



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

JANINE SIMAS CARDOSO RURR

DESCONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE ÁGUA:
MELHORAMENTO DA TÉCNICA DE DESINFECÇÃO SOLAR (SODIS)
PELA UTILIZAÇÃO DO AZUL DE METILENO

Rio de Janeiro
2015

JANINE SIMAS CARDOS RURR

**DESCONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE ÁGUA:
MELHORAMENTO DA TÉCNICA DE DESINFECÇÃO SOLAR (SODIS)
PELA UTILIZAÇÃO DO AZUL DE METILENO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Formação Técnica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Formação para a Pesquisa Biomédica. Área de concentração: Biofísica e Fisiologia

Orientador: Dr. Alvaro Augusto da Costa Leitão

Co-orientadora: Dr^a. Tatiana Amorim Muniz de Alencar

Rio de Janeiro

2015

Rurr, Janine Simas Cardoso

Descontaminação Microbiológica de Água: Melhoramento da Técnica de Desinfecção Solar (SODIS) pela utilização do Azul De Metileno. / Janine Simas Cardoso Rurr – Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2015.

xxiii, 104 f.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Alvaro Augusto da Costa Leitão e Tatiana Amorim Muniz de Alencar

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho / Programa de Pós-Graduação em Formação Técnica para Pesquisa Biomédica (Biofísica e Fisiologia), 2015.

1. SODIS. 2. Azul de Metileno. 3. Luz Solar. 4. Luz Solar Simulada. 5. Água. 6. Descontaminação. 7. Microorganismos.

Janine Simas Cardoso Rurr

**DESCONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE ÁGUA: MELHORAMENTO DA
TÉCNICA DE DESINFECÇÃO SOLAR (SODIS) PELA UTILIZAÇÃO DO AZUL DE
METILENO**

Dissertação de Mestrado Profissional apresentada ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Formação para Pesquisa Biomédica.

Rio de Janeiro, 17 de agosto de 2015.

Dr. Alvaro Augusto da Costa Leitão (Orientador)
Professor Associado do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Dr^a. Tatiana Amorim Muniz de Alencar (Co-orientadora)
Pós Doutoranda do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Dr^a Claudia Alencar Santos Lage (Revisora)
Professora Associada do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Dr. Olaf Malm
Professor Titular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Dr^a. Rosane Silva
Professora Titular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Dr^a. Wanda Maria Almeida von Kruger
Professora Titular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

**Rio de Janeiro
2015**

A idade de ser feliz

Existe somente uma idade para a gente ser feliz.
Somente uma época na vida de cada pessoa
em que se pode sonhar e fazer planos,
e ter energia bastante para realizá-los,
a despeito de todas as dificuldades e obstáculos.
Uma só idade para a gente se encontrar com a vida
e viver apaixonadamente,
com o entusiasmo dos amantes
e a coragem dos aventureiros.
Fase dourada em que se pode criar e recriar a vida
à imagem e semelhança
dos nossos desejos;
e sorrir e cantar, e brincar e dançar,
e vestir-se com todas as cores
e experimentar todos os sabores
e desfrutar de tudo com toda a intensidade,
sem preconceito nem pudor.
Tempo em que cada limitação humana
é só mais um convite ao crescimento;
um desafio a lutar com toda energia
e a tentar algo novo, de novo e de novo
e quantas vezes for preciso.
Essa idade tão especial e tão única
chama-se presente...
E tem apenas a duração do instante que passa...

Mário Quintana

Dedicatória

Dedico esta Tese de Mestrado aos meus amores:

Gabriel Rurr, porque ser mãe de menino é ganhar um parceiro, protetor e admirador para o resto da vida. Filho, você é de fato a maior inspiração da minha vida;

Aos meus pais José e Zuhyla, pelo amor, dedicação e carinho sempre disponíveis e pela preciosa lição de que sem dignidade de caráter e sem luta por um ideal é impossível vencer.

À minha parceira desta e de outras vidas, Marinalda Sinaguê, pela ajuda na formação deste sonho, pelo amor, carinho, compreensão, fé, luta e especialmente pelo que somos juntas, uma base forte consolidada no amor.

Ao Zé, por acreditar em mim, mesmo quando eu não acreditava; por me apoiar quando as coisas não aconteciam exatamente como foi sonhado; respeitar meu silêncio, concentração e até mesmo mau humor, principalmente nos momentos difíceis. Você nunca deixou faltar nada, especialmente amor e generosidade. Pelo homem, pelo pai, por hoje e por todos os dias a mim dedicados, te amo Zé!

“Nenhum de nós é tão bom, quanto todos nós juntos.”

Agradeço a Deus, pela minha fé e principalmente por ser a única certeza, em dias onde a dúvida era constante.

Ao Prof. Alvaro, meu chefe e orientador, pelos ensinamentos científicos e por ser parte importante nesse capítulo da minha vida.

À Tatiana, amiga e co-orientadora neste trabalho, por ensinar-me a fazer tudo com amor, pelos ensinamentos científicos e de vida, pelo carinho, cumplicidade, sorriso sempre presente e preocupação para que tudo desse certo.

À Prof^a e amiga Claudia Lage, pela ajuda, elaboração do projeto que resultou na minha tese, e por fazer-me acreditar que tudo vai dar certo, basta querer lutar.

Aos companheiros do laboratório: amiga Rita, pelos ensinamentos, pela paciência em transmiti-los, presença em momentos difíceis e de dúvida, enfim pelos bons momentos que se eternizarão no meu coração; Leo, pela força, carinho e apoio, fundamental nesta reta final e pelas inesperadas gargalhadas.

Ao casal Marcelo e Viviana, pela amizade, carinho, confiança e encorajamento desde sempre.

Ao casal Davi e Mariana, que torceram por mim e acreditaram nesta conquista, desde o início do trabalho e pela grande colaboração na parte estatística dos dados. Pela amizade, companheirismo, viagens e pelas histórias que temos para contar e especialmente pelas que ainda escreveremos.

Aos participantes do SODIS, Ivan, Juliana, Jéssica, Camilla, Bianca, Daniel e Mayane, vocês foram fundamentais para a consolidação desta tese.

À amizade dos alunos de leveduras: a Claudia e Gabriela, exemplo confiança mútua; Tula, pelos ensinamentos de muitas técnicas; Juliana, pela honestidade e grande força interior; Bryan, meu farmacêutico e cosmetólogo de bolso; Raiane, Nycole e Renan, pelo carinho e dedicação a tudo que fazem.

Ao Prof Rodrigo, e aos alunos, Vanessa, Adriano, Stephan, Igor, Victor, Carlos e a Luciana pela oportunidade de conhecer novas técnicas e pela amizade que nasceu e se fortaleceu durante este tempo.

Às meninas, Jéssica, Larissa, Iris, Carol, Rachel e Laura pela amizade e torcida. Estou certa de que a ciência estará muito bem representada.

Ao CNPq, FAPERJ, CAPES e INPeTAm pelo apoio financeiro fundamental.

À todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização do presente trabalho.

RESUMO

RURR, Janine Simas Cardoso. **Descontaminação microbiológica de água: melhoramento da técnica de desinfecção solar (SODIS) pela utilização do azul de metileno.** Rio de Janeiro, 2015. Dissertação (Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica) – Programa de Pós-Graduação em Formação Técnica/Biofísica e Fisiologia, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

O consumo da água microbiologicamente contaminada é a principal causa de diarreia. A contaminação de rios, lagos, fontes e nascentes provoca várias mortes no mundo e a cada hora mais de 200 crianças perdem a vida em decorrência desta contaminação. O uso racional de água potável é um dos principais desafios de Governos e Organizações Mundiais. Intervenções fáceis e baratas são praticadas por comunidades não abastecidas por água de boa qualidade. Neste contexto a Desinfecção Solar (SODIS), tem se mostrado de grande eficiência para a desinfecção da água, inativando diversos tipos de micro-organismos. É um exemplo de uma prática simples e de baixo custo para a população. O procedimento consiste na exposição de garrafas PET com água não potável ao sol por um período de 6 horas. Com o objetivo de acelerar o processo e melhorar a inativação foram estudados os efeitos do Azul de Metileno (AM) como um catalisador (ação fotodinâmica), pois este corante quando absorve a luz em determinado comprimento de onda, gera oxigênio singlete como espécie reativa inativando bactérias e vírus presentes na água. Foram usadas duas espécies Gram positivas (*Staphylococcus epidermidis* e *Deinococcus radiodurans*), duas espécies Gram negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*) e o fago lambda. Em todas as experiências observou-se um efeito sinérgico letal quando as culturas são iluminadas na presença do AM. Os resultados deste estudo indicam que a inativação bacteriana pode ser alcançada em um tempo muito inferior quando se utiliza AM associado ao tratamento SODIS. Para fagos o período de tempo é ainda menor. Portanto, esta tecnologia mostrou-se capaz de prover água segura, através da inativação de micro-organismos em geral, inclusive os patogênicos, os mais resistentes e insensíveis ao SODIS, permitindo assim, seu uso em áreas normalmente menos ensolaradas.

Palavras-chave: SODIS, Azul de Metileno, Luz Solar, Luz Solar Simulada, Água Descontaminação, Microorganismos.

ABSTRACT

RURR, Janine Simas Cardoso. **Microbiological decontamination of water: improving the solar disinfection technique (SODIS) for the use of methylene blue.** Rio de Janeiro, 2015. Dissertação (Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica) – Programa de Pós-Graduação em Formação Técnica/Biofísica e Fisiologia, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Consuming microbiologically contaminated water is the primary cause of diarrhea. The contamination of rivers, lakes, fountains and springs causes several deaths in the world and at every hour more than 200 children lose their lives as a result of this contamination. Rational use of drinking water is a major challenge for Governments and Global Organizations, easy thus and inexpensive interventions are practiced by communities not supplied by good quality water. In this context solar disinfection (SODIS) has shown great efficiency for water disinfection, inactivating many types of microorganisms, as an example of a simple way and with low cost for population. The procedure consists of exposing PET bottles with no-drinking water in the sun for a period of 6 hours. In order to speed up the process and improve inactivation, we studied the effects of Methylene Blue (MB) as a catalyst (photodynamic action) because of its ability to generate singlet oxygen as reactive specie after absorbing light at a certain wavelength, thereby inactivating bacteria and viruses present in the water. Two Gram- positive (*Staphylococcus epidermidis* and *Deinococcus radiodurans*), and two Gram- negative species (*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*), and also phage lambda were used to contaminate water. In all experiments we observed a synergistic lethal effect when cultures are illuminated in the presence of MB. Thus results of this study indicate that bacterial inactivation can be achieved at a much lower time when using MB associated with SODIS treatment and for phage the time is even shorter. Therefore, this technique proved to be able of providing safe water to consumption through the inactivation of microorganisms in general, including pathogens and resistant to SODIS, thus allowing its use in areas usually less sunny.

Keywords: SODIS, Methylene Blue, Sunlight, Simulated Sunlight, Water Decontamination, Microorganisms

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Formas utilizadas para abastecimento de água em proporção de domicílios no Brasil e regiões. -----	26
Figura 2 – Tipos de esgotos sanitários no Brasil (proporção da população), 2010. -----	27
Figura 3 - Mapa do mundo indicando os 55 países onde a técnica SODIS é realizada. -----	30
Figura 4 - Procedimento padrão para técnica SODIS. -----	32
Figura 5 - Faixas da radiação solar. -----	33
Figura 6 - Regiões em que o uso da desinfecção solar é mais aplicável. ---	36
Figura 7 – Representação esquemática da oxidação de um substrato pela ação fotodinâmica -----	37
Figura 8 - Espectro de absorção do AM. -----	39
Figura 9 – Fórmula estrutural e peso molecular do AM. -----	40
Figura 10 – Fotografia de uma Placa de Petri contendo o Meio Cromocult [®] . -----	46
Figura 11 – Fotografia do simulador solar ORIEL. -----	48
Figura 12 - Esquema dos compartimentos internos do Simulador Solar Oriel -----	48
Figura 13 - Esquema das placas de 24 poços utilizadas. -----	53
Figura 14 - Medidas das transparências das garrafas PET às radiações UV-A e UV-B.-----	56
Figura 15 - Espectrometria UV-visível de uma garrafa PET. -----	57
Figura 16 - Variação de temperatura e da fotodecomposição do AM. -----	58
Figura 17 - Variação do fluxo da radiação solar UV-A e UV-B e da fotodecomposição do AM. -----	59
Figura 18 - Fotos das garrafas PET para verificar a perda da cor azul. ----	60
Figura 19 - Sobrevivência de <i>E. coli</i> variando as concentrações do AM no tratamento SODIS. -----	61

Figura 20 – Sobrevivência de <i>E. coli</i> variando as concentrações do AM no ESCURO. -----	63
Figura 21 - Inativação da bactéria <i>E. coli</i> ao tratamento SODIS com ou sem AM, irradiados ou não no LSS. -----	64
Figura 22 - Inativação da bactéria de <i>S. typhimurium</i> ao tratamento SODIS com ou sem AM, irradiados ou não no LSS. -----	65
Figura 23 - Inativação da bactéria <i>S. epidermidis</i> ao tratamento SODIS com ou sem AM, irradiados ou não no LSS.-----	66
Figura 24 - Inativação da bactéria <i>D. radiodurans</i> ao tratamento SODIS com ou sem AM, irradiados ou não no LSS. -----	67
Figura 25 - Inativação bacteriana promovida pelo SODIS e SODIS+AM monitorada através da técnica da membrana filtrante. -----	68
Figura 26 - Inativação da cepa de <i>E.coli</i> ao tratamento SODIS com ou sem AM, irradiados ou não no SOL. -----	70
Figura 27 - Inativação da cepa de <i>S.typhimurium</i> ao tratamento SODIS com ou sem AM, irradiados ou não no SOL. -----	71
Figura 28 Inativação média da cepa de <i>S. epidermidis</i> ao tratamento SODIS com ou sem AM, irradiados ou não no SOL. -----	72
Figura 29 - Inativação média da cepa de <i>D.radiodurans</i> ao tratamento SODIS com ou sem AM, irradiados ou não no SOL. -----	73
Figura 30 – Inativação do bacteriófago λ quando inoculado na cepa selvagem submetidas ao tratamento SODIS com ou sem AM, irradiados ou não no SOL. -----	75
Figura 31 – Mapa elaborado através de imagens de satélite (ANEEL) do Lago Puruzinho. -----	76
Figura 32 – Doses de radiação solar (UV-A) no período de 11 de outubro de 2014 entre 13h30min e 16h30min. Experiência realizada no Lago Puruzinho. -----	78
Figura 33 – Temperatura da água dentro da garrafa PET, durante o período de exposição ao Sol. Experimento realizado em triplicata (valores de média). -----	77
Figura 34 – Fotografia da aplicação da técnica de membrana filtrante em amostras de água do poço artesiano do Lago Puruzinho. -----	79

Figura 35 – Inativação do vírus com o decorrer do tempo. -----	88
Figura 36 Sobrevivência dos vírus quando inoculados em diferentes cepas de <i>E.coli</i> , após tratamento com SODIS e SODIS+AM. -----	89
Figura 37 – Esquema proposto para o uso doméstico do AM na técnica SODIS para 10 litros de água. -----	91
Figura 38 - Curso de Capacitação de professores do Ensino Fundamental. -----	95
Figura 39 - Aula prática para demonstração do método SODIS + AM. ----	95
Figura 40 - Equipe multidisciplinar. -----	96
Figura 41 - Local para abastecimento da comunidade do Puruzinho. -----	96
Figura 42 – Avaliação microbiológica das águas consumidas e aplicação do método SODIS-----	97
Figura 43 - Resultados da aplicação do método SODIS e divulgação para comunidade. -----	97
Figura 44 - Abordagem para coleta de água e divulgação do método. -----	98
Figura 45 - Garrafas PET expostas ao Sol, utilizadas pela população local. -----	98
LISTA DE QUADROS	
Quadro 1 – Padrão microbiológico da água para o consumo humano. -----	28
Quadro 2 – Toxicidade associada à dose do AM. -----	41
LISTA DE TABELAS	
Tabela 1 – Estimativa de acesso a saneamento básico na população brasileira. -----	25
Tabela 2 - Cepas bacterianas. -----	50
Tabela 3 – As cepas bacterianas utilizadas para a inoculação dos vírus. -----	50
Tabela 4 - Percentual de inativação de coliformes fecais após 180 min de tratamento. -----	77

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

λ - Lambda

\geq - Menor ou igual

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

Am – Amazônia

AM - Azul de metileno

AM 0 – *Air Mass Filtre*

BW – Peso Corporal do Inglês *Body Weight*

C – Consumo Diário de Água do Inglês *Daily Drinking-Water Consumption*

CPD - Dímeros de pirimidinas ciclobutano do inglês *Cyclobutane pyrimidine dimer*

D.O – Diário Oficial

DSB – Quebra de fita dupla do inglês *double-strand break*

D.radiodurans - *Deinococcus radiodurans*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EAWAG – *Swiss Federal Institute of Environmental Science and Technology*

E. coli - *Escherichia coli*

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

GV – Valor de referência do Inglês *Guideline Value*

Hg – Mercúrio

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INPeTAm – Instituto Nacional de Pesquisa Translacional da Amazônia

J - Joule

LSS – Luz Solar Simulada

M. Cidades - Ministério das Cidades

MS – Ministério da Saúde

NBR – Norma Brasileira

OMS – Organização Mundial da Saúde

P – Fração de TDI em outros alimentos

P – Provável

PLANSAB – Plano Nacional de Saneamento Básico

p/v – Peso por volume

PET - Polietileno tereftalato

RO – Rondônia

SANDEC – *Department of Water and Sanitation in Developing Countries*

S. epidermidis - *Staphylococcus epidermidis*

SNIS - Sistema Nacional de Informação sobre Saneamento

SNSA - Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental

S. typhimurium - *Salmonella typhimurium*

SODIS - *Solar Water Disinfection*

TDI – Ingestão Diária Aceitável do Inglês *Tolerable Daily Intake*

UNHSP - *United Nations Human Settlements Programme*

UNICEF - *United Nations Children's Fund*

UV – Ultravioleta

UV-A – Ultravioleta A

UV-B – Ultravioleta B

UV-C – Ultravioleta C

W – Watt

WB - *World Bank*

SUMÁRIO	
RESUMO -----	viii
ABSTRACT -----	ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES -----	x
LISTA DE QUADROS -----	xii
LISTA DE TABELAS -----	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS -----	xiii
1 - INTRODUÇÃO -----	18
1.1 Doenças causadas por patógenos transmitidos pela água não tratada ou outros materiais contaminados.-----	19
1.2 Impacto da qualidade da água e saneamento sobre as crianças. -----	22
1.3 Impacto da qualidade da água e saneamento sobre as mulheres. -----	22
1.4 Impacto da qualidade da água e saneamento sobre a família. -----	23
1.5 Prevenção de diarreias. -----	23
1.6 Panorama do saneamento básico no Brasil. -----	24
1.6.1 Saneamento básico. -----	24
1.6.2 Abastecimento de água. -----	25
1.6.3 Esgotamento sanitário. -----	26
1.6.4 Norma de qualidade da água para consumo humano. -----	28
1.6.5. Soluções para melhoramento da potabilidade da água.-----	29
1.7 O espectro da radiação solar. -----	32
1.8 Regiões geográficas que podem se beneficiar da metodologia SODIS --	35
1.9 Ação fotossensibilizadora e a escolha do Azul de Metileno (AM). -----	37
1.10 Caracterização do problema. -----	42
2 - OBJETIVO GERAL -----	43
2.1 Objetivos específicos. -----	43
3 - MATERIAL E MÉTODOS -----	44
3.1 Meios de cultura e tampão. -----	44
3.2 Análise do espectro de absorção das garrafas PET. -----	47
3.3 Medidas da transparência de diferentes garrafas PET à radiação solar e	

artificial com o uso de dosímetros. -----	47
3.4 Parâmetros físicos da água submetida ao procedimento SODIS. -----	49
3.5 Inativação bacteriana em amostras de água estéril com diferentes concentrações do AM. -----	49
3.6 Cepas bacterianas. -----	49
3.7 Inativação biológica de bactérias – <i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>D. radiodurans</i> e vírus aos tratamentos SODIS e SODIS + AM (50 ng/mL). -----	51
3.7.1 Dosimetria das radiações UV -----	51
3.7.2 Cultivo de micro-organismos. -----	51
3.7.3 Irradiação dos micro-organismos. -----	52
3.7.4 Crescimento e contagem dos micro-organismos.-----	53
3.8 Aplicação da técnica de membrana filtrante. -----	54
3.8.1 O Meio Chromocult®. -----	54
3.9 Avaliação bacteriológica das águas consumidas nas casas ao redor do Lago Puruzinho/Humaitá – no estado do Amazonas. -----	54
3.10 Análise Estatística. -----	55
4 - RESULTADOS -----	56
4.1 Transparência de diferentes garrafas PET à radiação solar e artificial	56
4.2. Espectro de transmissão da luz através da garrafa PET. -----	57
4.3 Parâmetros físicos da água submetida ao procedimento SODIS. -----	58
4.4 Perda de cor do azul de metileno durante o processo -----	59
4.5 Inativação bacteriana em amostras de água estéril, com diferentes concentrações de AM. -----	60
4.6 Inativação microbiológica em amostras de água estéril com e sem adição do corante AM (50 ng/mL) expostas ao LSS. -----	63
4.7 Aplicação da técnica de membrana filtrante em amostras de água estéril, contaminadas com <i>E. coli</i> (coliformes fecais), expostas aos tratamentos SODIS e SODIS + AM e irradiadas no LSS. -----	68

4.8 Inativação microbiológica em amostras de água mineral comercial com e sem adição do corante AM (50 ng/mL) expostas ao SOL. -----	69
4.9 Inativação microbiológica em amostras de água de um poço artesiano expostas aos tratamentos SODIS e SODIS + AM irradiadas na luz solar. Aplicação da técnica de membrana filtrante -----	76
5 - DISCUSSÃO -----	80
6 - CONCLUSÕES -----	91
7 - PERSPECTIVAS -----	93
8 - ANEXO -----	93
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	99

1 – INTRODUÇÃO

A preservação ambiental é um dos temas mais debatidos atualmente em virtude da interferência humana na natureza nas últimas décadas e, conseqüentemente, das mudanças nos acontecimentos dos fenômenos naturais. Nesse sentido, o uso racional dos recursos hídricos é enfatizado, devido à sua extrema relevância, uma vez que a água é recurso natural não renovável, essencial para a sobrevivência de todas as espécies que habitam a Terra.

