses. In: KNIFE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**, 6 ed., vol.1, Lippincott Williams & Wilkins. p. 582 – 608, 2013.
- GRISHAM, B. M. et al. Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophil. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 16, p. 10404 – 10413, 1984.
- GRISOTTI, M. Doenças infecciosas emergentes e a emergência das doenças: uma revisão conceitual e novas questões. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, p. 1095–1104, 2010.
- GRUBER, J. S.; ERCUMEN, A.; COLFORD, J. M. Coliform bacteria as indicators of diarrheal risk in household drinking water: Systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 14p. 2014.
- HASSEN, A. et al. UV disinfection of treated wastewater in a large-scale pilot plant and inactivation of selected bacteria in a laboratory UV device. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 2, p. 141–150, 2000.
- HIJNEN, W. A. M.; 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.
- HOFER, E. et al. In vitro study on the influence of N-chlorotaurine on the ciliary beat frequency of nasal mucosa. **American Journal of Rhinology**, v. 17, n. 3, p. 149 – 152, 2003.
- HUANG, S. et al. Effect of pH on antioxidant activity of  $\alpha$ -Tocopherol and Trolox in oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 2496 – 2502, 1996.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais. **Laudo Técnico Preliminar**, v. 1, p. 2–35, 2015.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo demográfico de 2010**. Rio de Janeiro, 2010.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa nacional por amostra de domicílios – síntese de indicadores**. Rio de Janeiro, p. 347pp., 2015a.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores de desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro, 102pp., 2015b.

- III, R. S. D.; DAY, R. S. Studies on repair of adenovirus 2 by human fibroblasts using normal, xeroderma pigmentosum, and xeroderma pigmentosum heterozygous Strains. **Cancer Research**, v. 1161, s.n., p. 1965–1970, 1974.
- JAKOBEK, L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. **Food Chemistry**, v. 175, p. 556 – 567, 2015.
- JAYAPRAKASHA, G. K.; SELVI, T.; SAKARIAH, K. K. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. **Food Research International**, v. 36, n. 2, p. 117 – 122, 2003.
- JEAN, J. et al. Inactivation of hepatitis A virus and norovirus surrogate in suspension and on food-contact surfaces using pulsed UV light (pulsed light inactivation of food-borne viruses). **Food Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 568–572, 2011.
- JIANG, S.C. Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 23, p. 7132 – 7140, 2006.
- JIANG, S.C. et al. Evaluation of four cell lines for assay of infectious adenoviruses in water samples. **Journal of Water and Health**, v. 7, n. 4, p. 650 – 656, 2009.
- JONES, A. Q. et al. Drinking water consumption patterns of residents in a Canadian community. **Journal of Water and Health**, v. 4, n. 1, p. 125–138, 2006a.
- JONES, A. Q. et al. Public perceptions of drinking water: a postal survey of residents with private water supplies. **BMC public health**, v. 6, p. 94, 2006b.
- JONES, T. L.; BAXTER, M. A.; KHANDUJA, V. A quick guide to survey research. **Annals of Royal College of Surgeons of England**, v. 95, n. 1, p. 5–7, 2013.
- JOSHI, S. S.; SU, X.; D’SOUZA, D. H. Antiviral effects of grape seed extract against feline calicivirus, murine norovirus, and hepatitis A virus in model food systems and under gastric conditions. **Food Microbiology**, v. 52, p. 1 – 10, 2015.
- JOVANOVIC, S. et al. Flavonoids as antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 11, p. 4846 – 4851, 1994.
- JUNG, I.K.; JOONG, H.K.; YOUNG, J.L. **Dipping type UV sterilization system capable of coercively circulating water in the water storage tank in certain time intervals by a circulation pump attached to a water storage tank**. World Intellectual Property Organization. KR n° KR1020050115348, 02 jun. 2004, 07 dez. 2005.
- KAHLER, A. M. et al. 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.
- KANAYAMA, A. et al. Oxidation of IκBα at methionine 45 is one cause of taurine chloramine-induced inhibition of NF-κB activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 27, p. 24049 – 24056, 2002.
- KAO, T. et al. Grape seed extract inhibits the growth and pathogenicity of *Staphylococcus aureus* by interfering with dihydrofolate reductase activity and folate-mediated one-carbon metabolism. **International Journal of Food and Microbiology**, v. 141, n. 1-2, p. 17 – 27, 2010.
- KING, W. D.; MARRETT, L. D. Case-control study of bladder cancer and chlorination by-products in treated water (Ontario, Canada). **Cancer Causes and Control**, v. 7, n. 6, p. 596–604, 1996.
- KLUGE, M. et al. Human adenovirus (HAdV), human enterovirus (hEV), and genogroup A rotavirus (GARV) in tap water in southern Brazil. **Journal of Water and Health**, v. 12, n. 3, p. 526–532, 2014.
- KUNAMOTO, M. et al. Effects of pH and metal ions on antioxidative activities of catechins. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, n. 1, p. 126 – 132, 2001.
- LA ROSA, G. et al., Emerging and potentially emerging viruses in water environments. **Annali dell’Istituto Superiori di Sanità**, v. 48, p. 397-406, 2012.
- LANDRY, M.L. et al. Adenovirus type 3 outbreak in Connecticut associated with a novel variant. **Journal of Medical Virology**, v. 81, p. 1380-1384, 2009.
- LE GUYADER, F. S. et al. Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 931–936, 2006.
- LEAVENS, T. L. et al. Disposition of bromodichloromethane in humans following oral and dermal exposure. **Toxicological Sciences**, v. 99, n. 2, p. 432–445, 2007.
- LECHEVALLIER, M. W.; AU, K.-K. **Water Treatment and Pathogen Control: Process efficiency in achieving safe drinking-water**. WHO/IWA Publishing. p. 107, 2004.
- LECHEVALLIER, M. W.; EVANS, T. M.; SEIDLER, R. J. Effect of turbidity on chlorination efficiency and bacterial persistence in drinking water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 159–167, 1981.
- LEE, J. E.; KO, G. Norovirus and MS2 inactivation kinetics of UV-A and UV-B with and without TiO<sub>2</sub>. **Water Research**, v. 47, n. 15, p. 5607–5613, 2013.