No organismo humano a água atua, entre outras funções, como veículo para a troca de substâncias e para a manutenção da temperatura, representando cerca de 70% de sua massa corporal. Além disso, é considerada solvente universal e é uma das poucas substâncias que encontramos nos três estados físicos: gasoso, líquido e sólido.

A ameaça da falta de água, em níveis que podem até mesmo inviabilizar a nossa existência tem se tornado cada vez mais real. Os efeitos na qualidade e na quantidade da água disponível, relacionados com o rápido crescimento da população mundial e com a concentração desta população em megalópoles, já são evidentes em várias partes do mundo (<http://www.mma.gov.br/2009>).

Muito embora a água ocupe aproximadamente 70% da superfície do nosso planeta, 97,5% dela é salgada e o restante é água doce, que nem sempre está disponível/acessível, uma vez que se encontra distribuída nas geleiras, pântanos e lençóis subterrâneos (<http://www.mma.gov.br/2009>). A água doce não está distribuída uniformemente pelo globo, sua distribuição depende essencialmente dos ecossistemas que compõem o território de cada país (<http://www.mma.gov.br/2009>).

O consumo diário de água é muito variável ao redor do planeta, relacionando-se com a disponibilidade local, além de estar fortemente relacionado com o nível de desenvolvimento do país e com o nível de renda das pessoas. Uma pessoa necessita de, pelo menos, 50 litros de água por dia para beber, tomar banho, escovar os dentes, cozinhar, dentre outras atividades (<http://www.mma.gov.br/2009>).

No mundo, o acesso a este recurso natural é restrito, principalmente ao se tratar de água potável. Dados do Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) e da Organização Mundial da Saúde (OMS) revelam que quase metade da população mundial (2,4 bilhões de pessoas) não conta com serviço de saneamento básico e que 780 milhões de pessoas ainda não tem acesso a um sistema de abastecimento de água adequado (WORLD HEALTH ORGANIZATION/UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND – OMS/UNICEF, 2014).

As projeções da OMS indicam que, se esta situação continuar, em 2050 mais de 45% da população mundial estará vivendo em países que não poderão garantir a cota diária mínima de 50 litros de água por pessoa.

Este cenário contribui para a evolução das doenças que podem ser transmitidas pela água, devido aos lançamentos diretos de esgoto sem nenhum tratamento prévio em rios ou em mananciais próximos de onde a população captará água imprópria para o consumo (BOTTO, 2006).

1.1. Doenças causadas por patógenos transmitidos pela água não tratada ou outros materiais contaminados

Patógenos causadores de diarreias não são transmitidos apenas pela água contaminada, são transmitidas também através de mãos sujas, comidas contaminadas, insetos etc. As doenças mais comuns relacionadas à má qualidade da água e falta de saneamento básico são: diarreias por *Escherichia coli* (*E. coli*), salmoneloses (disenterias e febre tifóide), shigeloses (disenteria bacilar), cólera, leptospirose, hepatite, diarreias por rotavírus, esquistossomose, amebíase, giardíase, ascaridíase e estrogiloidíase.

A bactéria reconhecida como o indicador universal de contaminação fecal de animais homeotérmicos, é a *E. coli*. Ela faz parte do grupo das bactérias denominado coliforme e, em particular, dos coliformes termotolerantes, considerados durante muitos anos como indicadores desse tipo de contaminação. Os coliformes fecais/termotolerantes são bactérias Gram negativas em forma de bacilos, caracterizadas pela presença de enzima β -galactosidase, com capacidade de fermentar lactose em elevada temperatura, de 44° a 45°C. Esse grupo compreende principalmente a bactérias *E. coli*, mas também espécies de *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*. Estas últimas, além de presentes em fezes de animais homeotérmicos, também podem ser encontradas em solos, plantas ou quaisquer efluentes contendo matéria orgânica (APHA, 1998).

Tarrass e Benjelloun em 2012 identificaram duas diferentes formas de transmissão de doenças associadas com a água: a forma direta através das fezes e pela via mão – boca, e a forma indireta através de alimentos, utensílios domésticos e água contaminada. Também classificaram as doenças de acordo com a rota de transmissão dos patógenos em seis classes:

1. Doenças de origem hídrica (*waterborne diseases*), ou seja, causadas pela ingestão de água contaminada por excretas de origem humana ou animal, contendo bactérias patogênicas ou vírus que causam doenças diarreicas;
2. Doenças com base na água (*water based diseases*) são causadas por parasitas encontrados em organismos intermediários que vivem em água como a esquistossomose e alguns outros helmintos;
3. Doenças associadas com água (*water related diseases*) são causadas por micro-organismos associados a insetos, principalmente mosquitos, que se reproduzem perto das águas ou que põem seus ovos nas águas; inclui dengue, filariose linfática, malária, oncocercose e febre amarela;
4. Doenças associadas a material excretado por animais (*excreta-related diseases*). Causadas pelo contato direto ou indireto, com patógenos associados com excrementos e/ou com vetores que se reproduzem nesses excrementos. Inclui tracoma e a maioria das doenças transmitidas pela água;
5. Doenças relacionadas com coleta e armazenamento de água (*water collection and storage related diseases*). A contaminação que ocorre durante ou após a coleta é muitas vezes por causa de recipientes abertos, mal projetados e higiene inadequada no manuseio; e
6. Doenças relacionadas a toxinas (*toxin-related diseases*). Bactérias tóxicas tais como cianobactérias, que estão ligadas à eutrofização dos corpos de águas superficiais, causando doenças gastrointestinais e hepáticas.

A maioria das diarreias tem suas origens nas infecções gastrointestinais por vírus, bactérias, protozoários ou helmintos patogênicos em alimentos ou água. Essas doenças causam alterações nos processos metabólicos celulares

e perda de água e eletrólitos, causando desidratação e morte, se não houver reposição destes rapidamente (OMS/UNICEF, 2009).

1.2. Impacto da qualidade da água e saneamento sobre as crianças

De acordo com o relatório da UNICEF e da OMS em 2009, a diarreia mata cerca de 1,5 milhão de crianças a cada ano. Esta doença mata mais crianças do que a AIDS, a malária e o sarampo juntos, tendo maior incidência em locais pobres, que são afetados pela falta de água tratada e investimentos em infraestrutura de sistemas de abastecimento e tratamento sanitário. Embora a falta de água tratada e saneamento possa afetar pessoas de todas as idades, a saúde das crianças é particularmente comprometida. Casos graves de diarreia podem causar a desidratação, podendo levar a criança a óbito rapidamente.

1.3. Impacto da qualidade da água e saneamento sobre as mulheres

As mulheres também são particularmente suscetíveis a muitos problemas ambientais principalmente durante a gravidez. As doenças ligadas à água não tratada e a falta de saneamento, contribuem para criar graves problemas de saúde às futuras mães que podem também afetar sua capacidade de lidar com dificuldades durante a gravidez, o parto, o pós-parto, a amamentação e os cuidados com o recém-nascido (UNITED NATIONS HUMAN SETTLEMENTS PROGRAMME (UNHSP), 2003; WORLD BANK (WB), 1990). Essas doenças, associadas à ausência ou má qualidade dos serviços de saúde para mulheres grávidas, contribuem para elevadas taxas de mortalidade materna nos países em desenvolvimento (UNHSP, 2003).

1.4. Impacto da qualidade da água e saneamento sobre a família

A boa saúde da família é essencial à subsistência. Adultos doentes ou que precisam cuidar de crianças doentes são menos produtivos. Melhorias no saneamento, higiene e condições da água contribuem para a saúde, gerando economia para as famílias pobres através da diminuição dos custos e perda de tempo (TARRASS & BENJELLOUN, 2012).

Recente análise de custo-benefício pela OMS mostrou que o acesso à água tratada e saneamento trariam ganhos econômicos substanciais à saúde humana seguido de outros benefícios: cada dólar investido daria um retorno econômico de 3 a 34 dólares, dependendo da região. Os benefícios incluiriam também a redução média global de episódios de diarreia em torno de 10% (TARRASS & BENJELLOUN, 2012).

1.5. Prevenção de diarreias

O acesso à água potável e boas práticas de higiene são altamente eficazes na prevenção de diarreias, reduzem a morbidade por diarreia em 21% e 37,5% respectivamente. Lavar as mãos pode reduzir o número de casos de diarreia em até 35% e melhorias na qualidade da água, como a sua desinfecção, reduziria episódios de diarreia em 45% (TARRASS & BENJELLOUN, 2012).

A questão da reforma sanitária vem sendo, por décadas, discutida pelas autoridades em saúde pública e identificada como importante para redução e prevenção de doenças transmitidas por micro-organismos por via hídrica. Mas, dados estatísticos mostram quão grandes ainda é esse desafio (TEIXEIRA & GUILHERMINO, 2006). Por exemplo, a qualidade da água para abastecimento

urbano no país é seriamente comprometida pela descarga indiscriminada de águas residuais domésticas sem qualquer tipo de tratamento, o que agrava a obtenção de água para consumo humano dentro dos padrões de potabilidade exigidos (Portaria MS N^o 2914 de 12/12/2011).

Desta forma, é importante apoiar ações voltadas para a redução da poluição das águas, tais como: implementação de sistemas de tratamento de esgoto, tratamento adequado de resíduos (instalação de sistemas de coleta seletiva, implementação de estações de recebimento de produtos tóxicos (<http://www.mma.gov.br/2009>), além da utilização de técnicas que possam favorecer/melhorar a qualidade das águas já contaminadas.

1.6. Panorama do saneamento básico no Brasil

1.6.1. Saneamento básico no país

Uma visão geral da situação do saneamento básico no Brasil foi apresentada no Plano Nacional de Saneamento Básico (PLANSAB) de maio de 2013, coordenado pelo Ministério das Cidades, que analisou algumas variáveis que mostram desigualdades socio-econômicas regionais existentes no país. Estimativa do déficit e de práticas consideradas adequadas para o saneamento básico com base em três componentes avaliados está na tabela 1.

Tabela 1 – Estimativa de acesso ao saneamento básico na população brasileira, em 2010.

COMPONENTE	ATENDIMENTO ADEQUADO		DÉFICIT			
			Atendimento precário		Sem Atendimento	
	(x 1.000 hab.)	%	(x 1.000 hab.)	%	(x 1.000 hab.)	%
Abastecimento de água	112.497	59,4	64.160	33,9	12.810	6,8
Esgotamento sanitário	75.369	39,7	96.241	50,7	18.180	9,5
Manejo de resíduos sólidos	111.220	58,6	51.690	27,2	26.880	14,2

Adaptado de: Censo Demográfico de 2010 (IBGE, 2011), Sistema Nacional de Informação sobre Saneamento (SNIS, 2010), Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental do Ministério das Cidades (SNSA/M Cidades), PLANSAB, 2013.

Observa-se que, embora a maioria da população brasileira, em 2010, tivesse acesso a condições adequadas de abastecimento de água potável e de manejo de resíduos sólidos, o déficit em saneamento básico ainda é bastante significativo e representa milhões de pessoas vivendo em ambientes insalubres e expostos a diversos riscos que podem comprometer a sua saúde.

1.6.2. Abastecimento de água nas diversas regiões do país

É na região Norte onde a população, proporcionalmente, mais utiliza água proveniente de poço ou nascente para suprir suas necessidades, provavelmente pela dificuldade de implantar redes hídricas em comunidades muito dispersas. As regiões Nordeste e Sudeste são as que exibem a maior proporção de domicílios ligados à rede hídrica geral. No Sul e o Centro-Oeste a

situação é semelhante no que diz respeito ao abastecimento por rede com canalização interna, com aproximadamente 75% de seus domicílios abastecidos dessa forma. No entanto, a parcela restante dos domicílios da região Sul é predominantemente abastecida por poço ou nascente com canalização interna, sendo que na região Centro-Oeste há uma parcela considerável de atendimento por cisterna, carro pipa e outra forma de abastecimento de água (6,6%). A distribuição proporcional quanto às diversas formas usadas para obtenção de água em cada região do País está representada na Figura 1.

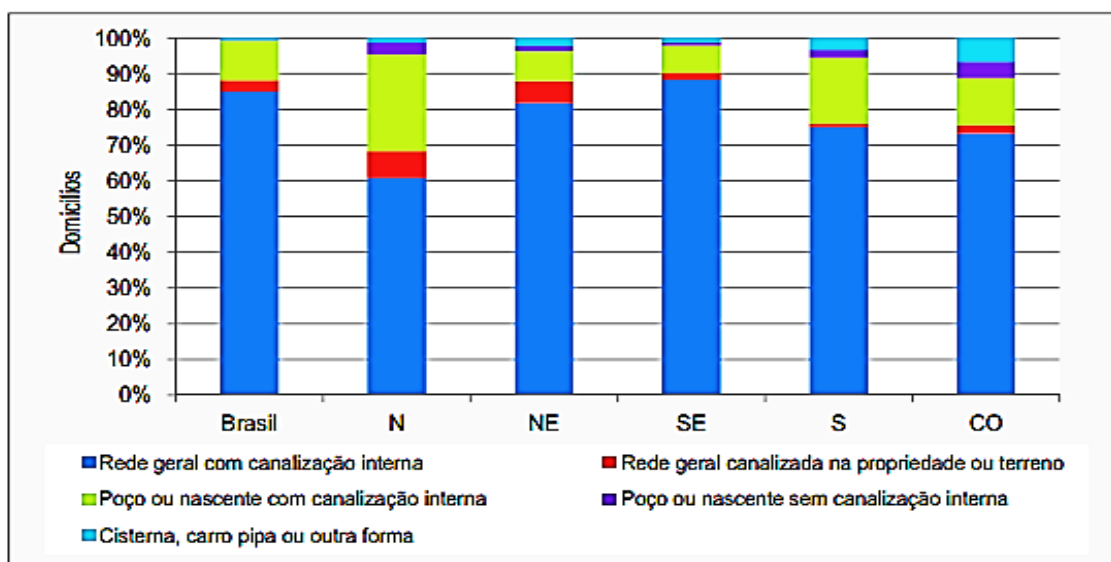


Figura 1 - Formas utilizadas para abastecimento de água em proporção de domicílios no Brasil e regiões. Adaptado de Censo Demográfico 2010 (IBGE, 2011).

1.6.3. Esgotamento sanitário no país

Segundo definição da Norma Brasileira - NBR 9648 (ABNT, 1986), esgotamento sanitário “é o conjunto de condutos, instalações e equipamentos destinados a coletar, transportar, condicionar e encaminhar, somente esgoto

sanitário, a uma disposição final conveniente, de modo contínuo e higienicamente seguro”.

Observa-se que, em 2010, 35% da população brasileira contava com soluções inadequadas para o tratamento de seus esgotos (lançamento em fossa rudimentar (26%), rio, lago, mar ou outro escoadouro (6%), sem sanitário (3%)). Além disso, apenas 53% do volume de esgotos coletados recebiam algum tipo de tratamento, antes de sua exposição ao meio ambiente.

A situação do tratamento dos esgotos sanitários está indicada na Figura 2.

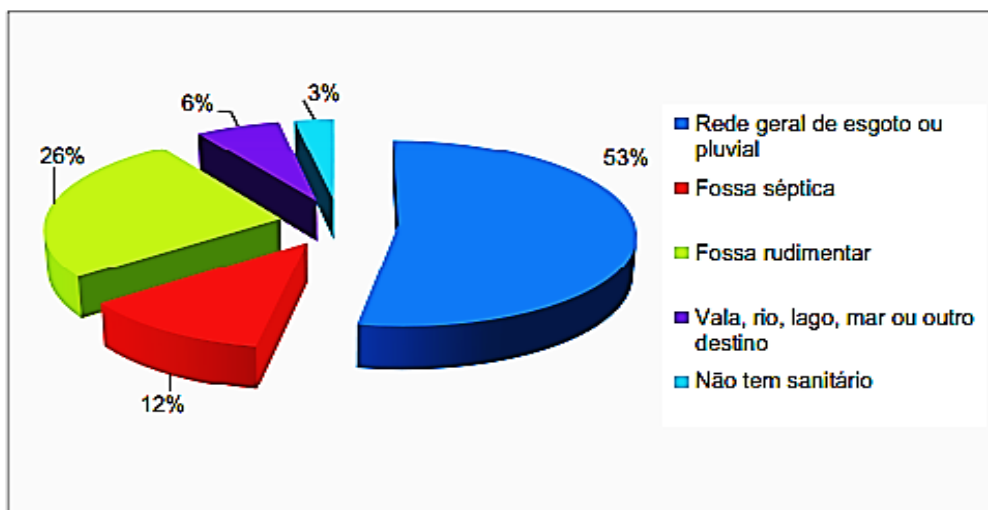


Figura 2 – Tipos de esgotos sanitários no Brasil (proporção da população em 2010). Adaptado de Censo Demográfico 2010 (IBGE, 2011).

Todos os dias, sete crianças morrem em consequência da falta de saneamento no Brasil. Para zerar o déficit de saneamento básico e oferecer acesso universal à coleta e ao tratamento de esgoto, o governo precisa de investimentos anuais de 10 bilhões de reais nos próximos 20 anos. É bastante dinheiro, mas os prejuízos causados pela falta de investimento em saneamento

são ainda maiores. Cada 1 real investido em saneamento representa uma economia de 4 reais em gastos com saúde (<http://www.tratabrasil.org.br/manifesto>).

1.6.4. Normas de qualidade da água para consumo humano

Em dezembro de 2011, o Ministério da Saúde publicou a Portaria nº 2914, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano. O padrão de potabilidade da água está apresentado no Quadro 1.

Capítulo V

Padrão de Potabilidade

Art. 27º. *A água potável deve estar em conformidade com padrão microbiológico, conforme disposto no Anexo I e demais disposições desta Portaria.*

Quadro 1 - Padrão microbiológico da água recomendada para consumo humano

Tipo de água		Parâmetros		VMP ⁽¹⁾
Água para consumo humano		<i>E. coli</i> ⁽²⁾		Ausência em 100 MI
Água tratada	Na saída do tratamento	Coliformes totais ⁽³⁾		Ausência em 100 mL
	No sistema de distribuição (reservatórios e rede)	<i>E. coli</i>		Ausência em 100 mL
		Coliformes totais ⁽⁴⁾	Sistemas ou soluções alternativas coletivas que abastecem a partir de 20.000 habitantes	Apenas uma amostra, entre as amostras examinadas no mês, poderá apresentar resultado positivo.
				Ausência em 100 mL em 95% das amostras examinadas no mês

Notas:

(1) Valor máximo permitido

(2) Indicador de contaminação fecal

(3) Indicador de eficiência de tratamento

(4) Indicador de integridade do sistema de distribuição (reservatório e rede)

Portaria MS Nº 2914 DE 12/12/2011 (Federal) /Data D.O.: 14/12/2011

O padrão microbiológico traz a obrigatoriedade da análise de *E. coli* considerado o melhor indicador bacteriano para contaminação fecal. No entanto, nessa Portaria quanto à questão do monitoramento de vírus entéricos nos pontos de captação de água proveniente de mananciais superficiais de abastecimento, suas análises continuam apenas como “*recomendação*”. Não sendo obrigatória, porém, a vigilância quanto a esse grupo de microrganismos, representando sério risco para a saúde da população.

Capítulo V

Padrão de Potabilidade

Art. 29º. *Recomenda-se a inclusão de monitoramento de vírus entéricos no(s) ponto(s) de captação de água proveniente(s) de manancial (is) superficial (is) de abastecimento, com o objetivo de subsidiar estudos de avaliação de risco microbiológico.*

1.6.5. Soluções para melhoramento da potabilidade da água

A solução ideal para o fornecimento de água apropriada para consumo envolve além do saneamento básico, infraestrutura para armazenamento e abastecimento de água. Essa proposta é dificultada pelo alto custo e longo tempo de realização, o que é agravado em países em desenvolvimento com grande extensão territorial. Quando a necessidade de se obter água com qualidade para o consumo humano é imediata independente do tamanho do país. Uma alternativa, caracterizada pelo seu baixo custo e pela simplicidade da forma como é realizada, é a desinfecção utilizando a energia solar. Este método é conhecido mundialmente como SODIS - *Solar Water Disinfection* (CASLAKE *et al.*, 2004). A desinfecção solar é utilizada diariamente por mais

de 4,5 milhões de pessoas em mais de 50 países em desenvolvimento como indicado na Figura 3 (McGUIGAN *et al.*, 2012).

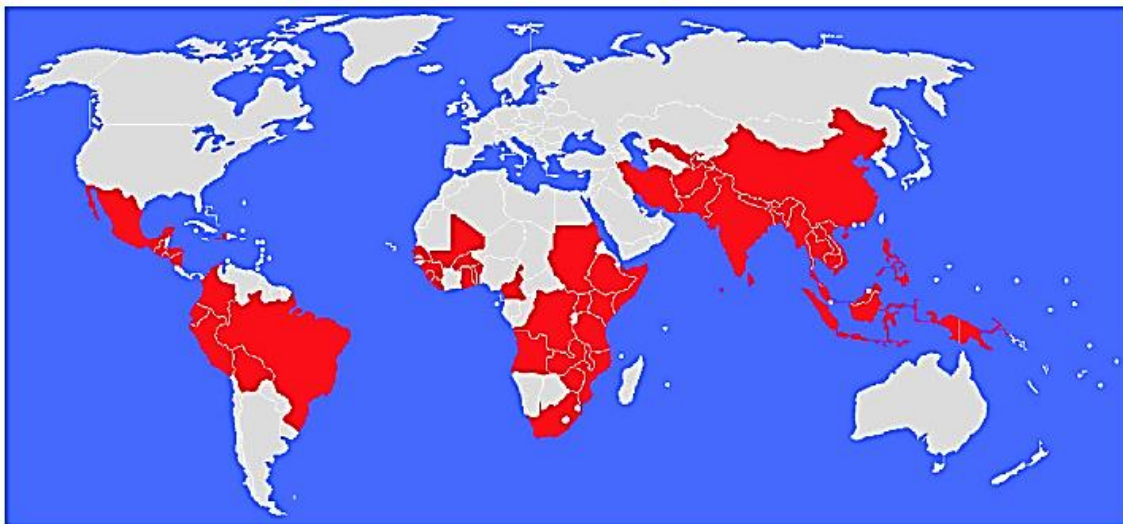


Figura 3 - Mapa do mundo, indicando os 55 países onde a técnica SODIS é realizada (MEIERHOFER & LANDOLT, 2009).

Um dos objetivos do método SODIS é minimizar os impactos das mudanças climáticas sobre a saúde humana, além do aproveitamento de um recurso natural importante, a luz solar, como fonte de esterilização da água (EWAG/SANDEC, 2002).

Este método é efetivo contra uma ampla gama de patógenos, além de ser muito simples e de custo praticamente nulo. Por outro lado, alguns patógenos ainda são resistentes à luz solar e há problemas para garantir a qualidade e as condições da garrafa (ALROUSAN *et al.*, 2009; BYRNE *et al.*, 2011).

A desinfecção solar não é uma tecnologia recente. O efeito bactericida de luz solar foi rigorosamente investigado por Downes e Blunt em 1877, mas foi em 1984 que Acra e colaboradores em uma publicação da UNICEF preconizaram que a luz solar poderia ser utilizada para desinfecção da água contaminada com micro-organismos. Este estudo pesquisou principalmente a

influência e o efeito dos raios ultravioleta na viabilidade da *Escherichia coli*. (ACRA *et al*, 1984).

Em 1997/1998 houve um surto de cólera no Quênia, e pesquisas demonstraram a eficácia da desinfecção solar da água na prevenção desta doença em crianças menores de seis anos (CONROY *et al.*, 2001).

O procedimento padrão para técnica SODIS consiste na colocação de garrafas PET (normalmente polietileno tereftalato) transparente, contendo a água não potável a ser consumida, por períodos entre 6-10 horas numa posição de exposição ao máximo período de insolação conforme mostrado na Figura 4. A radiação solar penetra o interior das garrafas atingindo os patógenos, destruindo-os e alcançando 99,9% de morte. De acordo com os padrões de potabilidade da OMS é classificado sem risco nenhum coliforme fecal em 100 mL de suprimentos água (EAWAG/SANDEC, 2002). Nessas condições, a taxa de dose recebida em Ultravioleta (UV) pode chegar a 900 W/m^{-2} no verão e as temperaturas podem variar entre 40°C e 60°C (LONNEN *et al.*, 2005; RIJAL & FUGIOKA, 2001).



Figura 4 - Procedimento padrão para técnica SODIS Adaptado de:

(sodis.ch/methode/anwendung/ausbildungsmaterial/dokumente_material/manual_p.pdf)

1.7. O espectro da radiação solar

A luz solar é composta pela radiação UV, luz visível e infravermelha. O espectro solar é geralmente dividido em várias zonas ou bandas em função do comprimento de onda. A radiação UV é uma radiação eletromagnética não ionizante, compreendida entre 100 e 400 nm. Do ponto de vista dos efeitos biológicos esta radiação é dividida em três faixas de energia: Ultravioleta C (UV-C) (100 – 280 nm), Ultravioleta B (UV-B) (280 – 315 nm) e Ultravioleta A (UV-A) (315 - 400 nm) (Figura 5).

Grande parte da radiação UV é absorvida pelos gases presentes na atmosfera, chegando apenas à superfície terrestre uma proporção de, aproximadamente, 5,1% de UV-A, 0,3% de UV-B, sendo o UV-C totalmente absorvido pelo oxigênio, e este se dissocia formando o gás ozônio (O₃). A luz visível compreende as faixas de 400 a 700 nm sendo que 62,7% chegam à superfície da Terra assim como 31,9% do infravermelho na faixa, entre 700 e 1400 nm, que atravessam os gases atmosféricos. O espectro da radiação solar encontra-se na Figura 5 (GONÇALVES, 2014).

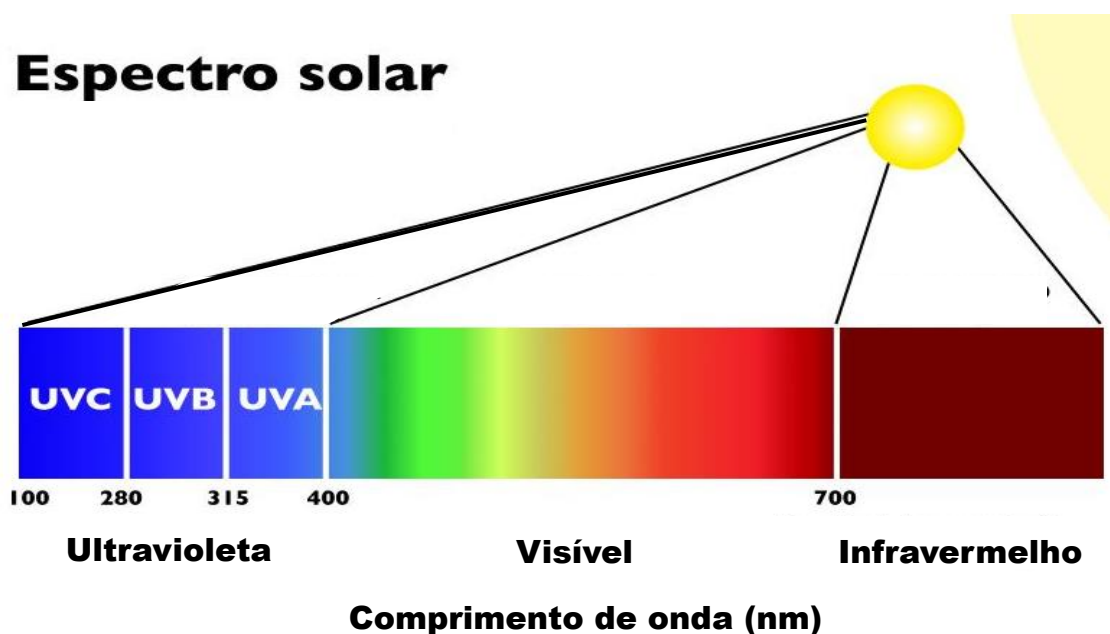


Figura 5 - Faixas da radiação solar

(adaptado de <http://2.bp.blogspot.com/espectro+solar.png>)

Os efeitos biológicos da radiação UV tais como: quebras de ligações químicas e modificações de moléculas são resultantes da absorção fotoquímica do DNA (ácido desoxirribonucleico), seguido das proteínas e outras moléculas como, por exemplo, os esteroides e as porfirinas (LEITÃO *et al.*, 2005).

Embora o UV-A não seja suficientemente energético para modificar diretamente as bases do DNA, essa radiação desempenha papel importante na

formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) na célula, como formação de oxigênio singlete, radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil. Uma vez formadas, estas ERO podem causar danos ao DNA, oxidações de aminoácidos e oxidações de ácidos graxos poli insaturados nos lipídios. Além disso, a luz solar pode ser absorvida por fotossensibilizadores naturais exógenos presentes nas águas superficiais (ácidos húmicos e clorofilas), que potencializam tais efeitos produzidos por ERO (McGUIGAN *et al.*, 2012).

Apesar da baixa incidência do UV-B solar na superfície da terra, é a região do espectro mais letal, podendo induzir a formação de dímeros de pirimidinas ciclobutano (CPD) e o fotoproduto 6-4 pirimidina pirimidona (GONÇALVES, 2014).

A luz visível, à qual nossos olhos são sensíveis, tem comprimentos de onda de 400 a 700 nm e é classificada segundo a cor, violeta para os comprimentos de onda mais curtos e vermelho nos mais longos. Possui importantes aplicações terapêuticas quando atua em presença de determinados fotossensibilizadores, requisito para a ocorrência da ação fotodinâmica (LEITÃO *et al.*, 2005).

A radiação infravermelha tem comprimentos de onda acima de 700 nm e assim como a ultravioleta não é percebida pelo olho humano, entretanto ela é absorvida pela água e é responsável pelo seu aquecimento. As garrafas PET, utilizadas na metodologia SODIS, absorvem em torno de 75% da radiação UV-B e apenas 14% de UV-A. Então, dentre os componentes da radiação solar disponível, o UV-A e o infravermelho são as radiações responsáveis pelo sucesso do método SODIS para a desinfecção da água.

Os organismos patogênicos presentes na água são altamente sensíveis aos agentes UV e temperatura, pois estes não estão bem adaptados às condições hostis do ambiente, uma vez que estão acostumados com as condições internas do intestino humano (pouca luz, umidade, temperaturas entre 36 e 37°C) (EAWAG/SANDEC, 2002). Entretanto, a eficiência do método SODIS depende de alguns fatores, tais como: a intensidade de radiação solar, nebulosidade, tempo de exposição e características químicas e físicas da água (PATERNIANI & SILVA, 2005).

Outros organismos importantes para este estudo são os extremófilos, pois são capazes de sobreviver e se proliferar em ambientes com parâmetros físicos (temperatura, pressão, radiação) e geoquímicos (salinidade, pH, potencial de oxido-redução) extremos. A espécie *Deinococcus radiodurans* pode ser encontrada em uma variedade de habitats, como o intestino animal, fontes termais, nos desertos e Antártica. Além da sua resistência a extremos ambientais, ela também se distingue pela sua capacidade extraordinária para tolerar os efeitos letais de agentes que danificam o DNA, particularmente aqueles de radiação UV e radiação ionizante (SLADE & RADMAN, 2011).

1.8. Regiões geográficas que podem se beneficiar da metodologia SODIS

A intensidade de luz solar ao nível do solo varia de acordo com vários fatores, tais como: latitude, localização geográfica, estação do ano, cobertura de nuvens, poluição atmosférica, altitude acima do nível do mar. Na prática, estas variáveis devem ser consideradas para a otimização da utilização da energia solar.

Como o método SODIS depende de exposição à radiação solar, existem regiões geográficas mais propícias que outras. De um modo geral, as regiões do Brasil entre 15° e 35° de latitude Norte e Sul, compostas de regiões semiáridas, de alta insolação e pouca chuva, recebem cerca de 3000 horas de Sol por ano e são as mais propícias para o SODIS (regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil). Outras regiões do país onde a insolação é também muito boa para a aplicação do método são as situadas entre 0° e 15° de latitude Norte e Sul, que recebem cerca de 2.500 horas de Sol por ano (regiões Norte e Nordeste do Brasil) (EAWAG/SANDEC, 2002). Na Figura 6 estão identificadas as regiões da Terra mais favoráveis ao uso da desinfecção solar por SODIS.

Uma maneira capaz de potencializar os efeitos do SODIS, reduzindo o tempo de exposição ao Sol é a adição de agentes fotossensibilizadores a água (ACHER & JUVEN, 1977).

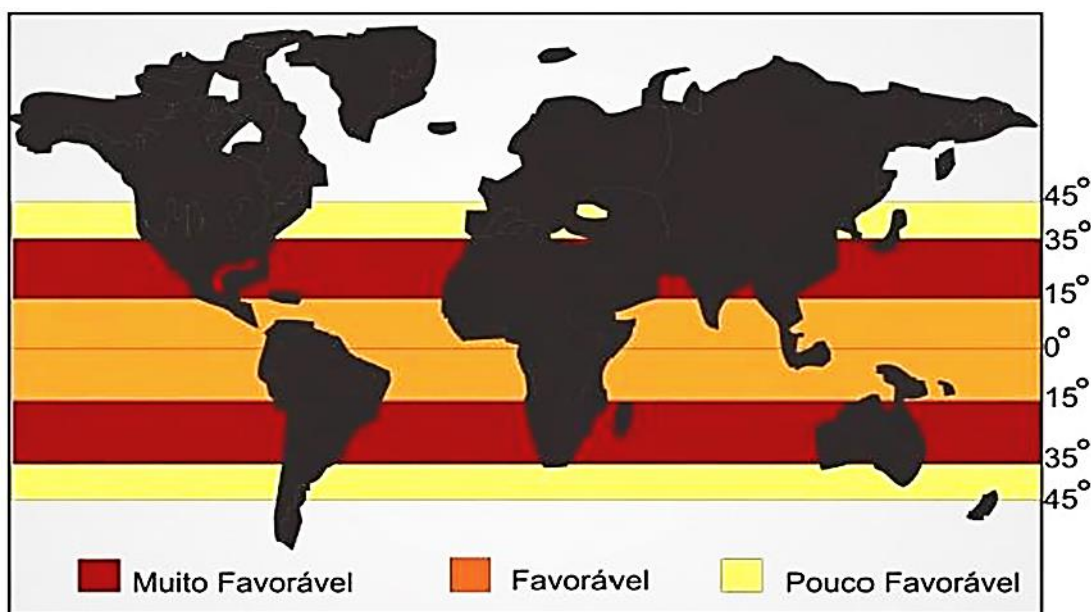


Figura 6 - Regiões em que o uso da desinfecção solar é mais aplicável. Adaptado BOTTO (2006).

1.9. Ação fotossensibilizadora e a escolha do Azul de Metileno (AM)

A absorção da energia fotônica por uma determinada molécula e sua transferência para outra molécula, caracteriza o fenômeno de fotossensibilização (LEITÃO *et al.*, 2005).

A ação fotodinâmica constitui um tipo de reação de fotossensibilização, na qual o sensibilizador (um corante que absorva energia luminosa) passa a um estado eletrônico excitado, normalmente tripleto, e transfere esta energia para o oxigênio; este no estado excitado reage com o substrato oxidando-o (LEITÃO *et al.*, 2005).

O estado tripleto é o estado fundamental do oxigênio, no qual os elétrons estão desemparelhados nos orbitais moleculares. Porém, quando as moléculas desse oxigênio interagem com as moléculas do fotossensibilizador, ativados por luz, ocorre a inversão do spin de um dos elétrons, gerando oxigênio singleto, reativo e altamente oxidante. Na Figura 7 está representado um esquema do processo de oxidação pela ação fotodinâmica.

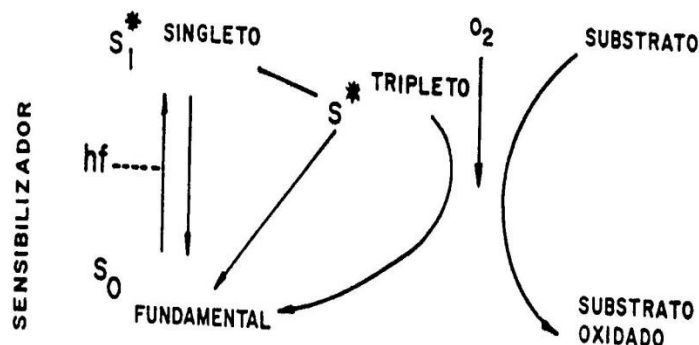


Figura 7 - Representação esquemática da oxidação de um substrato pela ação fotodinâmica de um fotossensibilizador ativado. As moléculas do fotossensibilizador inicialmente no estado fundamental (S_0) absorvem um fóton (hf) em um determinado comprimento de onda e passam para o estado singleto (S_1^* fotossensibilizador excitado) que logo em seguida, passam para um estado

triplete mais longo (S^*). As moléculas no estado triplete (S^*) transferem a energia para o oxigênio (O_2); este, no estado excitado, reage com o substrato, oxidando-o (LEITÃO *et al*, 2005).

Importantes características para um fotossensibilizador é que sejam moléculas, quando no estado fundamental, não causem dano celular em organelas, microestruturas e tecidos levando à intoxicação celular, mas que sejam fotossensibilizadores quando excitados sob luz visível, um requisito essencial para utilização de energia solar.

Corantes com carga positiva, principalmente das classes das fenotiazinas, apresentam características favoráveis para utilização como fotossensibilizadores. São relativamente lipofílicos, o que garante a sua permeação pelas membranas celulares (OLIVEIRA, 2006).

Idealmente, procura-se realizar a ação fotodinâmica com corantes não tóxicos e sensíveis à luz. Quando iluminados com luz visível, em um determinado comprimento de onda, e na presença de oxigênio encontrado no interior das células, produzem ERO que são citotóxicas.

O termo fotocatalise refere-se ao aumento da velocidade de uma foto reação pela ação de um catalisador. Em 2009 foi descrita a utilização do fotocatalisador dióxido de titânio em um equipamento utilizando a energia solar com o objetivo de purificar água em regiões carentes (ALROUSAN *et al*, 2009)

Como desvantagem do método, o material adicionado na água se mantinha numa situação floculada, necessitando completa remoção com um dispositivo filtrante antes do consumo da água.

A ideia proposta nesse projeto é aprimorar as estratégias de desinfecção solar, desenvolvendo uma tecnologia social com base no aumento do volume

de água tratada pelo método SODIS, ampliando a eficácia e a velocidade do processo com uso de fotossensibilizadores não tóxicos para consumo humano e de baixo custo.

Sabendo que o azul de metileno (AM) apresenta intensa absorção luminosa na faixa de 600-660 nm (PERUSSI, 2007), esta substância pode ser um bom fotossensibilizador, pois a emissão solar no vermelho é muito intensa, tornando-o um eficaz para o método SODIS. Na Figura 8 é mostrado o espectro de absorção do AM.

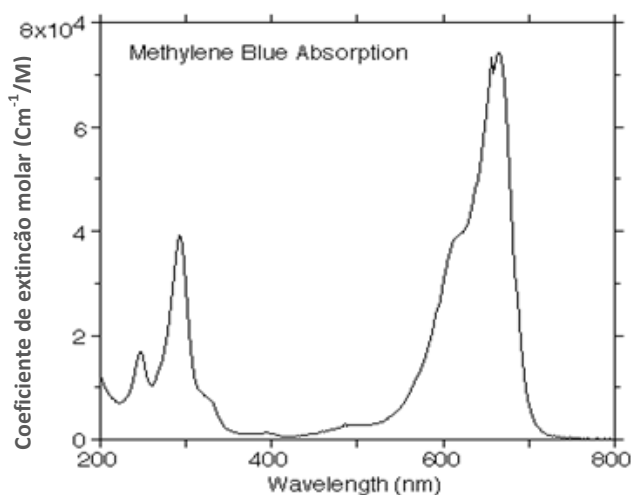


Figura 8 - Espectro de absorção do AM (<http://omLc.org/spectra/mb/>)

O AM foi a primeira droga sintética utilizada em medicina. Em 1891 foi aplicado por Paul Gutmann e Paul Ehrlich para o tratamento de malária tendo sido usado até o final da II Guerra Mundial pelos soldados dos EUA, mas não era bem aceito, uma vez que a ingestão resultava na coloração esverdeada da urina. Mais recentemente, o interesse foi renovado em utilizar o AM como um agente antimalárico, e ao longo do tempo tem sido utilizado para diferentes aplicações (SCHIRMER *et al.*, 2011). O AM é um composto aromático heterocíclico com a fórmula molecular $C_{16}H_{18}N_3SCl \cdot 3H_2O$ e o nome químico

3,7-bis-(dimetilamino cloreto de fenotiazínio-5). Apresenta cor verde-escuro, mas em contato com a água, produz uma solução sintética de cor azul. Após excitação eletrônica gera radical semirreduzido e incolor (leucometileno).

A sua estrutura molecular pode ser visualizada na Figura 9 a seguir:

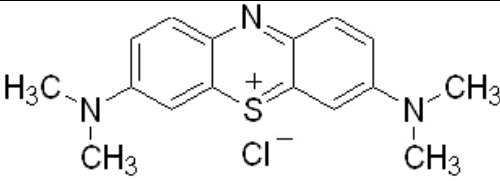
Peso Molecular	373,9
Estrutura Química	

Figura 9 – Fórmula estrutural e peso molecular do AM (PERUSSI, 2007)

Esta substância vem sendo utilizada em vários tratamentos relacionados à saúde humana, de maneira oral, intravenosa ou tópica, como, por exemplo, antisséptico urinário, desinfetante ocular, antiparasitário, associado à luz policromática em casos de herpes simplex, entre outros. Possui uma toxicologia muito baixa e sua maior utilização tem sido no tratamento de metemoglobinemia a uma dose de 1 a 2 mg/kg por via intravenosa (CLIFTON & LEIKIN, 2003), acima desta concentração já são observados efeitos indesejáveis. No Quadro 2 são listadas as manifestações tóxicas associadas à administração de diferentes doses do AM.

A absorção do AM é quase completa quando administrado por via oral e as concentrações plasmáticas máximas são atingidas após 1-2 h da sua

ingestão, mas são 100 vezes menores do que as concentrações após a administração intravenosa de uma dose equivalente (LO *et al.*, 2014).

Quadro 2 -Toxicidade associada à ingestão de diferentes doses do AM (Adaptado de CLIFTON & LEIKIN, 2003)

Concentração (mg/kg/)	Manifestações tóxicas
2-4	Descamação da pele em crianças, anemia
7	Náusea, vômito, dor abdominal, dor no peito, febre, hemólise
20	Hipotensão
80	Coloração azulada da pele (similar para cianose)

A escolha deste corante foi devido ao fato dele preencher os quesitos básicos para um fotossensibilizador ideal: baixa toxicidade quando administrado, não induzindo reação alérgica, facilmente sintetizado, hidrossolúvel, além da rápida eliminação pelo paciente. Ainda é biologicamente estável, fotoquimicamente eficaz e seletivo para células doentes (GARCEZ *et al.*, 2003).

A eficiência do AM está justamente associada à intensificação da produção de ERO, contribuindo para a inativação de micro-organismos (PERUSSI, 2007). O AM é fotodecomposto pela própria radiação solar, o que deixaria o aspecto da água completamente incolor.