- LEE, J.; ZOH, K.; KO, G. Inactivation and UV Disinfection of Murine Norovirus with TiO<sub>2</sub> under Various Environmental Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 7, p. 2111–2117, 2008.
- LEVALLOIS, P.; GRONDIN, J.; GINGRAS, S. Evaluation of consumer attitudes on taste and tap water alternatives in Quebec. **Water Science and Technology**, v. 40, n. 6, p. 135–139, 1999.
- LI, D. et al. Effect of grape seed extract on human norovirus GII.4 and murine norovirus 1 in viral suspensions, on stainless steel discs, and in lettuce wash water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 21, 2012.
- LI, D.; SHI, H. C.; JIANG, S. C. Concentration of viruses from environmental waters using nanoalumina fiber filters **Journal of Microbiological Methods**, v. 81, n. 1, p. 33 – 38, 2010.
- LIANG, L.; SINGER, P. C. Factors influencing the formation and relative distribution of haloacetic acids and trihalomethanes in drinking water. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 13, p. 2920–2928, 2003.
- LIGON, G.; BARTRAM, J. Literature review of associations among attributes of reported drinking water disease outbreaks. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 6, p. 527, 2016.
- LLUÍS, L. et al. Toxicology evaluation of a procyanidin-rich extract from grape skins and seeds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 6, p. 1450 – 1454, 2011.
- LUBBERS, J. R.; CHAUHAN, S.; BIANCHINE, J. R. Controlled clinical evaluations of chlorine dioxide, chlorite and chlorate in man. **Toxicological Sciences**, v. 1, n. 4, p. 334–338, 1981.
- MADIGAN, M. T. et al. **Brock biology of microorganisms**. 13 ed., Pearson Education Inc. p. 1005 – 1007, 2012.
- MARCHI, J. **Reservatório de água germicida automático**. Instituto Nacional de Propriedade Intelectual. BR nº BR1020130172022A2, 04 jul. 2013, 04 ago. 2015.
- MARTINI, C. et al. Antimicrobial and anticoagulant activities of *N*-chlorotaurine, *N,N*-dichloro-2,2-dimethyltaurine, and *N*-monochloro-2,2-dimethyltaurine in human blood. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 1979 – 1984, 2012.
- MASSHOLDER, K.F. **Small drinking water tank has submerged UV light emitter**. World Intellectual Property Organization. DE nº DE000019619022, 10 maio 1996, 13 nov. 1997.
- MCGEEHIN, M. . et al. Case-control study of bladder-cancer and water disinfection methods in Colorado. **American Journal of Epidemiology**,

v. 138, n. 7, p. 492–501, 1993.

MENA, K.D.; GERBA, C.P. Waterborne Adenovirus. In: WHITACRE, D.M. (ed), **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 198. New York: Springer Science, 2008.

MERKEL, L.; BICKING, C.; SEKHAR, D. Parents' perceptions of water safety and quality. **Journal of Community Health**, v. 37, n. 1, p. 195–201, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Gabinete do Ministro. Portaria de Consolidação n° 5, de 28 de setembro de 2017. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 out. 2017, p.360.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Gasto federal com saneamento como proporção do PIB. **Indicadores e dados básicos – Brasil – IDB 2012**. Disponível em <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/ibd2012/e13b.htm>>, acessado em dezembro de 2017.

NAGL, M. et al. Tolerance and bactericidal action of N-chlorotaurine in a urinary tract infection by an omniresistant *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 288, n. 2, p. 217 – 223, 1998.