1.10. Caracterização do problema

A água contaminada por microrganismos é um veículo importante de enfermidades nos países em desenvolvimento, principalmente em áreas rurais e em comunidades carentes (MINTZ *et al.*, 2001; CASLAKE *et al.*, 2004). O acesso à água potável é restrito nessas regiões, por diversos fatores, levando ao consumo de água diretamente de fontes não tratadas. O método SODIS é uma ferramenta com potencial para descontaminação de águas, com baixo custo, de fácil realização e já bastante utilizado em diversos países do mundo

Entretanto, apresenta algumas limitações: em dias nublados é necessário um tempo maior de exposição à luz solar para desinfecção adequada, bem como à resistência de micro-organismos a radiação, entre outras (FISHER *et al.*, 2008). Resultados recentes têm apontado que a fotocatalise incrementa o potencial esterilizante do método mesmo quando não se pode atingir a irradiância e temperaturas adequadas (BYRNE *et al.*, 2011).

Neste trabalho, estudamos o efeito fotocatalizador do AM associado ao SODIS como um importante agente para descontaminação microbiológica da água em nível caseiro, um método que apresenta baixo custo e não é tóxico. Desta forma, a técnica SODIS-AM seria capaz de prover água segura em comunidades rurais sem oferta de água tratada ou com baixa insolação, para a inativação de microrganismos em geral, resistentes ou insensíveis ao SODIS convencional.

2 - OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar a técnica de desinfecção solar fotossensibilizada a partir da utilização do AM, com o objetivo de aumentar a eficiência do método SODIS, para descontaminação microbiológica de água em nível caseiro para regiões sem acesso à água tratada.

2.1. Objetivos específicos

Análises físicas

- Analisar o espectro de absorção da garrafa PET;
- Determinar transparência de diferentes garrafas PET à luz solar e à luz solar simulada (LSS);
- Determinar a intensidade de radiação UV-A, UV-B e a temperatura, em tempos crescentes, durante a exposição das amostras de água à luz solar; e
- Monitorar a fotodecomposição do AM durante o processo.

Análises biológicas

- Determinar a concentração de AM necessária para acelerar o processo de desinfecção de águas, contaminadas com vírus e bactérias;
- Quantificar a inativação biológica de linhagens de bactérias patogênicas, relacionadas à má qualidade de água e falta de saneamento básico, tais como: *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) e vírus (bacteriófago λ), além do extremófilo *Deinococcus radiodurans* (*D. radiodurans*), seguindo o mesmo protocolo aplicado para as demais bactérias;

- Aplicar a técnica de membrana filtrante para controlar a inativação dos coliformes fecais aos tratamentos; e
- Aplicar o método na região ribeirinha do Lago Puruzinho em Humaitá- Amazônia- Parte do Projeto INPeTAm.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Meios de cultura, tampão e fotossensibilizador

O meio LB foi utilizado para o crescimento das cepas bacterianas, com exceção da *D. radiodurans* que foi crescida em meio TGY. O tampão M9 foi utilizado para fazer as diluições e o ágar semissólido na semeadura dos vírus. A composição de cada meio está descrita a seguir:

→ Meio LB (MILLER, 1992) - pH 7,0

NaCl 10g ou 1% (Indústrias Químicas Merck)

Bacto-triptona 10g ou 1% (Difco Laboratories)

Extrato de levedura 5g ou 0,5% (Difco Laboratories)

Água deionizada q.s.p. 1000 mL

- Meio LB solidificado com ágar 15g ou 1,5% (Difco Laboratories)

→ Meio TGY (ANDERSON *et al.*, 1956) - pH 7,0

Bacto-triptona 5g ou 0,5% (Difco Laboratories)

Extrato de leveduras 3g ou 0,3% (Difco Laboratories)

Glicose 1g ou 0,1% (Indústrias Químicas Merck)

Água deionizada q.s.p. 1000 mL

- Meio TGY solidificado com ágar 15g ou 1,5% (Difco Laboratories)

→ Tampão M9 (MILLER, 1992) - pH 7,0

Na₂HPO₄ anidro 6g ou 0,6% (Indústrias Químicas Merck)

KH₂ PO₄ anidro 3g ou 0,3% (Indústrias Químicas Merck)

NH₄Cl 1g ou 0,1% (Indústrias Químicas Merck)

NaCl 0,5g ou 0,05% (Indústrias Químicas Merck)

Água deionizada q.s.p. 1000 mL

→ Top-ágar ou ágar semissólido

NaCl 0,8g ou 0,8% (Indústrias Químicas Merck)

Agar Difco 0,7 g ou 0,7% (Difco Laboratories)

Água deionizada q.s.p. 100 mL

Após o preparo, os meios LB líquido e sólido, assim como o tampão M9 e o *top-ágar* foram autoclavados durante 30 minutos a 120°C. O meio TGY foi autoclavado por 15 min a 120°C. Após a autoclavagem, à temperatura ambiente, ao M9 eram adicionados 100 µl de MgSO₄.7H₂O 1mM (Indústrias Químicas Merck) e 100µl de CaCl₂ 0,1mM (Indústrias Químicas Merck) a cada 100mL do tampão.

→ Meio Chromocult[®]

Dissolver 26,5g em 1 litro de água deionizada aquecida (45°C - 50°C).

Não autoclavar. Distribuir 10 mL nas placas de Petri.

O Chromocult é um meio de cultura seletivo que diferencia coliformes fecais e totais, através da detecção de duas enzimas, a β-glicuronidase e a β-galactosidase, respectivamente. Além desta característica que o torna

diferencial, este meio possui um composto chamado Tergitol7, que inibe o crescimento de outras bactérias da flora.

Também possui o SALMON-GAL, que é um substrato para a enzima β -galactosidase (específica do grupo dos coliformes). Após a hidrólise, o SALMON-GAL gera um composto cromogênico que leva colônias bacterianas possuidoras desta enzima a desenvolver coloração variando entre salmão e vermelho. Ao mesmo tempo, este meio possui o X-GLUC, que é substrato para a enzima β -glicuronidase (específica da bactéria *E. coli*).

Após hidrólise do substrato, uma substância é gerada, levando ao crescimento de colônias de coloração variando entre o azul claro e o turquesa. Como a *E. coli* produz ambas as enzimas, ela é capaz de provocar a clivagem de ambos os substratos (o SALMON-GAL e o X-GLUC). A hidrólise simultânea destes compostos faz com que cresçam colônias de coloração entre o azul escuro e o violeta (Figura 10), tornando as colônias de coliformes fecais facilmente distinguíveis dos outros coliformes.

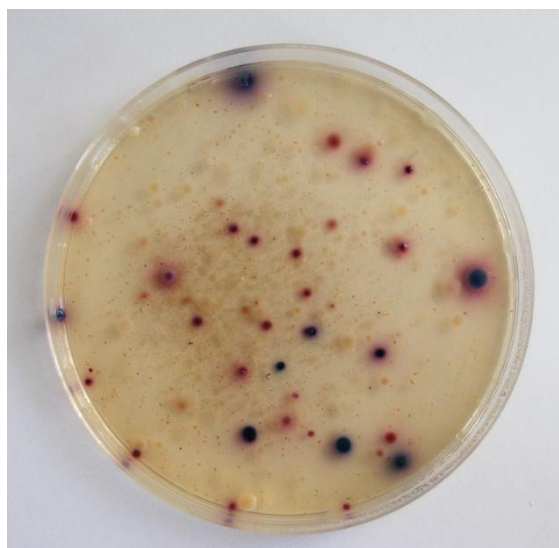


Figura 10 – Fotografia de uma Placa de Petri contendo o Meio Cromocult[®]. As colônias azul escuro e violeta são coliformes fecais, as demais colônias, coliformes totais. (<http://enfo.agt.bme.hu>)

→ Fotossensibilizador

O corante utilizado como fotossensibilizador foi o azul de metileno (AM) (Sigma-Aldrich), preparado como solução-estoque de 1mM com água deionizada estéril. Essa solução permanecia em temperatura ambiente, em tubos de rosca e protegida da luz. Sendo uma solução estável, era preparada fresca somente quando necessário.

3.2. Análise do espectro de absorção das garrafas PET

Fragmentos cortados da parede de garrafas PET incolores foram submetidos ao espectrofotômetro (Hitachi U-3300) para fazer a varredura e identificação do comprimento de onda, dentro do visível, na faixa em que o material PET absorve.

3.3. Medidas da transparência de diferentes garrafas PET à radiação solar real e artificial com o uso de dosímetros

Foram cortadas tiras de garrafas PET incolor de diferentes marcas e colocadas sobre a fotocélula de dosímetros específicos, a fim de obtermos a leitura das radiações: UV-A e UV-B, sob a luz solar real e a luz solar artificial. Nos experimentos realizados no laboratório, utilizou-se um simulador solar da marca ORIEL/NEWPORT, MODELO 91192, com lâmpada de xenônio e potência de até 1000 W contendo os filtros (NEWPORT) AMO atenuador atmosférico, que retira o excesso de infravermelho e o 87066, que bloqueia parte da luz visível. Este aparelho emite radiações que simulam o espectro da radiação solar emitindo luz solar simulada (LSS) e pode ser regulados, para trabalhar em potências menores, simulando dias menos ensolarados,

diferentemente dos experimentos realizados ao ar livre, portanto sob a luz solar. Uma fotografia do simulador solar está apresentada na Figura 11. Na Figura 12, também apresentamos o esquema dos compartimentos internos do aparelho.



Figura 11 - Fotografia do simulador solar ORIEL. Placas de 24 poços e garrafas PET de 300 mL posicionadas sob a luz solar artificial no momento da irradiação

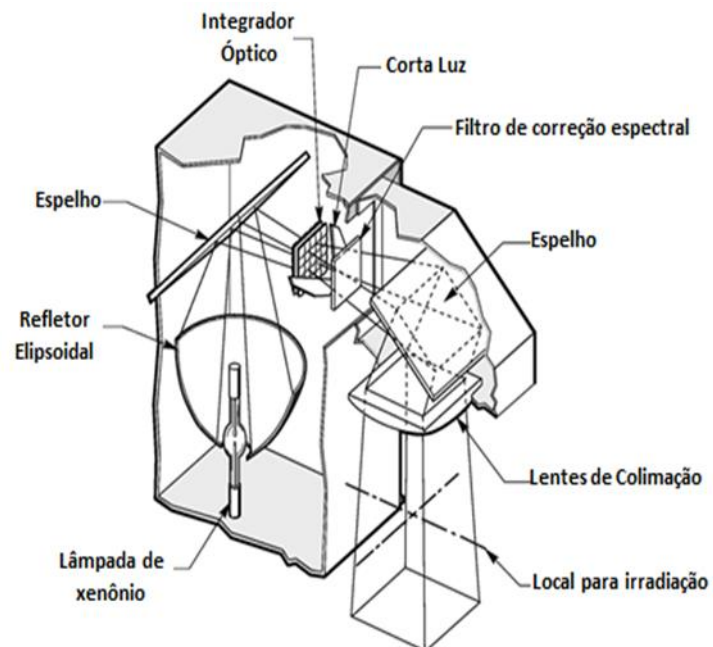


Figura 12 - Esquema dos compartimentos internos do simulador solar Oriel

3.4. Monitoramento dos parâmetros físicos da água submetida ao procedimento SODIS

O monitoramento foi realizado a cada 30 minutos ao longo de 9 horas de experiência, quando avaliamos os seguintes parâmetros:

- Temperatura local;
- Temperatura dentro da garrafa (exposta à LUZ e no ESCURO);
- Irradiação UV-A e UV-B e
- Absorbância de uma alíquota da garrafa (exposta à LUZ e no ESCURO).

Além dos parâmetros descritos, foi também medida a decomposição do AM ao longo das 9 horas de exposição à luz solar.

3.5. Monitoramento da inativação bacteriana em amostras de água estéril a qual foram adicionados micro-organismos e AM a diferentes concentrações

Os experimentos realizados serviram para detectar a concentração mínima, porém eficaz do fotossensibilizador. Para tal, foram testadas as seguintes concentrações de AM: 50 ng/mL, 100 ng/mL e 200 ng/mL.

3.6. Cepas bacterianas

Foram utilizadas nos experimentos espécies bacterianas de *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. epidermidis* e *D. radiodurans*. Na Tabela 2 encontram-se relacionadas todas as espécies, bem como suas características genéticas mais relevantes.

Tabela 2: Espécies bacterianas utilizadas nos experimentos

Espécie	Genótipo relevante	Fenótipo relevante	Antibiótico
<i>E. coli</i> K12 A15	Selvagem	Proficiente em todos os mecanismos de reparo de DNA	Estreptomicina 100 µg/mL
<i>S. typhimurium</i> TA 102	Selvagem	Proficiente em todos os mecanismos de reparo de DNA	Ampicilina 20 µg/mL e tetraciclina 12,5 µg/mL
<i>S. epidermidis</i> W5	Selvagem	Proficiente em todos os mecanismos de reparo de DNA	Sem antibiótico
<i>D. radiodurans</i> GY 9613 (R1)	Selvagem	Proficiente em todos os mecanismos de reparo de DNA	Sem antibiótico

Tabela 3: As cepas bacterianas utilizadas para a inoculação dos vírus.

Cepas	Genótipo relevante	Fenótipo relevante	Antibiótico
<i>E. coli</i> AB 1157	Selvagem	Proficiente em todos os mecanismos de reparo de DNA	Estreptomicina 100 µg/mL
<i>E. coli</i> AB 1886	[AB1157] <i>uvrA6</i>	Deficiente na proteína UvrA	Estreptomicina 100 µg/mL
<i>E. coli</i> AB 2463	[AB1157] <i>recA13</i>	Deficiente na proteína RecA	Estreptomicina 100 µg/mL
<i>E. coli</i> AB 2480	[AB1157] <i>uvrA6</i> <i>recA13</i>	Deficientes nas proteínas UvrA e RecA	Estreptomicina 100 µg/mL

O vírus utilizado nos experimentos foi o bacteriófago λ . Todas as espécies de *E. coli* são originárias de P. Howard-Flanders, Yale University, USA. As espécies *S. typhimurium* e *D. radiodurans* foram gentilmente cedidas por Bruce N. Ames, University of California, USA e Carlos Eduardo Bonacossa, IRD/Cnen, Brasil respectivamente.

3.7. Análises da inativação bacteriana – *E. coli* (K12A15), *S. typhimurium* (TA102) e *S. epidermidis* (W5), *D. radiodurans* (GY9613) e vírus – (Bacteriófago λ) – aos tratamentos SODIS e SODIS + AM (50 ng/mL)

3.7.1. Dosimetria das radiações UV

A intensidade da radiação solar simulada e radiação solar natural foi medida assim como a temperatura. O dosímetro BLAK-RAY – J-221 foi utilizado para dosar a intensidade dos raios UV-A. Para os raios UV-B o dosímetro utilizado foi o VILBER LOURMAT – VLX - 3 W acoplado a uma fotocélula para 312 nm, série 21-216.

3.7.2. Cultivo dos micro-organismos

A) Bactérias

As cepas bacterianas foram mantidas em estoques (tubos de vidro) chamados *slants*, que consistem em meio LB suplementado com timina 50 $\mu\text{g/mL}$ e solidificado com ágar 0,75%, mantidos em temperatura ambiente. Para utilização frequente das cepas, as culturas foram mantidas em criotubos contendo a cultura em fase estacionária, em glicerol 87% na proporção de 1:1 a -70°C . As culturas utilizadas nos experimentos eram transferidas com o

auxílio de micropipetas dos estoques a -70°C para Erlenmeyers contendo meio LB líquido com o antibiótico apropriado. Após o inóculo, as culturas eram crescidas em meio LB, durante a noite a 37°C sob agitação de 160 rpm (ENVIRONMENTAL INCUBATOR SHAKER – G24), até alcançarem a fase estacionária (cerca de 10^9 células/mL).

→ **Obtenção das culturas bacterianas para os experimentos**

As culturas bacterianas, previamente cultivadas durante a noite, eram inoculadas em água estéril ou água mineral comercial, obtendo a concentração final de 10^6 bactérias/mL.

B) Vírus (Bacteriófago λ)

A suspensão de vírus foi inoculada em água estéril ou água comercial mineral obtendo uma concentração final de 10^6 vírus/mL a partir de um estoque anterior concentrado (10^9 PFU/mL).

3.7.3 Irradiação dos micro-organismos

Para irradiação com LSS, à água estéril foram adicionadas bactérias nas concentrações indicadas acima e a suspensão com volume de 2 mL/poço foi distribuída em duas placas de acrílico (A e B - capacidade de 24 poços cada). Cada placa foi dividida em duas metades, sendo na segunda, em cada poço foi adicionada solução de AM a concentração final de 50 ng/mL. A placa A foi mantida sob LSS e a placa B foi envolta em papel alumínio, mantida como

controle no escuro. Na Figura 13 está representado o esquema da distribuição das amostras nos 24 poços das placas usadas na experiência.

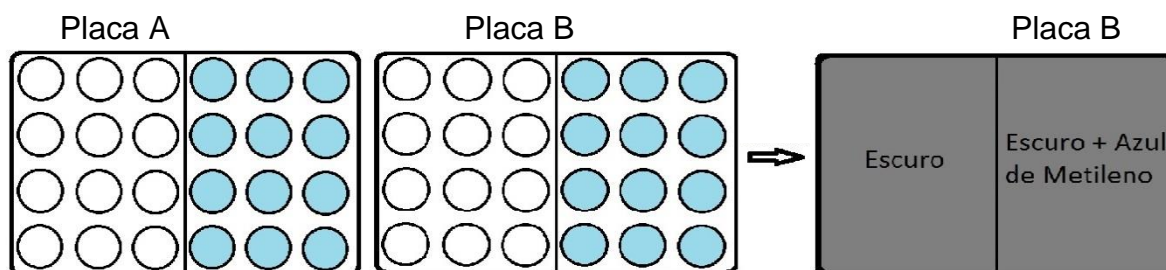


Figura 13 - Esquema das placas de 24 poços utilizadas com alíquotas de água contendo micro-organismo, para padronização dos parâmetros experimentais.

Em seguida, as placas A e B foram irradiadas, a placa A foi submetida à proteção de garrafa PET incolor (2 L) – na LSS por 3 horas, retirando alíquotas de 0,1mL nos tempos 0, 30, 60, 120 e 180 minutos.

Para irradiação no Sol as amostras de água mineral comercial contendo micro-organismos foram distribuídas em garrafas PET de 2 L e submetidas aos tratamentos SODIS e SODIS + AM (50 ng/mL).

3.7.4. Crescimento e contagem dos micro-organismos

Após cada tempo de exposição ao Sol ou LSS, as amostras com bactérias foram diluídas ou não em tampão M9, semeadas em placas de Petri contendo o meio LB sólido.

Já para as análises da inativação do bacteriófago λ , foram feitas diluições seriadas de modo a se obter 100 centros infecciosos (plaques) de vírus por placa semeada. Uma alíquota de 0,1 mL de cada uma das várias diluições da suspensão de vírus foi misturado com 0,3 mL de uma cultura bacteriana de *E.coli* em fase estacionária somados com 3 mL de agar semissólido e semeados em placas de Petri contendo o meio LB sólido.

As placas com bactérias ou vírus foram mantidas a 37°C por aproximadamente 24 horas para posterior contagem das colônias ou plaques, respectivamente. Posteriormente, foram construídos gráficos expressando a curva de inativação dos micro-organismos ao tratamento simultâneo SODIS com 50 ng/mL de AM.

3.8. Aplicação da técnica de membrana filtrante

A fim de confirmar a inativação microbiológica em amostras de água estéril contaminadas com cerca de mil células de *E.coli* (indicador de coliformes fecais), as garrafas PET de 300 mL foram expostas ao LSS com ou sem AM por até 2 horas, retirando alíquotas de 100 mL de cada garrafa nos tempos 0, 1 e 2 horas. Em um kit de microfiltração (ADVANTEC MFS), contendo uma membrana de nitrato de celulose (MICROCLAR/porosidade 0,45µm), estas amostras foram filtradas com auxílio da bomba peristáltica e a membrana foi inoculada em placa de acrílico (NUNC BRAND PRODUCTS) contendo meio seletivo para coliformes fecais - Chromocult[®]. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C para o crescimento bacteriano.

3.9. Avaliação bacteriológica das águas consumidas nas casas ao redor do Lago Puruzinho/Humaitá – no estado do Amazonas

Foram recolhidas amostras de água do poço artesiano recém-perfurado na comunidade. As amostras foram tratadas seguindo o método SODIS com e sem AM. Para realizar esta técnica, as amostras foram colocadas em garrafas PET 2L incolor e expostas ao Sol por 3 horas. A cada hora, foi aplicada a técnica de membrana filtrante em amostras de 50 mL de água de cada garrafa

exposta ao sol, conforme tratamentos, para monitorar a inativação bacteriana. Temperatura e irradiação UV-A também foram monitorados nos específicos tempos.

3.10 Análise estatística

Os bancos de dados e as análises estatísticas foram realizados nos programas Microsoft Excel 2010 e GraphPadPrism 5.

Previamente à aplicação dos testes estatísticos observamos a distribuição dos parâmetros analisados em relação à curva de Gauss pelo Teste de Kolmogorov-Smirnov.

Para destacarmos o efeito do AM no tratamento SODIS, foi aplicado o Teste t para amostras não pareadas quando o parâmetro estimado apresentou distribuição normal nos dois grupos comparados. Quando pelo menos um dos grupos comparados não apresentou distribuição normal foi aplicado o Teste de Mann-Whitney.

Em relação à interpretação dos testes de hipótese aplicados consideramos resultados estatisticamente significativos quando o valor de p foi $\leq 0,05$

- *Os resultados mostrados a seguir são médias obtidas a partir de, no mínimo, três experimentos considerados válidos, realizados em duplicata, o que gera um $n \geq 6$.*

4 – RESULTADOS

4.1 Transparência de diferentes garrafas PET à radiação solar e artificial

Foram realizados cortes em forma de tiras de 5 garrafas PET dos seguintes tipos: água mineral marca Shincariol® (0,5 L), refrigerante marca Pepsi® (0,6 L), água com gás Minalba® (2,0 L), refrigerante marca Coca-Cola® (2,0 L), refrigerante marca Pepsi® (1,5 L), com as quais foram feitas medidas de transparência tanto em campo (radiação solar) como em laboratório (LSS). Para as medidas realizadas em campo, a transparência variou de 76,67% a 87,7% para UV-A e de 23,1% a 29,03% para UV-B. Já para as medidas feitas no LSS, a transparência variou de 64,8% a 78,26% para UV-A e de 3,91% a 7,36% para UV-B. Na figura 14 estão representados os resultados obtidos.