NAGL, M. et al. Bactericidal activity of micromolar N-chlorotaurine: evidence for its antimicrobial function in the human defense system. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 9, p. 2507 – 2513, 2000.

NAGL, M. et al. Tolerance of N-chlorotaurine, a new antimicrobial agent, in infectious conjunctivitis – a phase II pilot study. **Ophthalmologica**, v. 214, n. 2, p. 111 – 114, 2000.

NAGL, M. et al. Tolerability and efficacy of N-chlorotaurine in comparison with chloramine T for the treatment of chronic leg ulcers with a purulent coating: a randomized phase II study. **British Journal of Dermatology**, v. 149, n. 3, p. 590 – 597, 2003.

NAGL, M.; LARCHER, C.; GOTTARDI, W. Activity of N-chlorotaurine against herpes simplex and adenoviruses. **Antiviral Research**, v. 38, n. 1, p. 25 – 30, 1998.

NASCIMENTO, M. A. et al. Recombinant adenovirus as a model to evaluate the efficiency of free chlorine disinfection in filtered water samples. **Virology Journal**, v. 12, n. 1, p. 30, 2015.

NASSIRI-ASL, M.; HOSSEINZADEH, H. Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (grape) and its bioactive constituents: an update. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 9, p. 1392 – 1403, 2016.

NEHER, A. et al. Acute Otitis Externa: Efficacy and tolerability of N-chlorotaurine, a novel endogenous antiseptic agent. **The Laryngoscope**, v.114, n. 5, p. 850 – 854, 2004.

NOGUEIRA, G. et al. Microbiological quality of drinking water of urban and rural communities, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 2, p. 232–236, 2003.

OLSON, M. R.; AXLER, R. P.; HICKS, R. E. Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. **Journal of virological methods**, v. 122, n. 2, p. 147–52, 2004.

OMS – Organização Mundial da Saúde. **Trihalomethanes in Drinking-water. Back ground document for development of WHO guidelines for drinking-water quality**. p. 1 – 49, 2004.

OMS – Organização Mundial da Saúde. **Country profile of Environmental Burden of Disease: Brazil**. Geneva 2009. Disponível em:

<[http://www.who.int/quantifying\\_ehimpacts/national/countryprofile/en/](http://www.who.int/quantifying_ehimpacts/national/countryprofile/en/)>, acessado em junho de 2016

OMS – Organização Mundial da Saúde. **Water for health: WHO guidelines for drinking-water quality**. p. 1 – 6. 2010

OMS – Organização Mundial da Saúde. Progress on Drinking Water and Sanitation: 2012 Update. **Monitoring Programme for Water Supply and Sanitation**, 2012.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global health estimates summary tables: deaths by cause, age and sex**. Geneva, 2013. Disponível em:

<[http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/estimates\\_regional/en/index.html](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates_regional/en/index.html)>, acessado em dezembro de 2017.

OMS – Organização Mundial da Saúde. **Fact Sheet 2.17: Chlorination Concepts**, 2016. Disponível em:

<[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/envsanfactshets/en/index1.html](http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/envsanfactshets/en/index1.html)>, acessado, em maio de 2016.

ONU- Organização das Nações Unidas. Resumo do Relatório do Desenvolvimento Humano 2006. **Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento**, p. 1–52, 2006.

ONU - Organização das Nações Unidas. 64/292. The human right to water and sanitation. **General Assembly**, v. 64, n. 292, p. 3, 2010.

ONU - Organização das Nações Unidas. **The human right to water and sanitation – Media brief**. p. 1 – 8, 2011. Disponível em:

<[http://www.un.org/waterforlifedecade/unwdpac\\_facts\\_and\\_figures.shtml](http://www.un.org/waterforlifedecade/unwdpac_facts_and_figures.shtml)>, acessado em dezembro de 2017

ONU - Organização das Nações Unidas. **Metas globais para o**

- desenvolvimento sustentável.** 2015a. Disponível em: <<http://www.un.org/sustainabledevelopment/sustainable-development-goals/>>, acessado em dezembro de 2017.
- ONU - Organização das Nações Unidas. **Facts and Figures.** 2015b. Disponível em: <[http://www.un.org/waterforlifedecade/unwdpac\\_facts\\_and\\_figures.shtml](http://www.un.org/waterforlifedecade/unwdpac_facts_and_figures.shtml)>, acessado em dezembro de 2017.
- ONU – Organização das Nações Unidas. **A ten year story – The water for life decade 2005-2015 and Beyond.** 92 pp. 2015c.
- OPAS/OMS - Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde. **Desastres Naturais e Saúde no Brasil: Série Desenvolvimento Sustentável e Saúde 2.** OPAS, Ministério da Saúde. 56p., 2015.
- OZDAL, T.; CAPANOGLU, E.; ALTAY, F. A review on protein–phenolic interactions and associated changes. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 954 – 970, 2013.
- PAGE, M. A.; SHISLER, J. L.; MARIÑAS, B. J. Kinetics of adenovirus type 2 inactivation with free chlorine. **Water Research**, v. 43, n. 11, p. 2916–2926, 2009.
- PAGE, M. A., SHISLER, J. L., MARINÑAS, B. J. Mechanistic Aspects of Adenovirus Serotype 2 Inactivation with Free Chlorine. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.9, p. 2946–2954, 2010.
- PARK, G. W.; LINDEN, K. G.; SOBSEY, M. D. Inactivation of murine norovirus, feline calicivirus and echovirus 12 as surrogates for human norovirus (NoV) and coliphage (F+) MS2 by ultraviolet light (254 nm) and the effect of cell association on UV inactivation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 162–167, 2011.
- PARK, S. Y. et al. Ultraviolet-C efficacy against a norovirus surrogate and hepatitis A virus on a stainless steel surface. **International Journal of Food Microbiology**, v. 211, p. 73–78, 2015.
- PESKIN, A. V.; WINTERBOURN, C. C. Kinetics of the reactions of hypochlorous acid and amino acid chloramines with thiols, methionine, and ascorbate. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, n. 5, p. 572 – 579, 2001.
- PIGEOT-RÉMY, S. et al. Bactericidal efficiency and mode of action: A comparative study of photochemistry and photocatalysis. **Water Research**, v. 46, n.10 p. 3208-3218, 2012.
- PILOTTO, M. R. **Aquisição, estabilidade e inativação de vírus entéricos em ostras *Crassostrea gigas*.** 2015. 122pp. (Dissertação -

Mestrado em Biotecnologia e Biociências) - Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

PMF – Prefeitura Municipal de Florianópolis. **Plano municipal integrado de saneamento básico do município de Florianópolis/SC – fase de diagnóstico**, 2010.

POCOCK, S.T. **Clinical trials: a practical approach**. 1 ed. John Wiley & Sons, 1983.

PRATHUMRATANA, L.; STHIANNOPKAO, S.; KIM, K. W. The relationship of climatic and hydrological parameters to surface water quality in the lower Mekong River. **Environment International**, v. 34, n. 6, p. 860–866, 2008.

PREDMORE, A.; LI, J. Enhanced removal of a human norovirus surrogate from fresh vegetables and fruits by a combination of surfactants and sanitizers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 14, p. 4829–4838, 2011.

RAINBOW, A. J. Reduced capacity to repair irradiated adenovirus in fibroblasts from Xeroderma pigmentosum heterozygotes. **Cancer Research**, v. 40, n. 11, p. 3945–3949, 1980.

RAINBOW, A. J. Relative repair of adenovirus damaged by sunlamp, UV and g-irradiation in cockayne syndrome fibroblasts is different from that in xeroderma pigmentosum fibroblasts. **Photochemistry and Photobiology**, v. 50, n. 2, p. 201–208, 1989.

RAMES, E. et al. Technical aspects of using human adenovirus as a viral water quality indicator. **Water research**, v. 96, p. 308–326, 2016.

RAYMOND, P. D. Jr.; ENGELHARD, R. **Apparatus and method for purifying water in a storage tank**. World Intellectual Property Organization. US n° US20080302737, 28 jun. 2007, 11 dez. 2008.

REYNOLDS, K.A; MENA, K.D.; GERBA, C.P. Risk of waterborne illness via drinking water in the United States. In: WHITACRE, D.M. **Reviews of environmental contamination and toxicology**. New York: Springer, v.192, 2008.

RICHARDSON, S.D.; POSTIGO, C. Drinking Water Disinfection By-products. In: D. BARCELÓ, D.; KOSTIANOY, A.G. **The Handbook of Environmental Chemistry: Emerging Organic Contaminants and Human Health**. New York: Springer, v.20, 2012.

RIGOTTO, C. et al. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianópolis, South Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 6, p. 1979–1987, 2010.