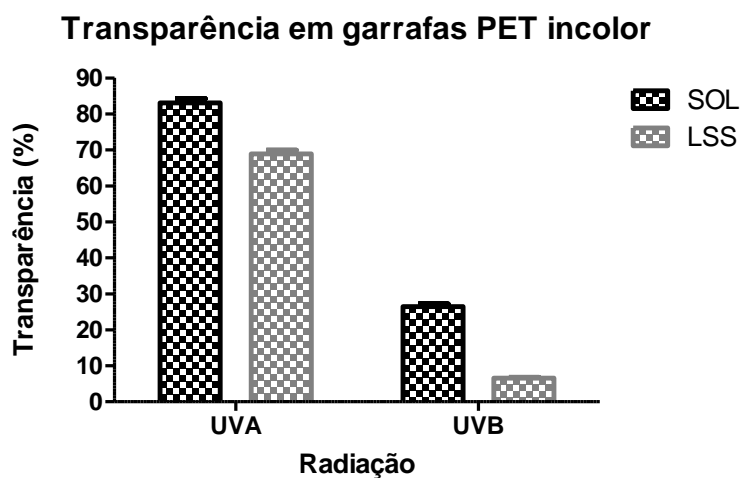


Figura 14 - Medidas das transparências médias das diferentes garrafas PET às radiações UV-A e UV-B.

De acordo com os dados obtidos, as diferentes marcas de garrafas PET utilizadas são similarmente capazes de barrar parte das radiações emitidas tanto pela lâmpada artificial como pela luz solar. Além disso, estas garrafas são mais transparentes às radiações UV-A e UV-B solares do que às artificiais (LSS 950 W).

4.2 Espectro de transmissão da luz através da garrafa PET

A transparência de diferentes tipos de garrafas foi avaliada, através de espectrofotometria (Hitachi U-3000) e constatamos que todas absorvem radiação abaixo de 340 nm, ou seja, as radiações UV-A acima de 340 nm e visíveis não são absorvidas e, portanto, atravessam o material de todas as garrafas testadas, como podemos observar na Figura 15, onde é mostrado um exemplo do espectro de absorção de uma garrafa PET incolor.

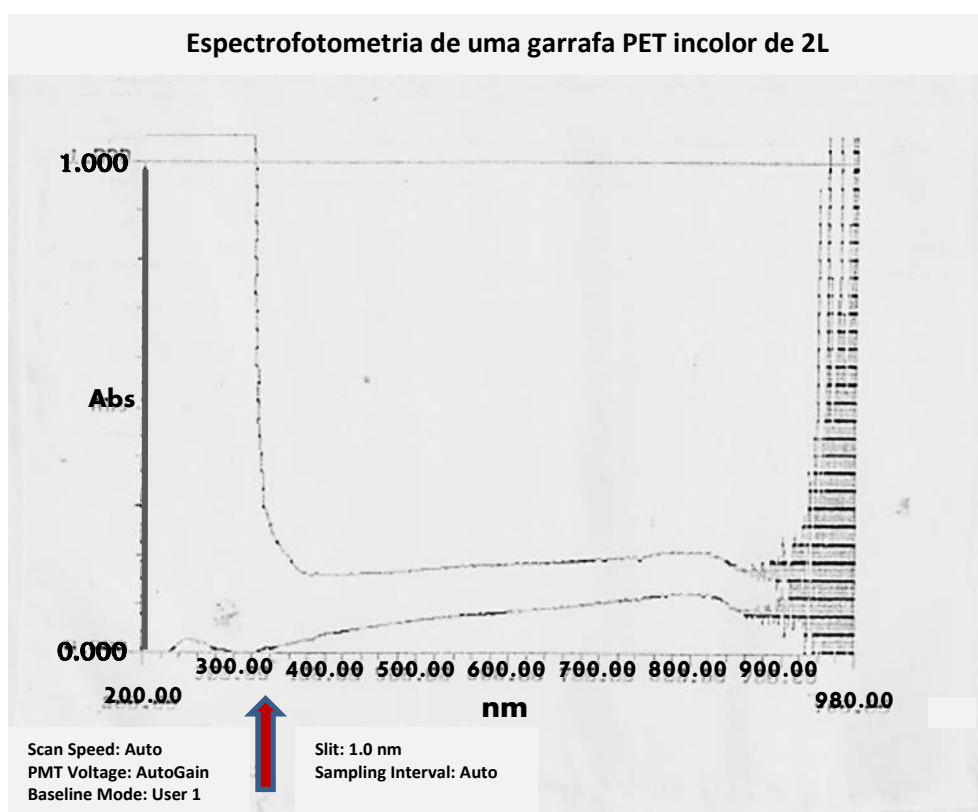


Figura 15 – Espectrofotometria UV-visível de uma garrafa PET mostrando a absorção de UV abaixo de 340 nm (indicado pela seta).

4.3 Parâmetros físicos da água submetida ao procedimento SODIS

A coleta de dados foi feita em intervalos de meia hora, registrando-se ao longo de 9 horas e meia de exposição. Esses dados foram plotados em dois gráficos que relacionam as temperaturas (Figura 16) e as doses das radiações UV-A e UV-B (Figura 17) com a fotodecomposição do AM.

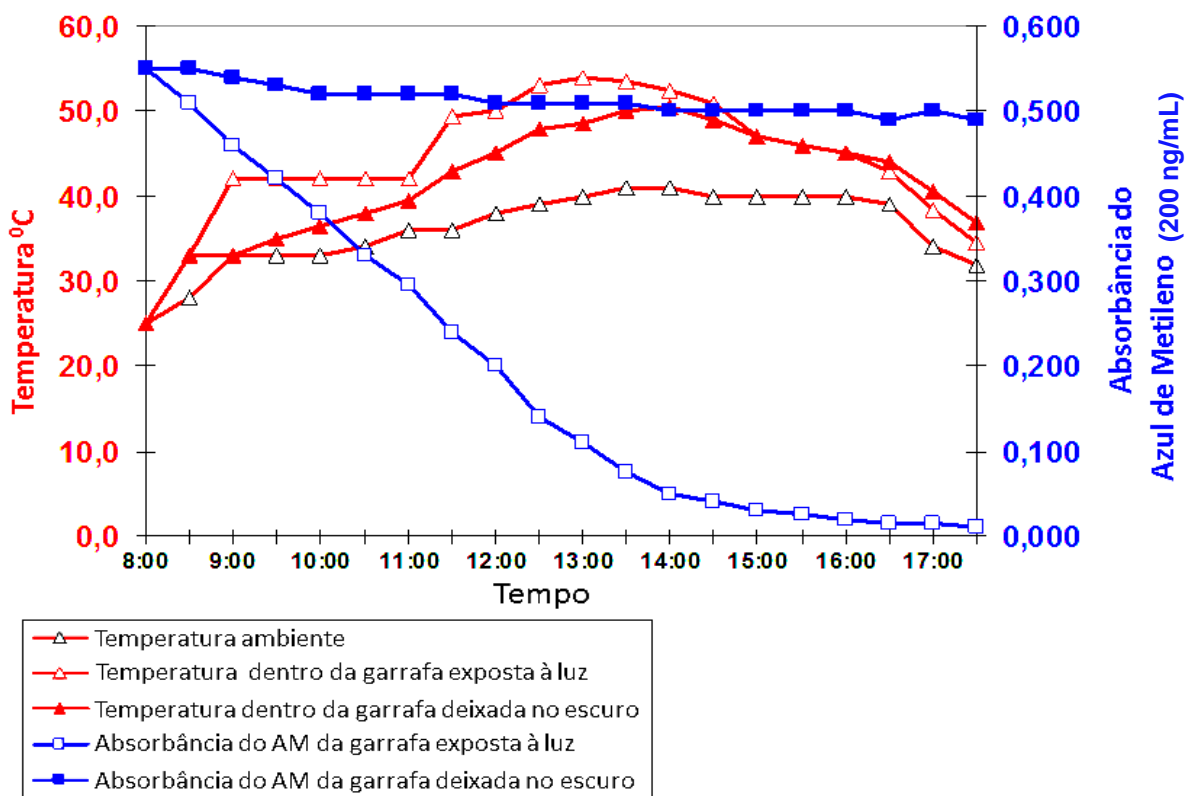


Figura 16 - Variação de temperatura (linhas em vermelho) e da fotodecomposição do AM (linhas em azul) ao longo de 9 horas e meia de exposição solar ao nível do mar, no verão, dia 5 de março de 2008, Rio de Janeiro-RJ.

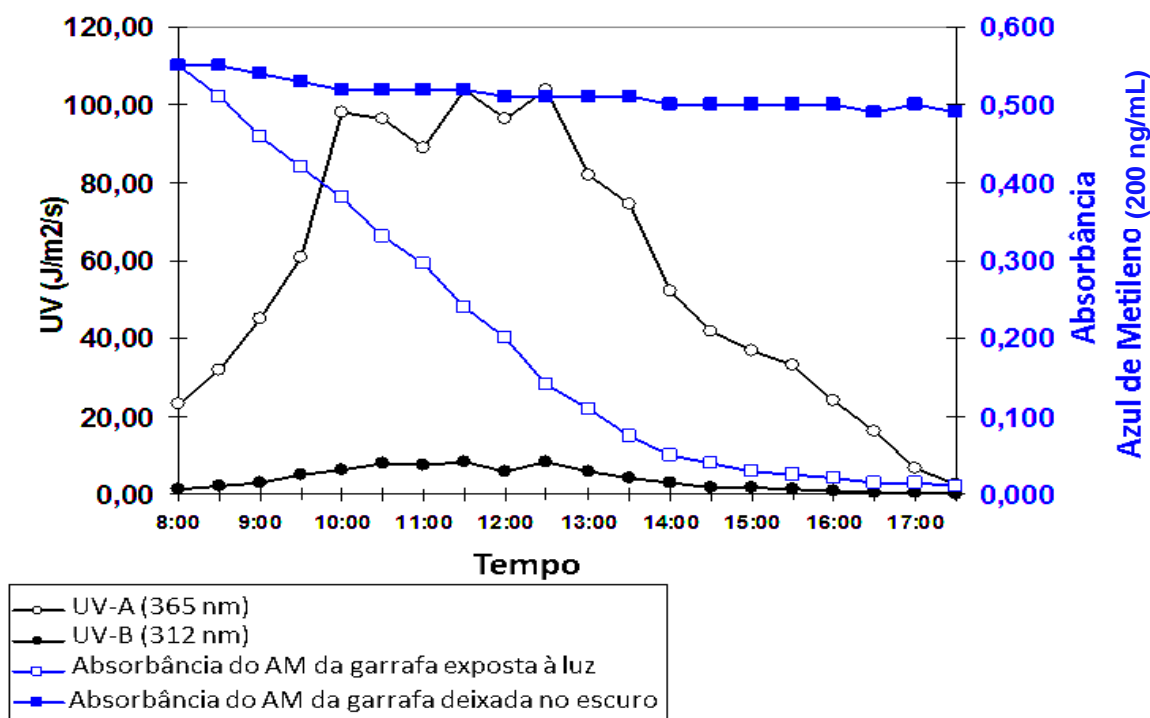


Figura 17 - Variação do fluxo de radiação solar UV-A e UV-B (linhas em preto) e da fotodecomposição do AM (linhas em azul) ao longo de 9 horas de exposição solar ao nível do mar, no verão, dia 5 de março de 2008, Rio de Janeiro-RJ.

4.4 Perda de cor do azul de metileno durante o processo

O desaparecimento da cor azul, ou seja, a transformação do AM na sua forma leuco, ocorre porque o AM sofre reações de redução após excitação eletrônica quando iluminado no comprimento de 660 nm, gerando um radical semirreduzido. Este fato, já descrito na literatura, foi observado por espectrofotometria, quando amostras com concentrações de 2 $\mu\text{g/mL}$ e 0,2 $\mu\text{g/mL}$ de AM em água foram expostas à radiação solar, conforme apresentado na Figura 18.

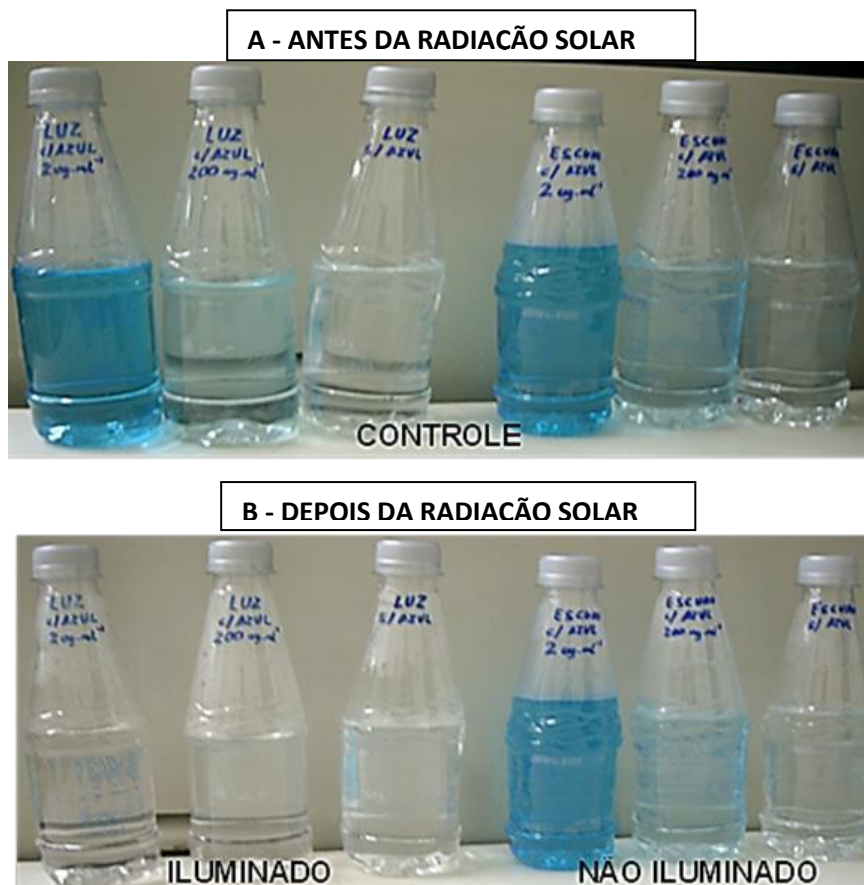


Figura 18 – Fotos das garrafas PET no início (A) e no final (B) do experimento para verificar a perda da cor azul em diferentes concentrações de AM. A) Garrafas PET com concentrações de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e sem AM no tempo zero de exposição à luz solar e no escuro. B) Após três horas de exposição, pode ser observada a fotodecomposição do AM nas garrafas que foram iluminadas. Nas garrafas que ficaram no escuro, a cor azul permanece.

4.5 Inativação bacteriana em amostras de água estéril, com diferentes concentrações de AM

Foram realizados experimentos com diferentes concentrações de AM - 50, 100 e 200 ng/mL , e observamos que usando o fotossensibilizador, as concentrações de 100 ng/mL e 200 ng/mL foram capazes inativar a *E.coli* em apenas 30 minutos e, em 50 ng/mL , a inativação ocorreu em 60 minutos, para

99,9% de inativação (Figura 19). Todas as concentrações testadas foram muito mais eficientes, em termos de descontaminação, do que o tratamento SODIS clássico, realizado durante 3 horas. Escolhemos a concentração mínima (50 ng/mL) necessária do fotossensibilizador, capaz de agilizar o processo de desinfecção da água pela luz solar em 60 min, levando em consideração que o aspecto azulado da água influencia o consumo da mesma pelo indivíduo.

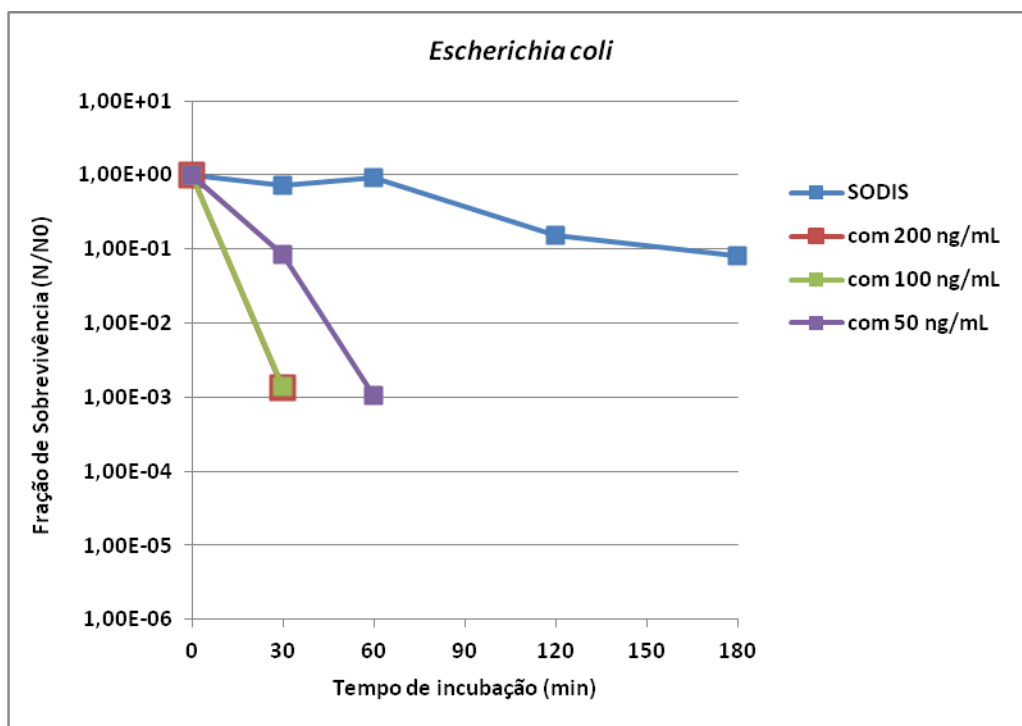


Figura 19 - Sobrevivência da bactéria *E. coli* K12A15 (10^6 céls/mL) variando as concentrações do AM no tratamento SODIS.

O AM é um fármaco seguro quando utilizado em doses terapêuticas de até 2 mg/kg sendo 75% excretado pela urina (GINIMUGUE & JYOTHI, 2010). Não existem dados suficientes na literatura para avaliar com precisão a dose mínima tóxica ou letal de azul de metileno. As doses superiores a 2 mg/kg podem provocar sinais e sintomas de toxicidade. Em adultos as doses orais de

300 mg* por dia têm sido usadas no tratamento de metemoglobinemia, em conjunto com o ácido ascórbico (<http://toxnet.nlm.nih.gov>).

A ingestão diária aceitável (TDI) é uma estimativa da quantidade de uma substância em alimentos e em água, medido em mg ou µg /kg de peso corporal, que pode ser consumida durante todos os dias, com segurança, por toda a vida. O valor de referência (GV) para qualidade da água é, então, derivado da TDI expresso na equação apresentada a seguir, onde:

GV= Valor de referência (mg/kg/dia),

BW= Peso corporal (kg),

P= Fração de TDI em outros alimentos (0,8)

C= Consumo diário de água (L)

$$GV = \frac{TDI \times BW \times P}{C} \longrightarrow GV = \frac{300^* \times 60 \times 0,8}{2} \quad GV = 7.200 \text{ mg/kg/dia}$$

Supondo que uma pessoa beba 2 litros de água tratada com SODIS por dia, com a concentração de 50 ng/mL de AM adicionada na água, ela vai ingerir diariamente 2,4 mg/kg/dia de AM. Desta forma, a concentração utilizada no método SODIS+AM é 3.000 vezes menor do que a utilizada nos tratamentos de metemoglobinemia para uma pessoa de aproximadamente 60 kg.

A fim de investigar a toxicologia do AM na inativação bacteriana com as três concentrações testadas, as experiências foram realizadas no escuro. Nenhuma das concentrações testadas interferiu na sobrevivência bacteriana conforme mostrado na Figura 20.

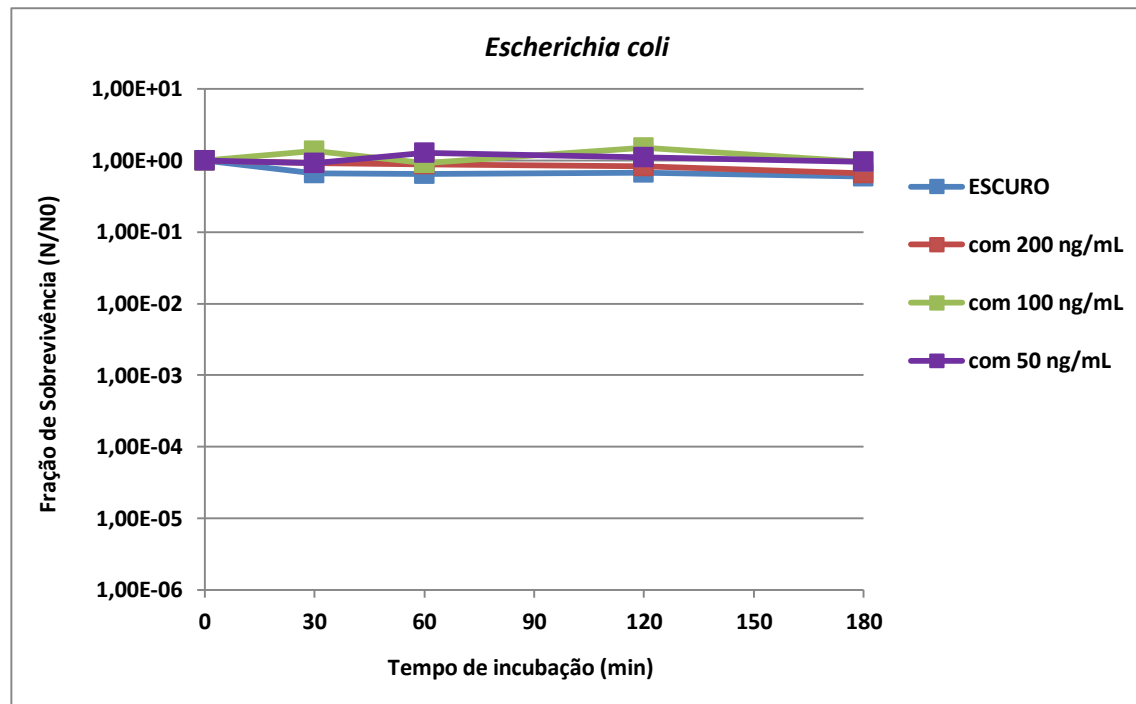


Figura 20 - Sobrevivência da bactéria *E. coli* K12A15 variando as concentrações do AM no ESCURO.

4.6 Inativação microbiológica em amostras de água estéril com e sem adição do AM (50 ng/mL) expostas à LSS

Para simular a radiação UV solar existente no Rio de Janeiro, no verão, onde o fluxo de UV-A ultrapassa $120 \text{ J/m}^2/\text{s}$, e em cerca de $10 \text{ J/m}^2/\text{s}$ para UV-B, utilizamos o LSS com filtro AMO, que remove o excesso de raios infravermelhos, e filtro 87066 que permite a passagem de 97,33% de raios UV-A, 2,77% de raios UV-B e 0,00% de raios UV-C. A potência do aparelho foi ajustada para 950 W/m^2 e, com a utilização dos filtros, a taxa de dose para UV-A ficou em torno de $171 \text{ J/m}^2/\text{s}$ e, para UV-B, em $1,3 \text{ J/m}^2/\text{s}$.

Esses experimentos foram realizados com quatro espécies bacterianas: duas Gram negativas (*E. coli* e *S. typhimurium*) e duas Gram positivas (*S.*

epidermidis e *D. radiodurans*). Eles consistiram em contaminar a água estéril de forma controlada com aproximadamente 1×10^6 bactérias por mL e, em seguida, adicionamos ou não AM (50 ng/mL). As amostras foram expostas à LSS por diferentes tempos e as sobrevivências das bactérias foram analisadas. Considerando a inativação biológica em torno de 90%, constatamos que para os experimentos com LSS, nas bactérias Gram negativas analisadas, a presença do AM promoveu grande sensibilidade, com inativação em 60 min de tratamento. Sendo assim, o tempo de exposição foi reduzido em duas vezes (120 min para 60 min) para *E. coli*, conforme mostrado na figura 21.

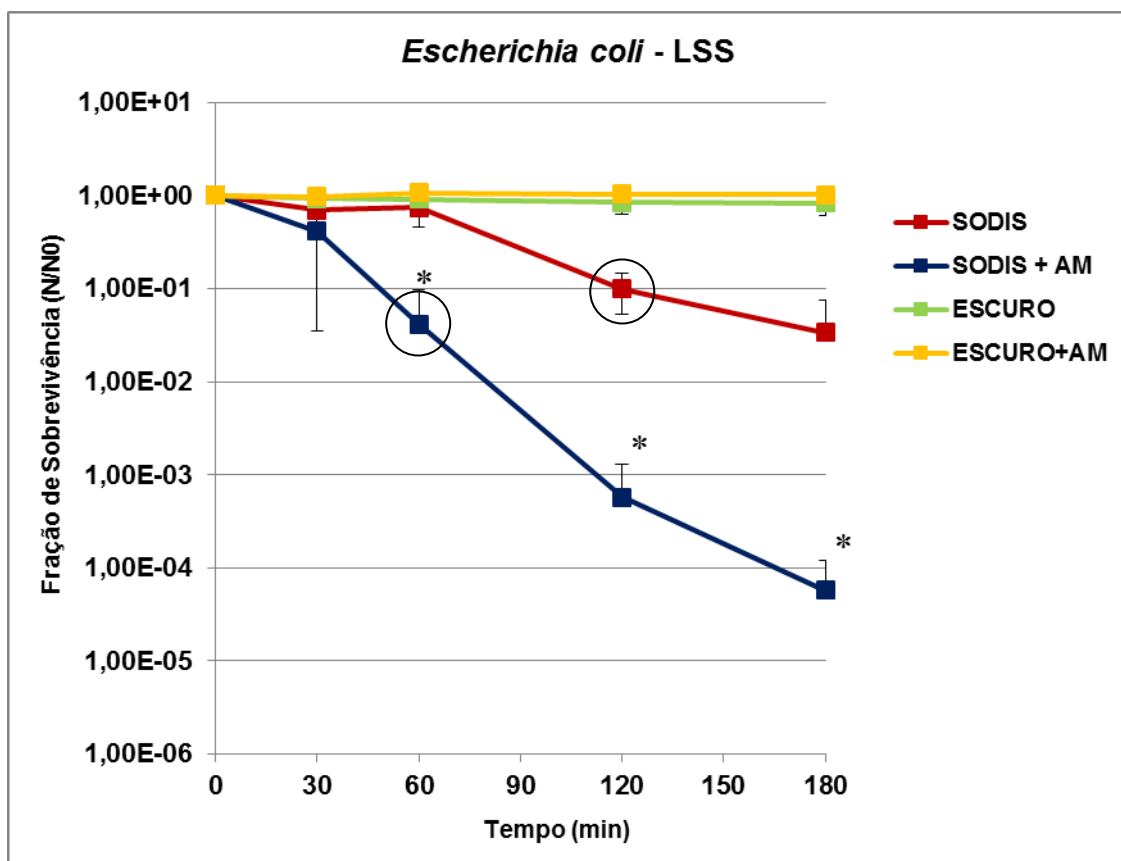


Figura 21 - Inativação da bactéria *E. coli* ao tratamento SODIS com ou sem AM, irradiados ou não na LSS, em função do tempo. O tratamento simultâneo mostrou-se significativo a partir de 60 minutos, tendo como referência $p \leq 0,05$.

Para a bactéria *S. typhimurium* a redução na sobrevivência celular foi de três vezes (180 min para 60 min) (Figura 22). Em algumas espécies de *Salmonella* a inativação ocorreu somente no tratamento simultâneo SODIS - AM, não sendo verificada com SODIS isoladamente antes de 180 min.

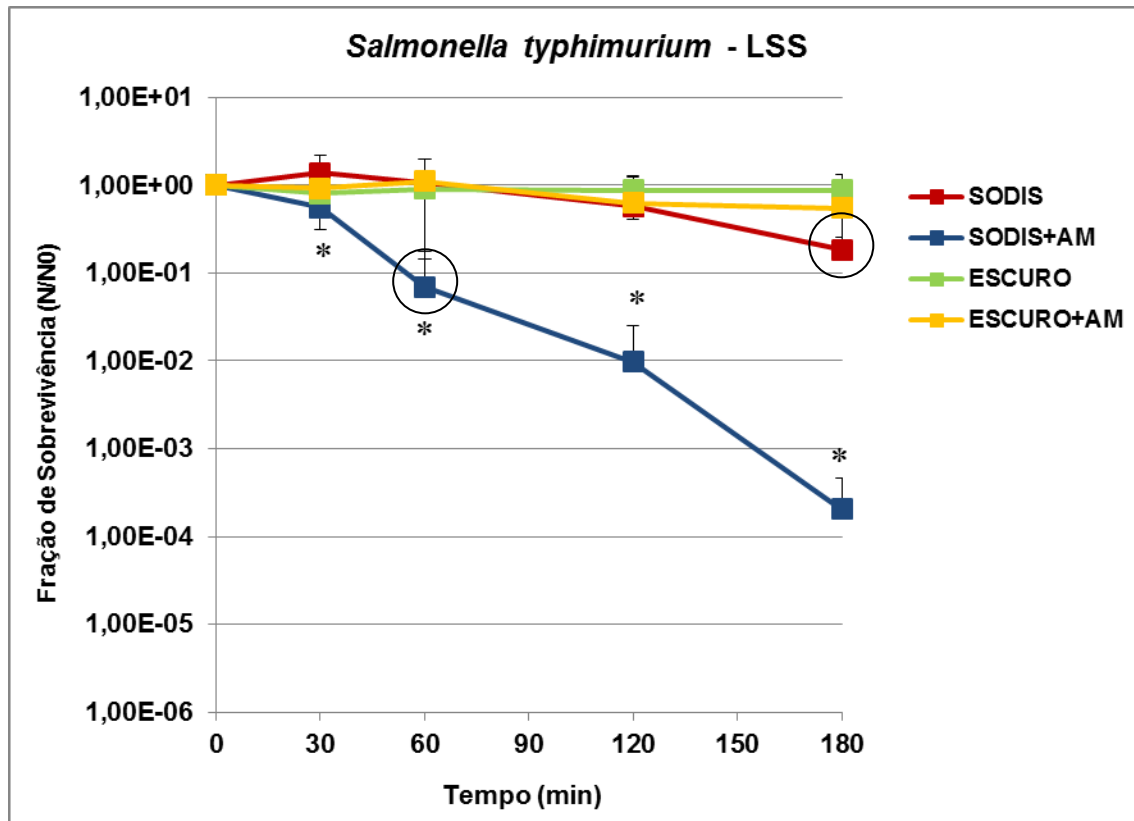


Figura 22 – Inativação da bactéria *S. typhimurium* ao tratamento SODIS com ou sem AM, irradiadas ou não com LSS, em função do tempo. O tratamento simultâneo mostrou-se significativo a partir de 30 minutos, tendo como referência $p \leq 0,05$.

Quando as culturas bacterianas foram iluminadas na presença de AM, observou-se um efeito sinérgico letal. Portanto, a presença de AM foi capaz de reduzir o tempo de inativação a 1/3 do necessário para a inativação bacteriana produzida pelo SODIS sozinho.

As bactérias Gram positivas analisadas foram extremamente sensíveis ao tratamento simultâneo (LSS + AM), com 90% de inativação em apenas 10 min. Sendo assim a redução do tempo de exposição foi de aproximadamente três vezes (30 para 10 min) para *S. epidermidis* (Figura 23).

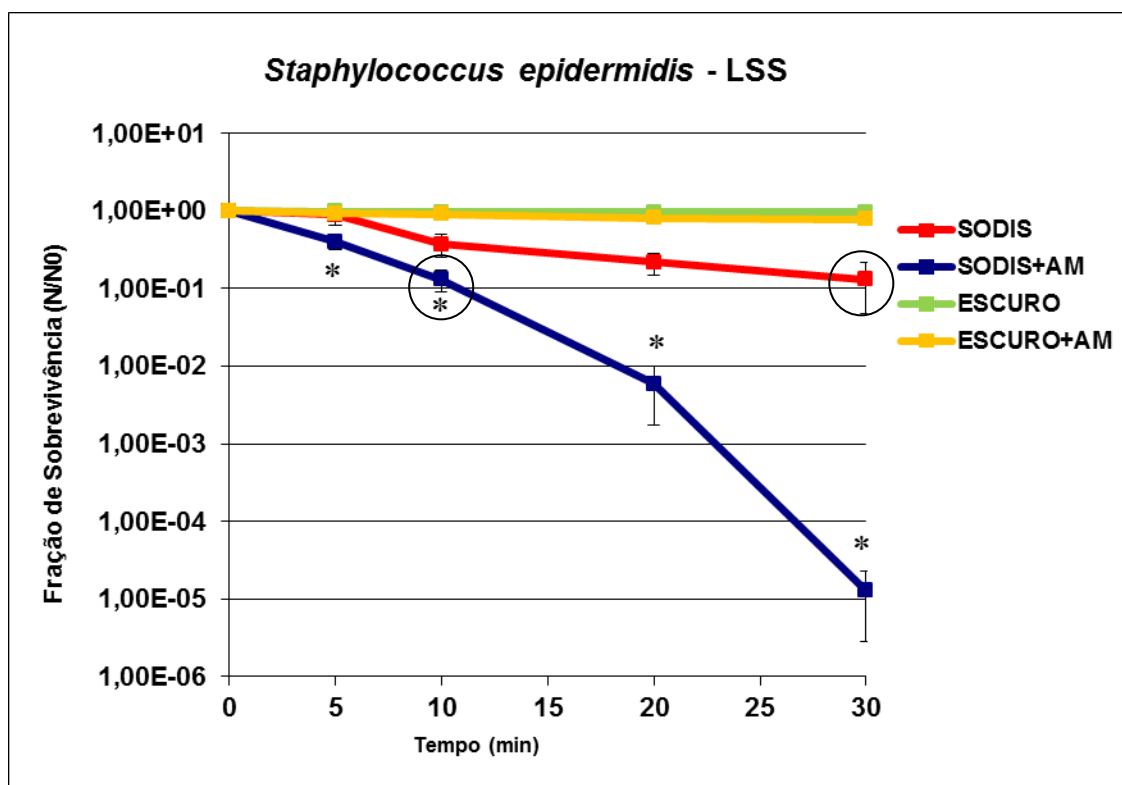


Figura 23 - Inativação da bactéria *S. epidermidis* ao tratamento SODIS com ou sem AM, irradiadas ou não com LSS, em função do tempo. O tratamento simultâneo mostrou-se significativo a partir de 5 minutos, tendo como referência $p \leq 0,05$.

A *D. radiodurans* é uma bactéria bastante conhecida por sua capacidade de reparar danos no DNA de forma eficiente e precisa. É extremamente resistente à radiação ionizante, à radiação UV (100 a 295 nm), à mitomicina C e, neste estudo, para o tratamento SODIS. Estes agentes induzem dano oxidativo, não só para o DNA, mas também para todas as macromoléculas

celulares através da produção de ERO, porém, em presença do AM, ela apresentou-se extremamente sensível, com 90% de inativação em apenas 15 min de tratamento (Figura 24).

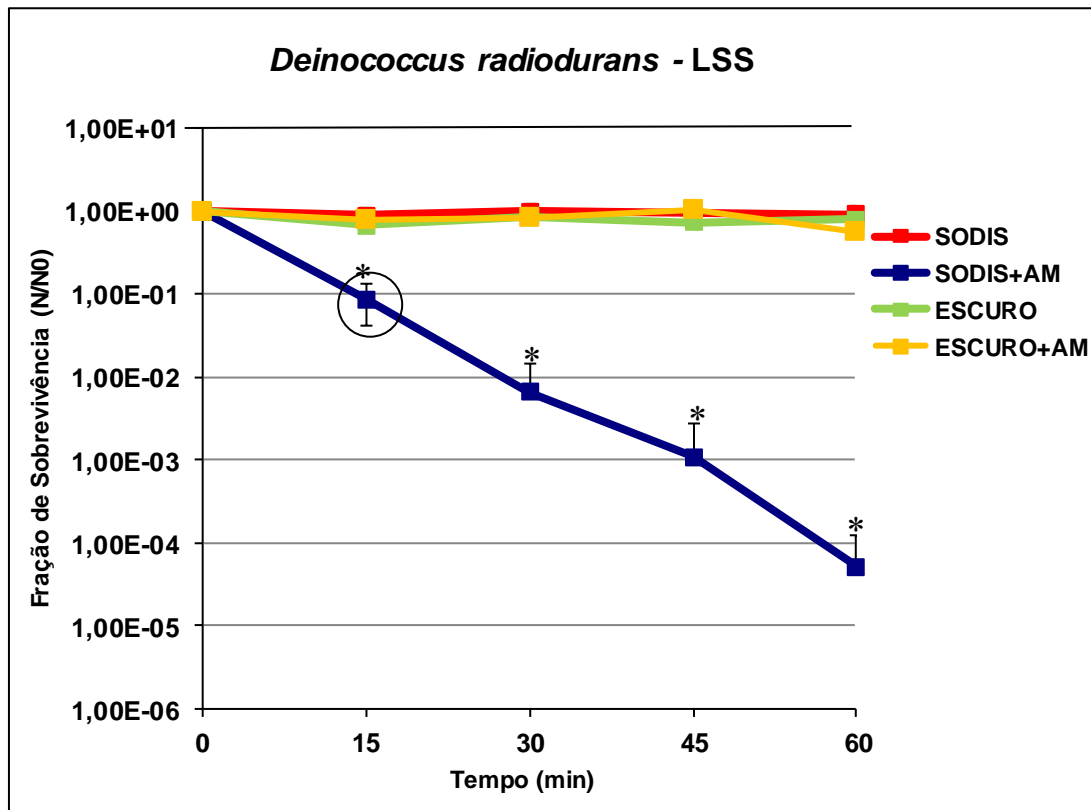


Figura 24 – Inativação da bactéria *D. radiodurans* ao tratamento SODIS com ou sem AM, irradiada ou não com LSS, em função do tempo. O tratamento simultâneo mostrou-se significativo a partir de 15 minutos, tendo como referência $p \leq 0,05$.

Durante o tratamento, as doses de irradiação emitida pelo simulador regulado com potência de 950 W/m^2 contendo os filtros AMO e 87066, foram de $171 \text{ J/m}^2/\text{s}$ para UV-A e $1,3 \text{ J/m}^2/\text{s}$ para UV-B com temperatura média de $35,7^\circ\text{C}$, como citado anteriormente.

4.7 Inativação microbiológica em amostras de água estéril, contaminadas de forma controlada com o indicador bacteriológico de coliformes fecais (*E. coli* K12A15), expostas aos tratamentos SODIS e SODIS + AM e irradiadas na LSS e analisadas pela técnica da membrana filtrante

Duas garrafas PET de 300 mL contendo amostras de água estéril foram contaminadas com aproximadamente 10^3 células/mL, sendo, em uma delas, adicionada solução de AM (50 ng/mL). As garrafas foram expostas à LSS por até 2 horas, com alíquotas de 100 mL sendo retiradas de cada uma nos tempos 0, 1 e 2 horas, filtradas e inoculadas em placas com meio seletivo para coliformes. Após 24 horas de incubação foi possível observar que, onde foi utilizado o AM, a descontaminação ocorre mais significativamente do que no tratamento SODIS clássico. O resultado desta experiência está mostrado na Figura 25.

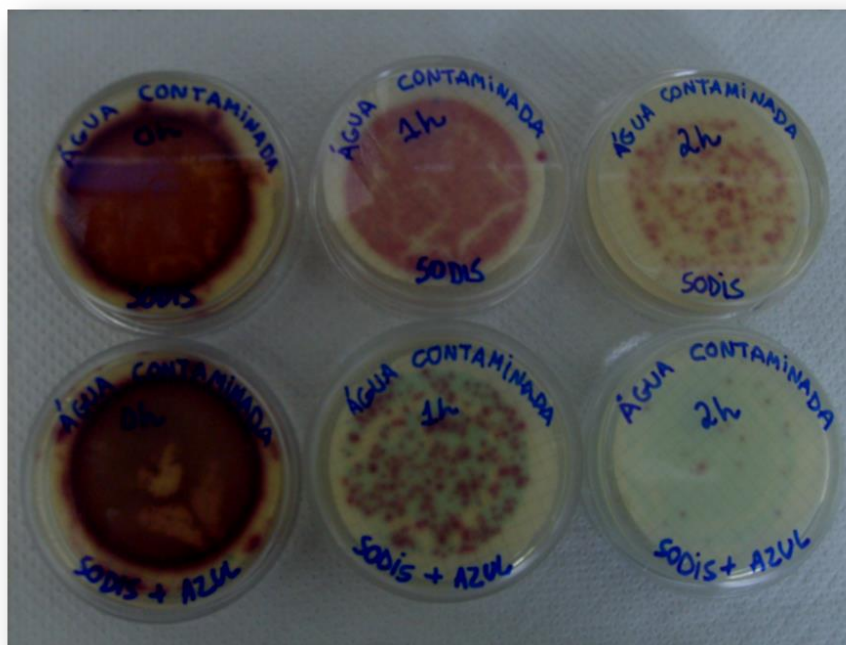


Figura 25 – Inativação bacteriana promovida pelo SODIS e SODIS+AM monitorada através da técnica da membrana filtrante. Inativação de 1000 coliformes fecais (*E. coli* K12A15) por mL após 2h de tratamento.

4.8 Inativação microbiológica em amostras de água mineral comercial com e sem adição do corante AM (50 ng/mL) expostas ao sol

Realizamos experimentos com as mesmas bactérias e vírus que foram testados na LSS, para que comparássemos os efeitos da radiação artificial com a radiação solar, além dos fatores naturais, tais como temperatura e outros.

Para realização dos experimentos, contaminamos água em garrafas PET incolor contendo 2 L de água mineral comercial com aproximadamente 10^6 células/mL, de forma controlada e em seguida adicionamos ou não AM (50 ng/mL). As amostras foram expostas à luz solar por diferentes tempos e as sobrevivências das bactérias e dos vírus determinadas, assim como as temperaturas dentro das garrafas e as doses de irradiação UV-A e UV-B.

Os efeitos dos tratamentos SODIS e SODIS + AM ao longo do ano podem ser comparados com resultados apresentados nos gráficos onde, considerando a inativação bacteriana em torno de 90%, constatamos que o método SODIS+AM reduziu o tempo de exposição para os micro-organismos testados. Para o grupo das bactérias Gram negativas, a redução do tempo de exposição ficou em torno de oito vezes (120 min para menos de 15 min) para *E. coli* (Figura 26).