- RIZZO, L.; BELGIORNO, V.; CASALE, R. Simultaneous compliance of toc and turbidity related to pathogen breakthrough and thms control by enhanced coagulation. **Global Nest Journal**, v. 7, n. 1, p. 145–153, 2005.
- RODRÍGUEZ-LÁZARO, D. et al. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, p. 786–814, 2012.
- ROMANOWSKI, E. G. et al. *N*-chlorotaurine is an effective antiviral agent against adenovirus in vitro and in the Ad5/NZW rabbit ocular model. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 5, p. 2021 – 2026, 2006.
- ROMPRÉ, A. et al. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: Current methods and emerging approaches. **Journal of Microbiological Methods**, v. 49, n. 1, p. 31–54, 2002.
- RYU, H. et al. Applicability of integrated cell culture quantitative PCR (ICC-qPCR) for the detection of infectious adenovirus type 2 in UV disinfection studies. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 50, n. 8, p. 777–787, 2015.
- SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 72, n. 2, p. 270 – 276, 1998.
- SANO, A. Safety assessment of 4-week oral intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract in healthy subjects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 108, pt. B, p. 519 – 523, 2017.
- SCHUSTER C., SANDFORD, R. **Water in the World We Want**. United Nations University Institute for Water, Environment and Health and United Nations Office for Sustainable Development. 94 p., 2015.
- SHIMIZU, H. et al. An outbreak of adenovirus serotype 41 infection in infants and children with acute gastroenteritis in Maizuru City, Japan. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 2, p. 279–284, 2007.
- SILVA, I. T. **Triagem anti-herpética de alguns táxons da biodiversidade brasileira: fracionamento biomonitorado de *Cecropia qlaziovii* Sneth., Urticaceae (embaúba)**. 2009. 133 f. (Dissertação - Mestrado em Farmácia) - Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152 – 178, 1999.

- SU, X.; D'SOUZA, D. H. Grape seed extract for control of human enteric viruses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 12, 2011.
- SU, X.; D'SOUZA, D. H. Grape seed extract for foodborne virus reduction on produce. **Food Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 1 – 6, 2013.
- TALATALA, S. **The Effect of Tap Water Perception on the Consumption of Bottled Water**. p. 1–20, 2008.
- TEUCHNER, B. et al. Tolerability and efficacy of N-chlorotaurine in epidemic keratoconjunctivitis—a double-blind, randomized, phase-2 clinical trial. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 21, n. 2, p. 157 – 165, 2005.
- THE WORLD BANK. **World bank open data**. 2017. Disponível em: <<http://beta.data.worldbank.org/>>, acessado em dezembro de 2017.
- THURSTON-ENRIQUEZ, J. A. et al. Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 7, p. 3979–85, 2003.
- TOMINAGA, M. Y.; MIDIO, A. F. Exposição humana a trihalometanos presentes em água tratada. **Revista de Saude Publica**, v. 33, n. 4, p. 413–421, 1999.
- TURGEON, S. et al. Perception of drinking water in the Quebec City region (Canada): the influence of water quality and consumer location in the distribution system. **Journal of Environmental Management**, v. 70, n. 4, p. 363–373, 2004.
- UNICEF – Fundo das Nações Unidas Para a Infância. **International year of sanitation factsheet**. 2008. Disponível em: <<https://esa.un.org/iys/>>, acessado em dezembro de 2016.
- USEPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. **Water Treatment Manual : Disinfection**. Environmental Protection Agency, United States. 200p. 2011.
- VAN ACKER, S. A. B. E. et al. A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. **Chemical Research in Toxicology**, v. 9, n. 8, p. 1305 – 1312, 1996.
- VIANA, R. B. et al. Risk assessment of trihalomethanes from tap water in Fortaleza, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 151, n. 1-4, p. 317–325, 2009.
- VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v.1, n.3, p.1112 – 1116, 2006.
- VIMONT, A.; FLISS, I.; JEAN, J. Efficacy and mechanisms of murine norovirus inhibition by pulsed-light technology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 8, p. 2950–2957, 2015.

VITANAGE, D.; PAMMINGER, F.; OURTSANIS, T. Maintenance and survey of distribution systems. **Safe piped water: Managing microbial water quality in piped distribution systems**, p. 69–86, 2004.

VOTANO, J.; PARHAM, M.; HALL, L. **Manual de procedimentos de vigilância em saúde ambiental relacionada à qualidade da água para consumo humano**. Ministério da Saúde, Brasília. 286pp., 2004.

WALCZEWSKA, M. et al. Comparative analysis of microbicidal and anti-inflammatory properties of novel taurine bromamine derivatives and Bromamine T. In: LEE DH., et al. (eds) Taurine 10. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, vol. 975. Springer: Dordrecht, 2017.

WEISS, S. J. et al. Chlorination of taurine by human neutrophils. **Journal of Clinical Investigation**, v. 70, n. 3, p. 598 – 607, 1982.

WHELTON, A. J. et al. Detecting contaminated drinking water: harnessing consumer complaints. **AWWA WQTC Proceedings**. 2004.

WIGGINTON, K. R. et al. UV Radiation Induces Genome-Mediated, Site-Specific Cleavage in Viral Proteins. **ChemBioChem**, v. 13, n. 6, p. 837–845, 2012.

WOLD, W.S.M.; ISON, M. G. Adenoviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**, 6 ed., vol.2, Lippincott Williams & Wilkins. p. 1732 – 1767, 2013.

WONES, R. G. et al. Lack of effect of drinking water chlorine on lipid and thyroid metabolism in healthy humans. **Environmental Health Perspectives**, v. 99, p. 375–381, 1993.

XU, X.; WEISEL, C. P. Dermal uptake of chloroform and haloketones during bathing. **Journal of exposure analysis and environmental epidemiology**, v. 15, n. 4, p. 289–296, 2005.

YAMAGUCHI, M. U. et al. Qualidade microbiológica da água para consumo humano em instituição de ensino de Microbiological quality of human consumption water in a. **O Mundo da Saúde, São Paulo**, v. 37, n. 3, p. 312–320, 2013.

YAMAKOSHI, J. et al. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 5, p. 599 – 607, 2002.

ZEIGHAMI; E. A.; WATSON; A. P.; CRAUN; G. F. Serum lipid levels in neighboring communities with chlorinated and nonchlorinated drinking water. In: JOLLEY; R. L et al. **Water chlorination: Chemistry, environmental impact and health effects**. Volume 6, Ed. Lewis Publishers, Inc., p.421 - 434, 1990.

**ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação da qualidade de água de consumo na Grande Florianópolis, SC.

**Pesquisador:** Célia Regina Monte Barardi

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 33243014.1.0000.0121

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Catarina

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 782.658

**Data da Relatoria:** 08/09/2014

**Apresentação do Projeto:**

"Avaliação da qualidade de água de consumo na Grande Florianópolis, SC". Projeto que visa realizar uma pesquisa de satisfação com uma parcela da população da Grande Florianópolis, SC, sobre a qualidade da água de consumo distribuída. "Avaliação da qualidade de água de consumo na Grande Florianópolis, SC". Projeto que visa realizar uma pesquisa de satisfação com uma parcela da população da Grande Florianópolis, SC, sobre a qualidade da água de consumo distribuída.

**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo primário é avaliar a satisfação da população referente a qualidade da água de consumo em residências da Grande Florianópolis, SC, bem como aferir os parâmetros físico-químicos e microbiológicos da água que abastece as residências.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo os pesquisadores a pesquisa não apresenta riscos para os participantes e terá como benefício avaliar a percepção da população quanto a qualidade da água que abastece as residências da Grande Florianópolis, trabalho inédito para a região. Além disso, irá identificar possíveis contaminações microbiológicas e parâmetros físico-químicos não condizentes com a

**Endereço:** Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-900  
**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-9206 **Fax:** (48)3721-9696 **E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 782.658

legislação estabelecida, comprovando que a água de consumo é um meio de transmissão de doenças. Por fim, esses resultados servirão de subsídio para investigar novas alternativas para o tratamento da água.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata o presente de um projeto de Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - Laboratório de Virologia Aplicada. O presente projeto pretende realizar uma pesquisa de satisfação com uma parcela da população da Grande Florianópolis, SC, sobre a qualidade da água de consumo distribuída. A pesquisa será feita por meio de questionários distribuídos nas residências de seis bairros distintos e coletados por um pesquisador identificado. Os dados obtidos serão confidenciais e um termo de consentimento livre e esclarecido será entregue junto com os questionários. As perguntas fazem referência aos dados pessoais e sócio-econômicos, à fonte, satisfação e percepções organolépticas da água de consumo e, por fim, possíveis doenças que possam estar relacionadas com o consumo da água. A pesquisa de satisfação deverá ter no mínimo 504 questionários respondidos. A segunda etapa do trabalho consiste na coleta de água da torneira no interior da casa das pessoas. Serão selecionados 4 pontos em cada um dos bairros que foi aplicado o questionário. Serão feitas coletas de 10 litros de água para análise físico-química e microbiológica. As coletas serão realizadas em três semanas diferentes. O projeto tem relevância científica, documentação completa e TCLE atende na íntegra à Resolução CNS n°466/12 e normas complementares. Assim, recomendamos a sua aprovação.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Documentação completa.

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não foram detectadas pendências ou inadequações neste projeto.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima  
Bairro: Trindade CEP: 88.040-900  
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS  
Telefone: (48)3721-9206 Fax: (48)3721-9696 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 782.658

**Considerações Finais a critério do CEP:**

FLORIANOPOLIS, 08 de Setembro de 2014

---

**Assinado por:**  
**Washington Portela de Souza**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-900  
**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-9206 **Fax:** (48)3721-9696 **E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br





- ✓ Para responder as perguntas 20 a 30 utilize os seguintes critérios:

1 = Muito ruim

2 = Ruim

3 = Nem boa, nem ruim

4 = Boa

5 = Muito boa

9 = Não sei ou não quero responder

Como você classifica a água da torneira da sua casa nos últimos sete dias quanto...							
20	ao sabor?	1	2	3	4	5	9
21	ao cheiro?	1	2	3	4	5	9
22	à cor?	1	2	3	4	5	9
23	à segurança/confiança para beber?	1	2	3	4	5	9
24	a ser saudável para sua família?	1	2	3	4	5	9
25	ao custo?	1	2	3	4	5	9