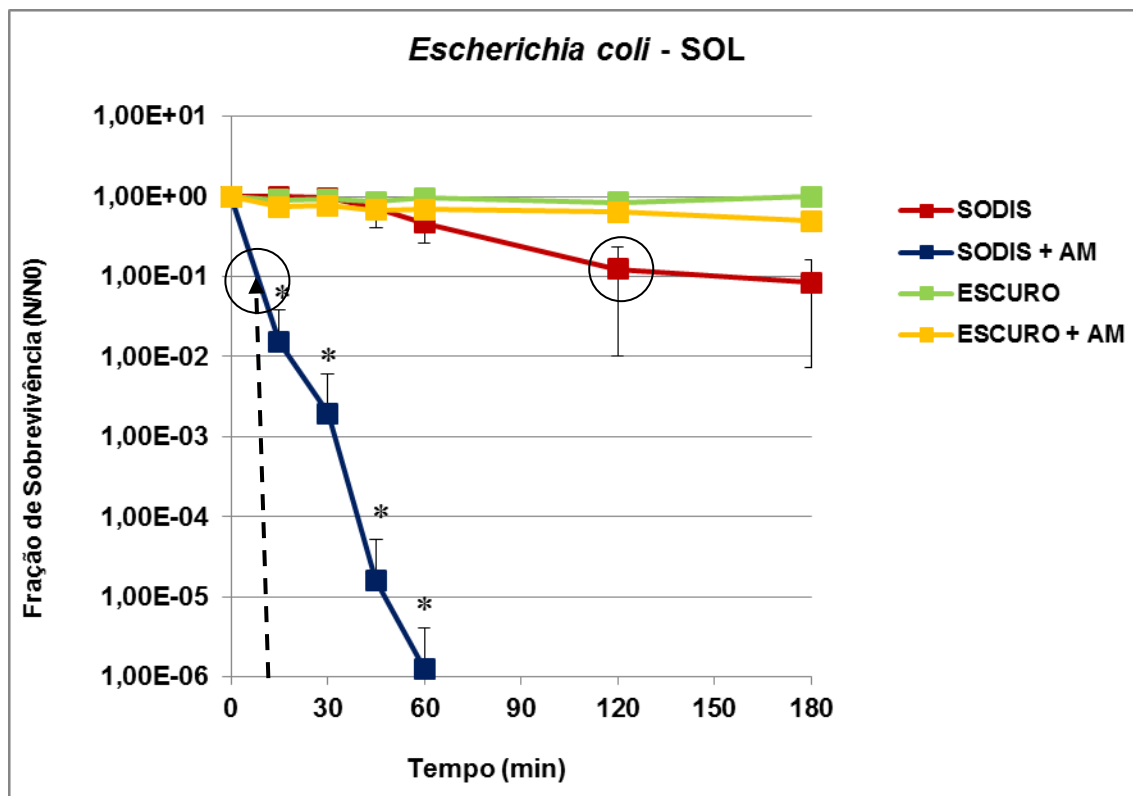


Figura 26 - Inativação da cepa selvagem de *E. coli* submetida ao tratamento SODIS com ou sem AM, irradiados ou não no Sol, em função do tempo. O tratamento simultâneo mostrou-se significativo a partir de 15 minutos, tendo como referência $p \leq 0,05$.

Para *S. typhimurium*, que se mostrou resistente ao SODIS durante todo tempo, quando adicionado o AM, houve redução de 90% na sobrevivência bacteriana (Figura 27) já a partir de 50 minutos.

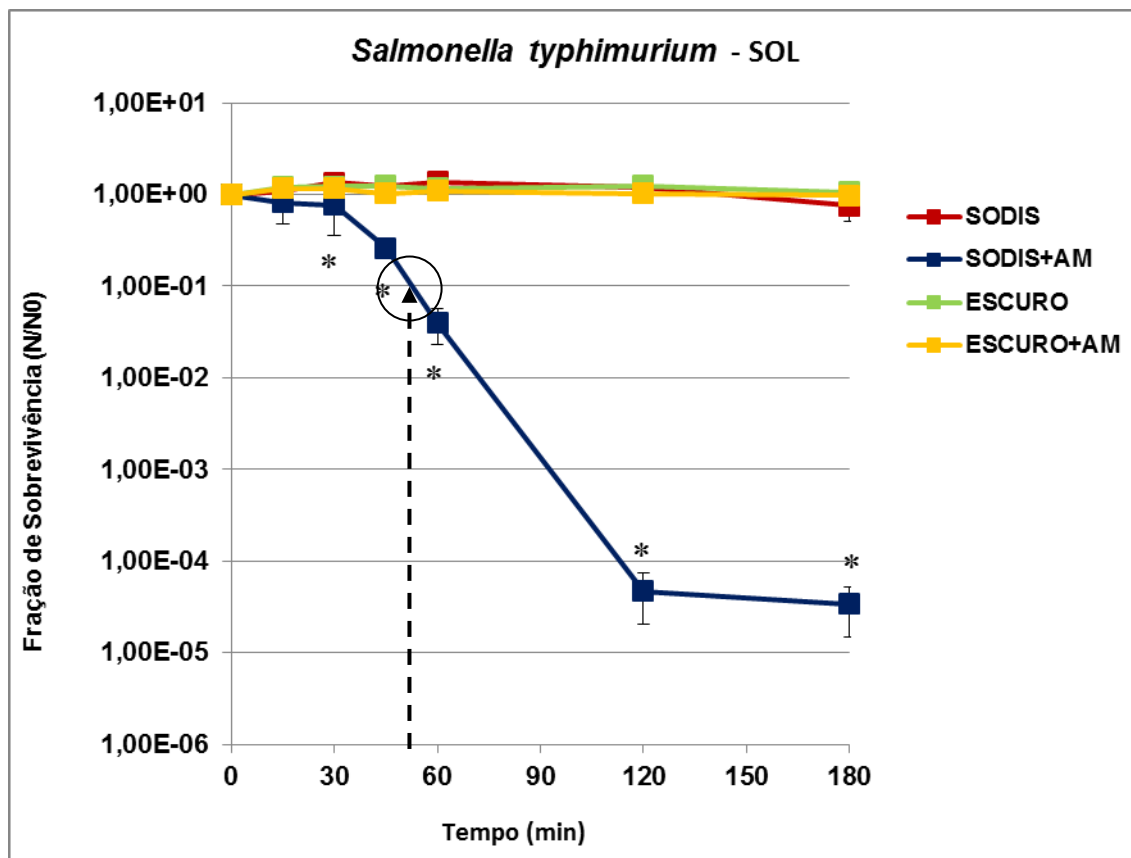


Figura 27 – Inativação da cepa selvagem de *S.typhimurium* submetida ao tratamento SODIS com ou sem AM, irradiada ou não no Sol, em função do tempo. O tratamento simultâneo mostrou-se significativo a partir de 30 minutos, tendo como referência $p \leq 0,05$.

Tais experiências foram realizadas nos meses de agosto e setembro (inverno/primavera) e, durante o tratamento, a média das taxas de dose de radiação solar ficou em torno de $54,2 \text{ J/m}^2/\text{s}$ para UV-A e $1,7 \text{ J/m}^2/\text{s}$ para UV-B, com temperatura média de $28,2^\circ\text{C}$.

Assim como na LSS, a *S.typhimurium* se apresentou mais resistente ao SODIS do que a *E.coli*, entretanto, observamos um efeito sinérgico quando as culturas foram iluminadas na presença do AM. Para o grupo das bactérias Gram-positivas o tempo de exposição foi reduzido em seis vezes (30 min para

5 min) para a bactéria *S. epidermidis*. Esses resultados são apresentados na Figura 28.

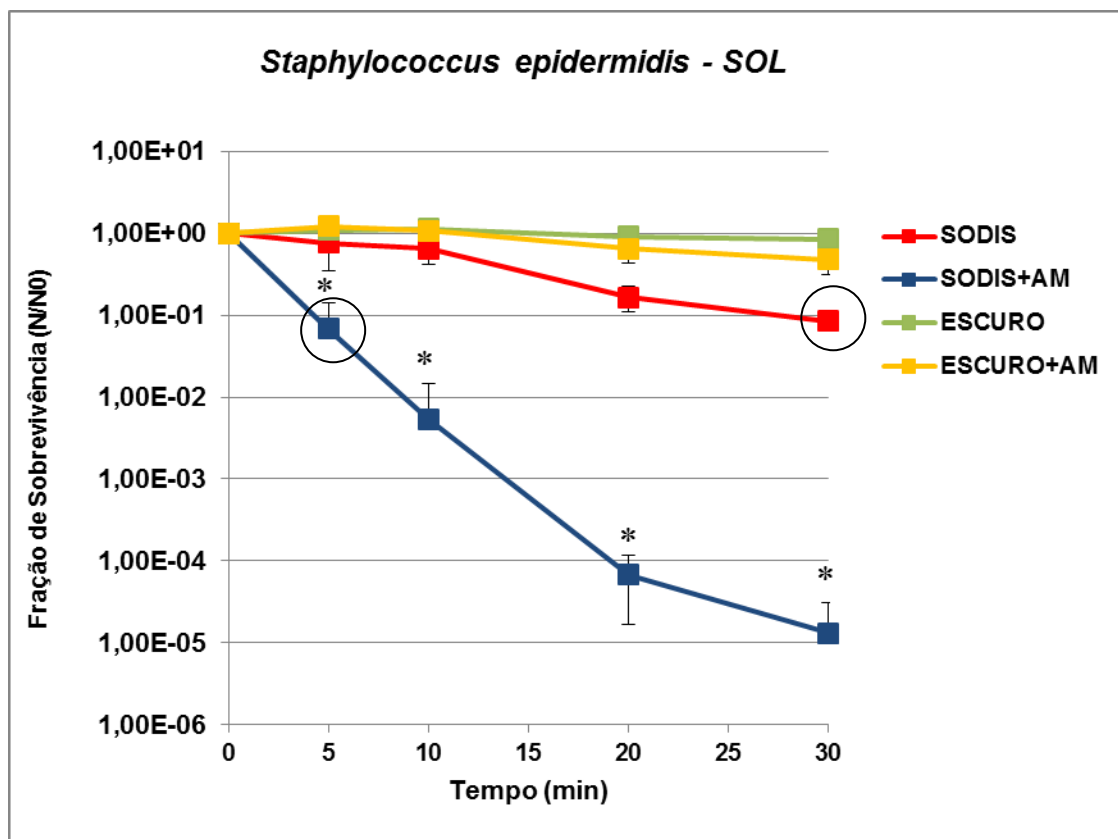


Figura 28 - Inativação média da cepa selvagem de *S. epidermidis* submetida ao tratamento SODIS com ou sem AM, irradiadas ou não no Sol, em função do tempo. O tratamento simultâneo mostrou-se significativo a partir de 5 minutos, tendo como referência $p \leq 0,05$.

Estas experiências foram realizadas nos meses de outubro a novembro (primavera/verão) e, durante os tratamentos, a média das taxas de dose de radiação solar ficou em torno de 102,6 J/m²/s para UV-A e 5,58 J/m²/s para UV-B, com temperatura média de 35,4°C.

Os melhores resultados para o tratamento SODIS + AM, como observados para a bactéria *S. epidermidis*, são atingidos quando, no ambiente

sem nuvens, típico no verão, as altas doses de radiação solar somaram-se a temperatura elevada.

Para a bactéria *D. radiodurans* não foi possível quantificar em vezes a redução de tempo do tratamento SODIS no período de 1 hora. Entretanto, o tratamento simultâneo mostrou resultados significativos, chegando à inativação de 90% da sua população em 15 minutos. Este resultado está apresentado na Figura 29.

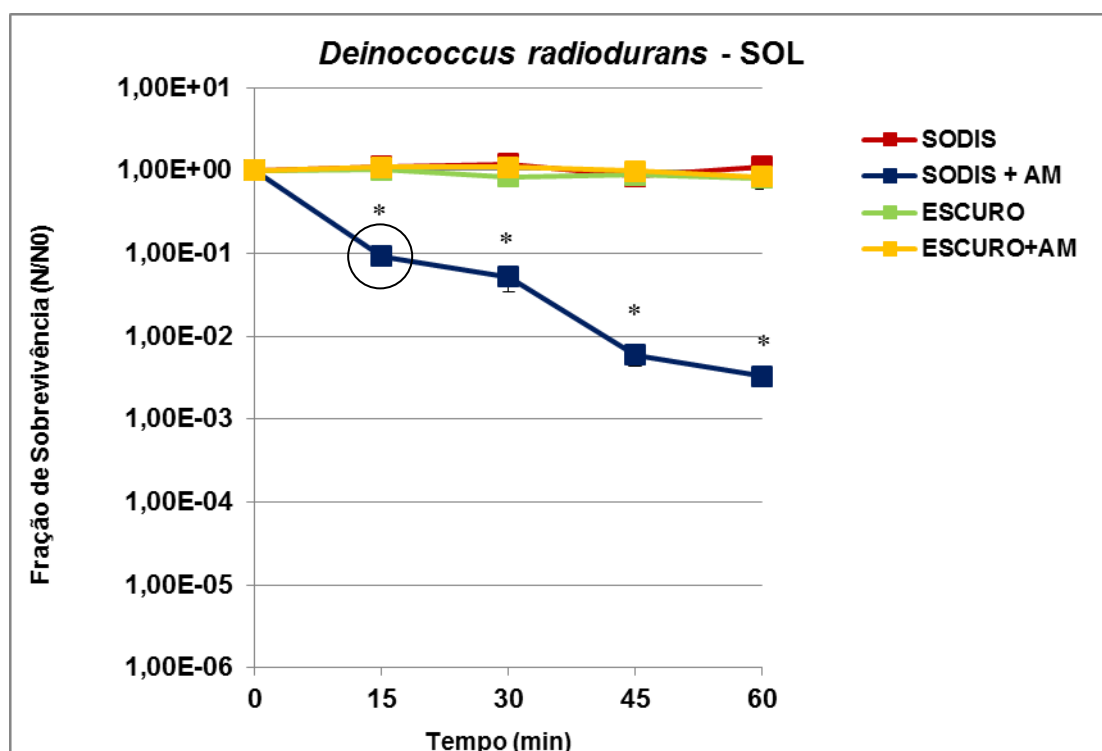


Figura 29 - Inativação média de *D. radiodurans* submetida ao tratamento SODIS com ou sem AM, irradiados ou não no Sol, em função do tempo. O tratamento simultâneo mostrou-se significativo a partir de 30 minutos, tendo como referência $p \leq 0,05$.

Estas experiências foram realizadas nos meses de novembro e dezembro (verão) e, durante os tratamentos, a média das taxas de dose de

radiação solar ficou em torno de 51 J/m²/s para UV-A e 1,6 J/m²/s para UV-B, com temperatura média de 31,7°C.

No alto verão, a incidência de radiação solar na linha do Equador é de aproximadamente 1120 W·m⁻². Assim, temos 1,12 kJ m⁻² de energia disponíveis em cada segundo. Nessas condições, as temperaturas podem ficar acima de 40°C (McGUIGAN *et al*, 2012).

Nos estudos com o bacteriófago λ , podemos observar que, na ausência de luz, a sobrevivência do vírus não é afetada, tanto na presença como na ausência do fotossensibilizador, sugerindo que o AM sozinho, até o tempo analisado, não foi letal para este vírus. Além disto, não houve nenhuma diferença de sobrevivência do mesmo quando diferentes mutantes bacterianos foram utilizados para plaqueamento do vírus (dados não mostrados). Em experimentos similares aos descritos para as bactérias, verificamos que a inativação do vírus ao tratamento SODIS, nas condições utilizadas, somente ocorre quando o AM é adicionado. Pudemos verificar que a inativação de 90% da população viral ocorre em apenas um minuto (Figuras 30 A e B).

Para as cepas de *E. coli* selvagem e para as deficientes no gene *uvrA*, *recA* ou *uvrA recA*, as experiências foram realizadas nos meses de maio/junho e agosto/setembro. Durante os tratamentos, a média das taxas de dose de radiação solar ficou em torno de 34,8 J/m²/s a 52,8 J/m²/s para UV-A e 0,38 J/m²/s a 0,96 J/m²/s para UV-B com temperatura média de 28,2°C a 31°C.

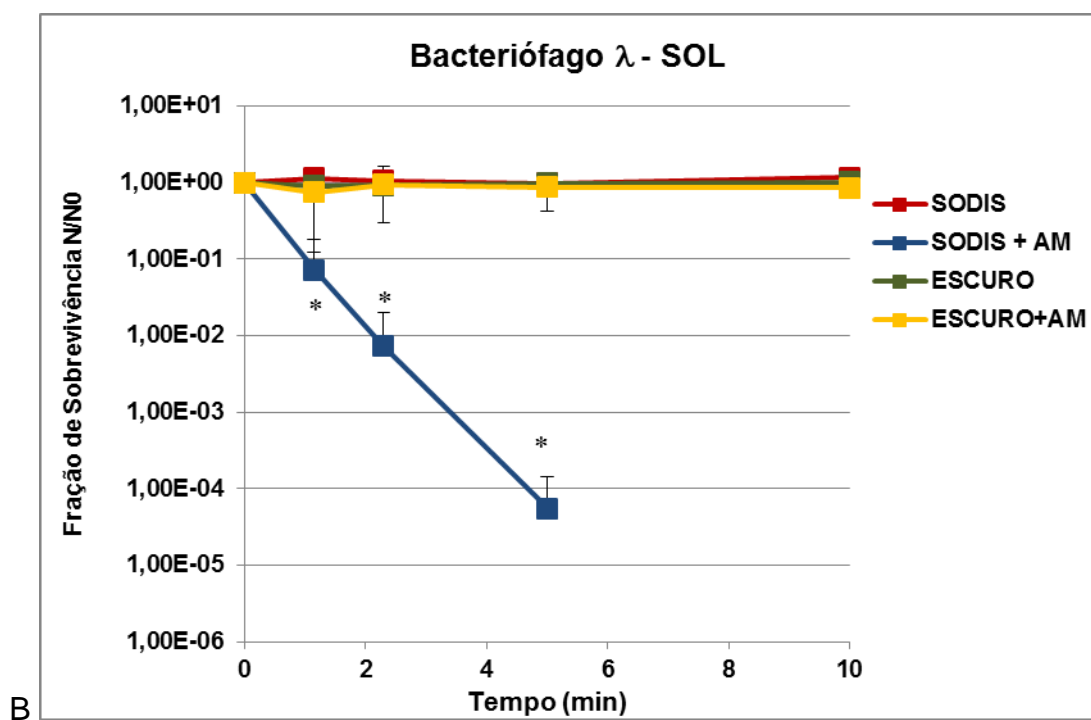
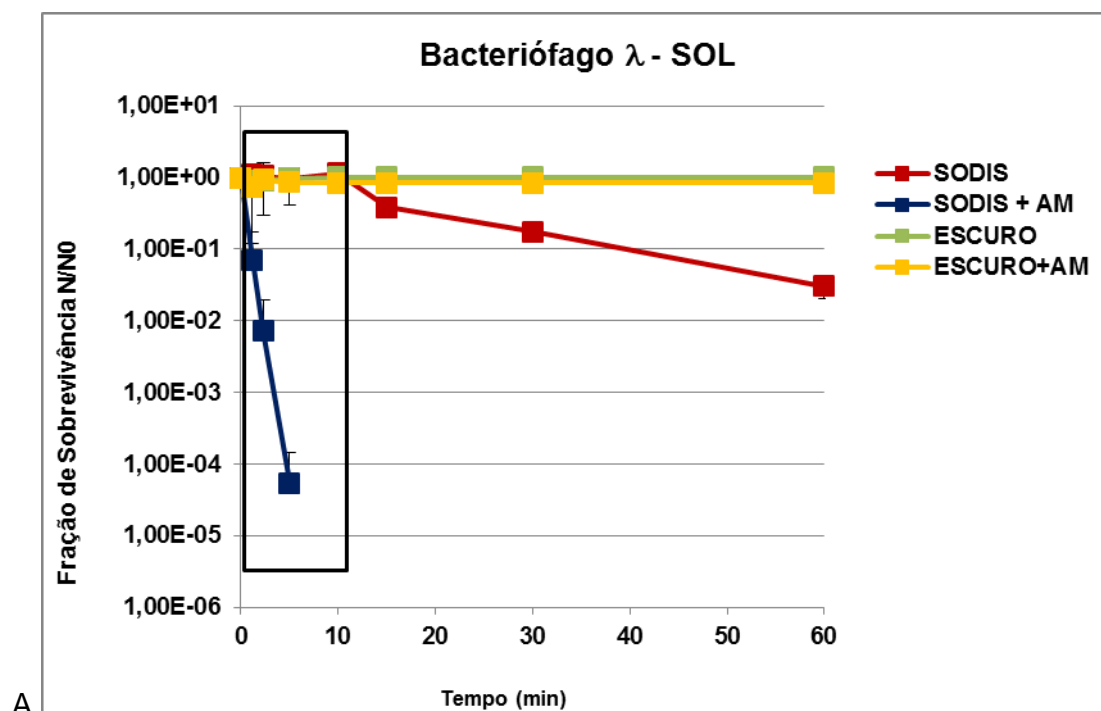


Figura 30 – A) Sobrevivência do bacteriófago λ quando inoculado na cepa de *E. coli* selvagem, submetido ao tratamento SODIS com ou sem AM, irradiados ou não no Sol, em função do tempo. B) O tratamento simultâneo mostrou-se significativo a partir de um minuto, tendo como referência $p \leq 0,05$.

4.9 Inativação microbiológica em amostras de água de um poço artesiano expostas aos tratamentos SODIS e SODIS + AM irradiadas na luz solar

- **Amostras de água de poço usadas pela população ribeirinha do Lago Puruzinho em Humaitá – Amazônia em 11 de outubro de 2014**

Breve histórico: A Bacia do Rio Madeira vem sendo estudada há mais de 25 anos com foco na toxicologia ambiental e humana do mercúrio (Hg) (PFEIFFER & LACERDA, 1988). A comunidade do Lago Puruzinho está localizada na cidade de Humaitá-Am, na margem esquerda do Rio Madeira (Fig 31). O clima é quente e úmido. As estações do ano são uma chuvosa “inverno” que vai de outubro a abril e outra de estiagem “verão” que vai de maio a setembro. No meio do ano, algumas vezes acontece o fenômeno da “friagem” que é uma queda da temperatura provocada pelo deslocamento da Massa de Ar Polar Atlântica. As fontes de subsistência são a própria floresta e os rios. O rio serve ainda como via de comunicação e escoamento de produtos coletados na floresta. O Lago é a única fonte de água para o consumo da comunidade, além de servir como escoamento sanitário.