Como você classifica a água da torneira da sua casa distribuída durante o verão quanto...							
26	ao sabor?	1	2	3	4	5	9
27	ao cheiro?	1	2	3	4	5	9
28	à cor?	1	2	3	4	5	9
29	à segurança/confiança para beber?	1	2	3	4	5	9
30	a ser saudável para sua família?	1	2	3	4	5	9

31. Você conhece o processo de tratamento utilizado pela CASAN?

Sim

Não

Não quero responder

**Agora vamos perguntar sobre possíveis doenças que podem ter ocorrido em pessoas que moram na sua casa nos últimos trinta dias.**

32. Alguém da sua casa apresentou algum episódio de dor de barriga, diarreia ou vômito por mais de um dia consecutivo, nos últimos trinta dias?

Sim

Não (Pular para a pergunta 37)

Não sei ou não quero responder

33. Quantas pessoas da sua casa apresentaram esses sintomas nos últimos trinta dias?

\_\_\_\_\_ pessoas (anotar o número de pessoas)

Não sei ou não quero responder

34. Quantas crianças na sua casa com 5 anos de idade ou menos apresentaram esses sintomas nos últimos trinta dias?

\_\_\_\_\_ pessoas (anotar o número de pessoas)

Não sei ou não quero responder

35. Quantas pessoas na sua casa com 60 anos de idade ou mais apresentaram esses sintomas nos últimos trinta dias?

\_\_\_\_\_ pessoas (anotar o número de pessoas)

Não sei ou não quero responder

36. Quando identificado um desses sintomas nos últimos trinta dias, quantas pessoas foram levadas ao médico?

\_\_\_\_\_ pessoas (anotar o número de pessoas)

Não sei ou não quero responder

**37. Você sabe que algumas doenças podem ser transmitidas pela água que se bebe?**

- Sim
- Não
- Não quero responder

**Por fim, gostaríamos de fazer mais duas perguntas.**

**38. Você aceitaria que fizéssemos um estudo sobre a qualidade microbiológica (bactérias e vírus) da água que chega à sua residência?**

- Sim
- Não
- Não sei ou não quero responder

**39. Qual é a renda mensal da família?**

- Sem renda
- Abaixo de R\$ 1.000,00
- De R\$ 1.000,00 a R\$ 2.000,00
- De R\$ 2.000,00 a R\$ 4.000,00
- De R\$ 4.000,00 a R\$ 6.000,00
- De R\$ 8.000,00 a R\$ 10.000,00
- Acima de R\$ 10.000,00
- Não sei ou não quero responder

**Muito obrigado! Sua participação é importante para nós.**

## ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA DE CONSUMO NA GRANDE FLORIANÓPOLIS

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) como voluntário(a) para participar da pesquisa intitulada “**Avaliação da qualidade da água de consumo na Grande Florianópolis**”. O objetivo será identificar a principal fonte de água utilizada para beber, assim como sua opinião sobre a qualidade da água que é oferecida pela CASAN, como sabor, cheiro e cor da água.

O(A) senhor(a) terá que responder algumas perguntas sobre a qualidade da água da CASAN, possíveis doenças que ocorreram relacionadas ao consumo da água e algumas informações pessoais. Na semana seguinte ao recebimento do questionário, um pesquisador identificado da UFSC passará em sua casa para buscar o questionário respondido. Essa pesquisa é importante para identificar como a população de Florianópolis avalia a água que é distribuída pela CASAN, podendo assim investir em formas de melhorar a qualidade da água.

O(A) senhor(a) será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. O(A) senhor(a) é livre para recusar a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento, sem penalização ou prejuízo algum. **As informações obtidas são confidenciais**, sendo que os dados serão analisados juntamente com os dos outros participantes, não sendo mencionados dados ou nomes que permitam a sua identificação. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada com o pesquisador e a outra será entregue a(o) senhor(a). **A sua participação no estudo não acarretará em custos** e não será remunerada. A coleta de dados envolve somente a resposta deste questionário e possui riscos mínimos que se limitam somente à possibilidade de constrangimento ao responder algumas das questões. Caso sinta-se constrangido(a) o(a) senhor(a) poderá optar em não responder o questionário.

O estudo terá como responsáveis a professora Célia Regina Monte Barardi e o doutorando Lucas Ariel Totaro Garcia, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em Florianópolis. Em caso de dúvidas, o(a) senhor(a) poderá entrar em contato pelo telefone (48) 3721-5515 ou pelo endereço eletrônico: lucas.ariel@posgrad.ufsc.br.

Qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre os aspectos éticos desta pesquisa, favor entrar em contato com: Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC – CEPESH/UFSC, pelo telefone: (48) 3721-9206, e-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br.

Eu, \_\_\_\_\_  
declaro que tenho 18 anos de idade ou mais, fui esclarecido sobre a pesquisa “*Avaliação da qualidade da água de consumo em Florianópolis*” e concordo em participar deste estudo.

Assinatura do(a) participante: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_  
*Lucas Ariel Totaro Garcia*

Florianópolis, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2015.

## ANEXO D – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO REFERENTE AO CAPÍTULO 1

### Water Policy

#### Public perception related to inadequate drinking water quality among Brazilian adults --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	WPOL-D-17-00180R1
<b>Full Title:</b>	Public perception related to inadequate drinking water quality among Brazilian adults
<b>Article Type:</b>	Research Paper
<b>Corresponding Author:</b>	Celia Regina Monte Barardi Universidade Federal de Santa Catarina BRAZIL
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidade Federal de Santa Catarina
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Lucas Ariel Totaro Garcia
<b>Order of Authors:</b>	Lucas Ariel Totaro Garcia Leandro Martin Totaro Garcia Celia Regina Monte Barardi
<b>Abstract:</b>	This study aimed to identify the main sources of drinking water, evaluate public perception and satisfaction with regards to tap water and compare it with the distance from suppliers in Florianopolis city, Southern Brazil. Physicochemical and microbiological parameters of water at daycare centers were also assessed. Questionnaires were applied to 1,298 residences in six districts regarding water quality and consumption preferences and analyzed by adjusted binary logistic regression. Tap water physicochemical and microbiological parameters at the selected districts were assessed during summer and winter seasons. Of the 581 questionnaire respondents, 93% did not drink tap water, mostly due to a lack of confidence on water safety and taste. Only 39% were satisfied with water quality and approximately 30% reported that water is worse in summer season. Most of water samples collected were not in accordance with Brazilian regulations. 30% of samples were positive for total coliform, and one sample was positive for infectious adenovirus (38 PFU/L). Chlorine concentration was higher in some districts closer to the supplier and during the summer season. These results could be useful in informing political resolutions aiming to improve the quality of drinking water, and to protect human health.
<b>Additional Information:</b>	
<b>Question</b>	<b>Response</b>
The word limit for <i>Water Policy</i> is <b>9,000 words</b> . Please state the word length of your manuscript, including Abstract, Keywords and References, and space occupied by tables and figures. A full page of the printed journal is c. 660 words. A half-page figure or table is therefore c. 330 words. <b>Please note that manuscripts that exceed the stated word limit may be rejected without review.</b>	8800

## ANEXO E – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO REFERENTE AO CAPÍTULO 2

### Water Science and Technology: Water Supply

#### Performance of a tank coupled with UV light on enteric virus inactivation in drinking water

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	WS-EM17617
<b>Full Title:</b>	Performance of a tank coupled with UV light on enteric virus inactivation in drinking water
<b>Short Title:</b>	Viral disinfection in drinking water in tank coupled with UV
<b>Article Type:</b>	Research Paper
<b>Section/Category:</b>	Water Treatment and Distribution
<b>Keywords:</b>	chlorine; Drinking water; human adenovirus; Norovirus; ultraviolet light
<b>Corresponding Author:</b>	Celia Barardi Universidade Federal de Santa Catarina Florianopolis, Santa Catarina BRAZIL
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidade Federal de Santa Catarina
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Lucas Ariel Totaro Garcia, MSc.
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Lucas Ariel Totaro Garcia, MSc. Celia Barardi
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Manuscript Region of Origin:</b>	BRAZIL
<b>Abstract:</b>	Water destined for personal and household consumption should be safe and acceptable in taste, odor and color. However, complaints about drinking water are a common issue among the Brazilian population. Also, due to the pollution of water bodies, social groups that are not supplied by treated water may be exposed to different contaminants. The aim of this study was to assess the efficiency of a water treatment tank with UV light on the inactivation of enteric viruses and the reduction of chlorine concentration for use in residences, as well as rural and isolated communities. Viral disinfection and chlorine concentration decay assays were performed in a tank with capacity of 300 L and a 36 W UV lamp coupled, with controlled temperature. Recombinant human adenovirus (AdHu5-GFP) and murine norovirus (MNV-1) infectivity were assessed after 0, 3, 6 and 12 h of water recirculation. 99.99% inactivation was reached after 12 h for AdHu5-GFP and before 6h for MNV-1. Chlorine concentration had a decay of 0.77 mg/L after 12 h. Regarding the efficiency observed, a product model was designed. This tank model was efficient in ensuring viral inactivation as well as reducing residual chlorine, and can be adjusted to other proportions.
<b>Suggested Reviewers:</b>	Albert Bosch, PhD Professor, Universidad de Barcelona abosch@ub.edu He is expert in environmental virology and water contamination and disinfection processes.  Anna Carratala Ripolles, PhD Researcher, Ecole Polytechnique Federale de Lausanne anna.carratala@epfl.ch She is expert in photoinactivation of microorganisms and waterborne pathogens.