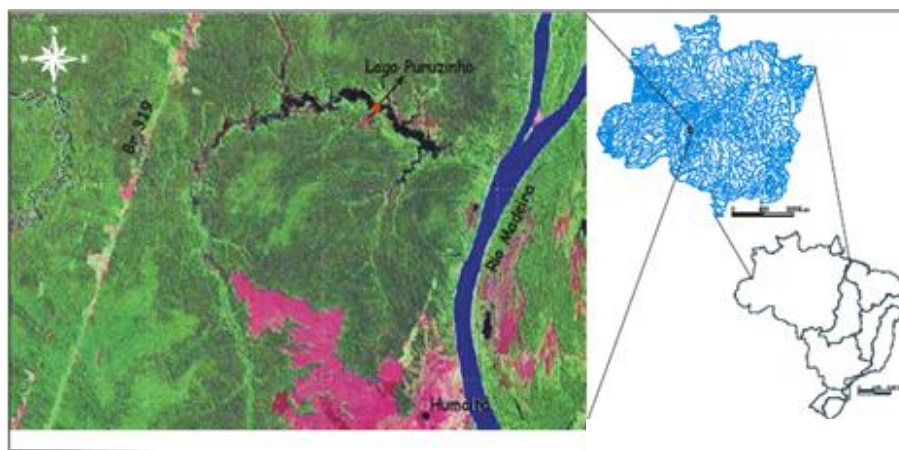


Figura 31 - Mapa elaborado através de imagens de satélite LANDSAT-TM 7 e a base Cartográfica da ANEEL (<http://www.aneel.gov.br>).

A água consumida pela Comunidade do Lago Puruzinho, em Humaitá, na região Amazônica, foi tratada com SODIS ou SODIS com AM.

As garrafas foram expostas ao sol entre 13h30min e 16h30min com temperaturas médias no interior das garrafas de 39,25°C (Figura 33) e radiação UV-A variando entre 53,5 – 7,5 J/m²/s(Figura 32).

Amostras de 50 mL foram filtradas a cada hora nos tempos 0, 60, 120 e 180 min do início do tratamento e os filtros depositados sobre placas contendo o meio de cultura *Chromocult*[®] para verificar a presença de coliformes fecais.

Foi possível verificar a morte de coliformes fecais presentes no poço artesiano quando a essa água, foi adicionado AM, conforme apresentado na Figura 34. O percentual de inativação de coliformes fecais, comparando-se os métodos SODIS e SODIS+AM, durante a experiência no Lago Puruzinho, está indicado na Tabela 4.

Tabela 4 - Inativação de coliformes fecais ao tratamento SODIS com ou sem AM na presença de luz solar, em função do tempo. Experiência realizada com água do poço artesiano no Lago Puruzinho.

Tempo (min)	Média do nº de colônias por placa após o tratamento SODIS	Média do nº de colônias por placa após o tratamento SODIS+AM
0	158	130
60	130	116
120	126	72
180	108	24
Percentual de inativação de coliformes fecais após 180 min	31,65%	81,53%

As doses de radiação solar (UV-A) e temperaturas observadas nessas experiências são apresentadas nas Figuras 32 e 33, respectivamente.

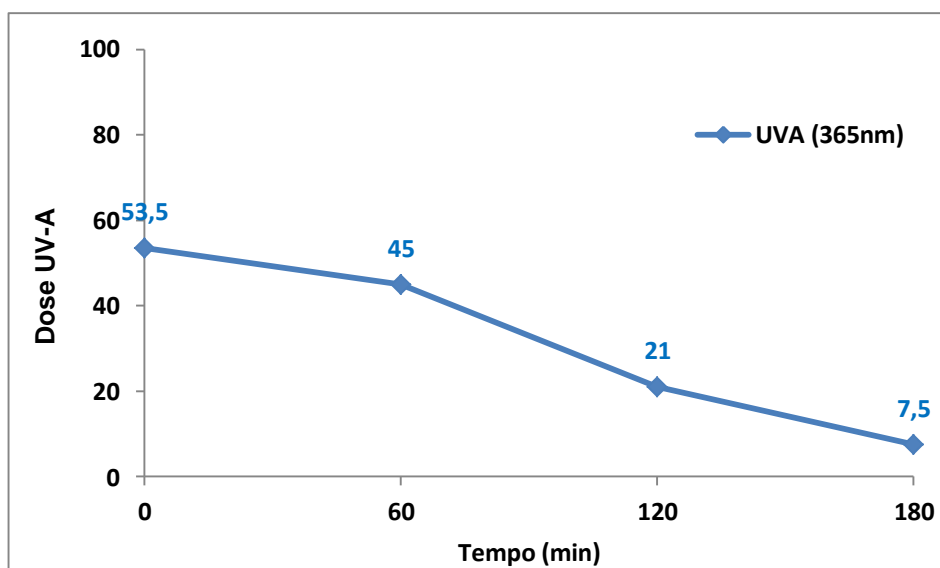


Figura 32 – Monitoramento das doses de radiação solar (UV-A) em 11 de outubro de 2014 entre 13h30min e 16h30min. Experiência realizada no Lago Puruzinho.

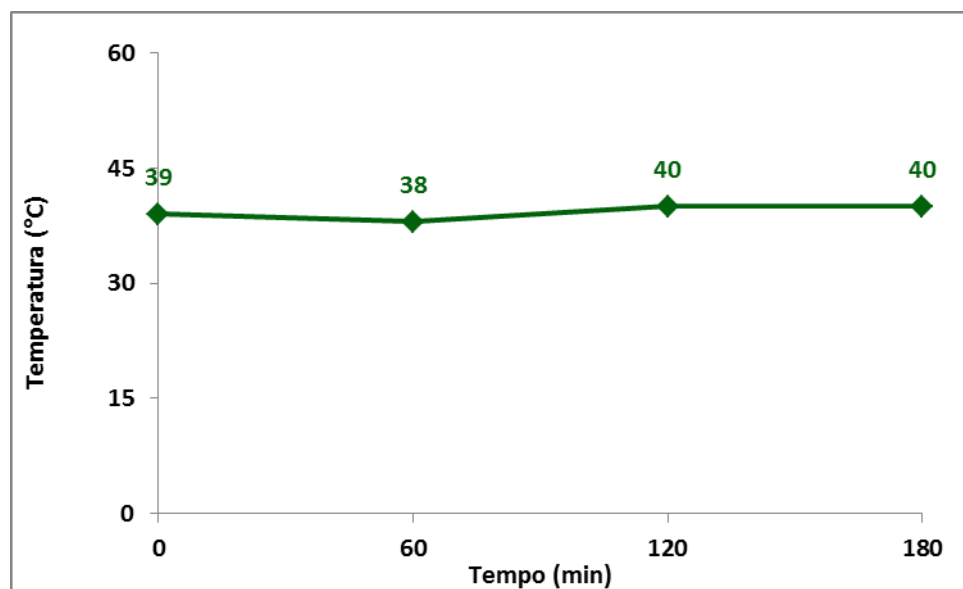


Figura 33 – Medidas das temperaturas médias da água dentro da garrafa PET, durante o período de exposição ao sol entre 13:30h – 16:30h. Experimentos realizados em triplicata.

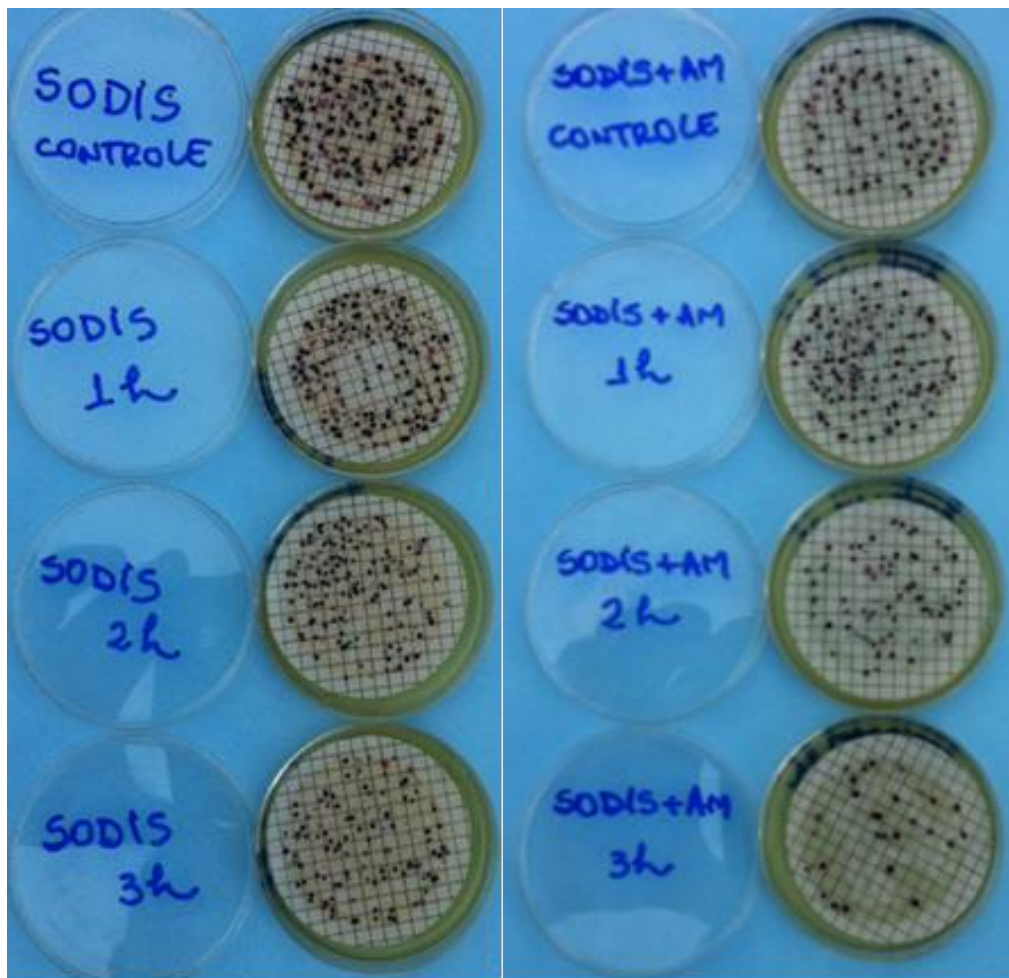


Figura 34 – Fotografia da aplicação da técnica de membrana filtrante em amostras de água do poço artesiano. Inativação de coliformes fecais encontrados no poço artesiano do Lago Puruzinho – Humaitá/AM, submetidos ao tratamento SODIS e SODIS+AM (50 ng/mL).

5 - DISCUSSÃO

A escassez de água pode tornar-se um grande obstáculo para a saúde pública e desenvolvimento. Atualmente, a UNICEF e a OMS estimam que 780 milhões de pessoas não tenham acesso ao abastecimento de água de boa qualidade e 2,4 bilhões de pessoas não tenham saneamento adequado. As consequências das doenças associadas a essas condições são preocupantes, principalmente as que causam diarreia. Segundo Mathers e colaboradores (2009), cerca de 90% das mortes por doenças diarreicas são atribuídos à falta de água potável, saneamento e higiene. Estas são responsáveis por cerca de 2,2 milhões de mortes a cada ano, nos países em desenvolvimento, além disso, afetam desproporcionalmente as crianças, com 1,5 milhões de mortes por ano.

Uma grande variedade de tecnologias vem sendo implementada, para melhorar as condições da água para uso doméstico, dentre estas a desinfecção solar da água (SODIS) (FISHER *et al.*, 2012).

As radiações infravermelhas, UV-A e UV-B, em conjunto, são responsáveis pelo processo de desinfecção da água. Os raios infravermelhos são responsáveis pela elevação da temperatura, causando desnaturações de estruturas celulares. Por sua vez, as radiações UV-A e UV-B causam lesões nos ácidos nucleicos e interagem com moléculas de oxigênio presentes na água, gerando ERO que danificam estruturas importantes ocasionando a morte celular, respectivamente (LEITÃO *et al.*, 2005). Devido a não adaptação de micro-organismos a estas condições ambientais hostis, ocorre a morte, inclusive de patógenos, levando a desinfecção solar da água.

Alguns autores relatam que, sob certas condições de campo, como em tempo nublado, por exemplo, bactérias e vírus ainda são encontrados, após a exposição à luz solar de um dia inteiro, sendo necessários de 10 a 48 horas para que ocorra a desinfecção adequada (FISHER *et al.*, 2008; NOBLE *et al.*, 2004; RIJAL & FUJIOKA, 2003; SINTON *et al.*, 2002).

Diretrizes baseadas em saúde pública, desenvolvidas pela OMS, recomendam que, para que a água possa ser utilizada domesticamente, e, portanto esteja potável, é necessário que haja redução de quatro a cinco ordens de grandeza para bactérias, vírus e cistos de protozoários (SOBSEY & BROWN, 2011). Tais orientações motivam a exploração das condições em que a inativação de microrganismos é alcançada sob a energia solar ideal, bem como os esforços para acelerar a metodologia SODIS sob condições adversas (FISHER *et al.*, 2012).

De acordo com Fisher e colaboradores (2012), aditivos simples e de baixo custo foram encontrados para aumentar as taxas de desinfecção solar e pesquisas anteriores forneceram alguns resultados sobre os mecanismos pelos quais esses aditivos aceleraram a inativação microbiana. O peróxido de hidrogênio, por exemplo, apresentou-se como um aditivo capaz de acelerar a fotoinativação de bactérias indicadoras, vírus e esporos (FISHER *et al.*, 2008; EISENSTARK *et al.*, 1986; SICHEL *et al.*, 2009).

Os fotossensibilizadores que têm sido estudados para erradicação de micro-organismos, pertencem a diferentes grupos de compostos, por exemplo, os xantenos halogenados (Rosa Bengala), fenotiazínicos tais como Azul de Toluidina e o AM, acridinas e conjugados de clorina (WAINWRIGHT, 2002).

Há mais de cem anos Raab (1900) publicou o primeiro artigo sobre efeitos fotodinâmicos de compostos químicos (eosina e alaranjado de acridina) contra micro-organismos. A aplicabilidade desta técnica foi demonstrada em bactérias, vírus e protozoários bem antes da Segunda Guerra Mundial, mas foram abandonadas devido à popularização das sulfonamidas e a penicilina (WAINWRIGHT, 2002).

Micro-organismos tais como bactérias, fungos e vírus também podem ser inativados por luz visível, depois do tratamento com um fotossensibilizador apropriado, em um processo denominado inativação fotodinâmica (GAD *et al.*, 2004).

Na presença de oxigênio, naturalmente encontrado nas células, o fotossensibilizador ativado pode reagir com moléculas na sua vizinhança por transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à produção de radicais livres (reação do tipo I) ou por transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), levando à produção de oxigênio singleto. Ambos os caminhos podem levar à morte celular (LAMBRECHTS *et al.*, 2005; DEMIDOVA & HAMBLIN, 2005).

Tem sido descrito que vários fotossensibilizadores podem matar bactérias orais *in vitro*. O AM, por exemplo, pode erradicar totalmente *Candida albicans* da cavidade oral, através da sua administração tópica (TEICHERT *et al.*, 2002). O retorno da aplicação antimicrobiana de fotossensibilizadores é resultado de dois fatores: a disseminação da AIDS e o enorme crescimento das infecções hospitalares devido às bactérias resistentes aos fármacos (PERUSSI, 2007).

Em 2009 já se falava sobre a utilização de fotossensibilizadores nanoestruturados em um equipamento de baixo custo que utilizasse a energia solar para purificar a água em regiões carentes (ALROUSAN *et al*, 2009).

Porém, ainda assim, esses aparelhos (reatores) apresentam um custo muito maior que a utilização do AM em garrafas PET. Além da diminuição do impacto ambiental que a utilização das garrafas PET proporciona.

Segundo Asiimwe e colaboradores (2013), existe certa preocupação sobre o produto da fotodegradação das garrafas PET durante a desinfecção solar de água, sendo esta uma barreira psicológica ao uso do SODIS. Estudos compararam a eficácia da garrafa de vidro e da garrafa PET na inativação de *E. coli*, e os resultados indicam que a eficácia do tratamento SODIS em garrafas de vidro sob condições tropicais é comparável às de plástico PET.

Em uma avaliação global do método SODIS, os benefícios e os riscos têm de ser ponderados, sendo este um processo de tratamento eficaz, simples e barato para a desinfecção solar da água. Geralmente, micropoluentes químicos em água potável são considerados um problema menor em comparação com os possíveis riscos de contaminação microbiana. Nesse sentido, dados sobre produtos químicos que migram de garrafas PET para água potável confirmam que o processo de tratamento SODIS é seguro e não provoca a migração de contaminantes perigosos em níveis críticos como insinuado por relatos isolados (SCHMID *et al.*, 2008).

Além dos agentes físicos, a fotossensibilização é capaz de otimizar o potencial esterilizante da desinfecção solar quando não for possível atingir a irradiância e a temperatura adequadas. O AM é de uma categoria especial de agentes fotossensibilizadores, os corantes vitais não tóxicos. Estes são

capazes de intensificar a produção de ERO, ao absorverem um fóton de luz de comprimento de onda na faixa de 660nm (luz visível vermelha), são ativados e reagem com moléculas de oxigênio, por transferência de energia, elétrons ou prótons, produzindo radicais livres e/ou oxigênio singleto, ocasionando a destruição das células. O AM é foto decomposto pela radiação solar, causando alteração no aspecto da água, que do tom azulado característico, passa ao incolor, para o consumo (MELO & PERUSSI, 2012).

A terapia fotodinâmica do AM tem sido usada como agente antimicrobiano, causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina em feridas superficial e profunda (PARJAM *et al.*, 2009). Tal molécula, em combinação com luz, também inativa o vírus da hepatite C e o vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), além de ser utilizado em casos de psoríase (BREITKREUTZ & MOHR, 1998; SALAH *et al.*, 2009).

A radiação solar no Rio de Janeiro, no verão, é composta de cerca de 93% de raios UV-A e 7,% de raios UV-B. Para melhor compreender a interação dos fenômenos naturais com o material biológico, utilizaram-se fontes de radiação semelhantes às encontradas na natureza. Os ensaios na LSS com os filtros AMO, capaz de remover o excesso da radiação infravermelha e o 87066 que permite a passagem de 97,33% de raios UV-A e 2,77% de raios UV-B, melhor mimetizaram as condições naturais. A intensidade de radiação solar utilizada durante as experiências foi de 950 W/m^2 , sendo essa condição favorável ao SODIS, pois, como dito por Acra e colaboradores (1984), é necessária uma intensidade de radiação solar de, no mínimo, 500 W/m^2 para que a desinfecção da água tenha o efeito desejado. Portanto, o procedimento

de dosimetria pelo simulador foi necessário para monitoramento e comparação dos resultados observados nos tratamentos.

Foram realizadas algumas experiências expondo garrafas PET ao Sol e à LSS, enquanto outras permaneceram no escuro, como controles experimentais. Desta forma, foi possível observar que no escuro não houve a inativação dos micro-organismos, tanto na amostra sem o fotossensibilizador quanto na amostra com o mesmo, sugerindo que o AM sozinho, no escuro, não é letal nas condições testadas.

Observamos um efeito sinérgico do tratamento SODIS quando as culturas são iluminadas com LSS ou com Sol, na presença do AM. O fenômeno foi observado em *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. epidermidis*, *D. radiodurans* e vírus.

Com relação à eficiência da inativação bacteriana, é conhecido que bactérias Gram-positivas são geralmente mais susceptíveis à inativação fotodinâmica e as espécies Gram negativas são significativamente resistentes a muitos fotossensibilizadores comumente usados em terapias fotodinâmicas (MAISCH, 2009).

As bactérias Gram positivas (*S. epidermidis* e *D. radiodurans*) foram extremamente sensíveis ao tratamento simultâneo, devido supostamente à sua estrutura, pois estas se caracterizam por possuírem a parede peptidoglicana mais densa. Este fator deve ter contribuído para a permanência da molécula de AM na célula e ao penetrar e receber radiação solar por 5 minutos causou a morte celular. *S. epidermidis* é um micro-organismo oportunista, presente na pele e em mucosas, por vezes, também está presente nos intestinos e no trato

urinário. É conhecido por sua capacidade de desenvolver resistência contra agentes antimicrobianos (MIYABE *et al.*, 2011).

D. radiodurans é um dos organismos mais resistentes à radiação já descobertos. É classificado como um coco Gram positivo, apresentando um envelope celular complexo, semelhante ao dos organismos Gram negativos. É importante ressaltar que o seu mecanismo de reparo de quebras de fita dupla de DNA (DSB) é muito eficiente e preciso, podendo restaurar até milhares de DSB (ZAHRADKA *et al.*, 2006). Entretanto, se a maquinaria molecular envolvida neste processo for inativada por oxidação, a célula se torna muito mais sensível aos danos (DALY *et al.*, 2007). Embora muito eficiente na defesa de outras ERO, esta bactéria parece muito sensível ao oxigênio singleto gerado na presença de fotossensibilizadores, apresentando maior sensibilidade do que a observada em a *E. coli* para tratamento fotodinâmico com o sensibilizador Rosa Bengala, que gera oxigênio singleto e radicais superóxido (SLADE & RADMAN, 2011). Assim, mesmo a *D. radiodurans*, resistente a agentes físicos que causam lesões no DNA, como radiações ionizante e ultravioleta, quando na presença do AM, 90% das células foram inativadas em apenas 15 min.

Diferentemente, as bactérias Gram negativas (*E. coli* e *S. typhimurium*) apresentam uma fina camada peptidoglicana envolta por uma membrana externa composta por fosfolípidos, lipoproteínas, proteínas e lipopolissacarídeos (LPS). Essa membrana age como uma barreira contra agentes químicos, dificultando, assim, a entrada e fixação do fotossensibilizador, sendo necessário um tempo maior de exposição à radiação solar (PELCZAR, 1996).

E. coli é a espécie mais frequentemente estudada, sendo este micro-organismo de referência para a identificação de coliformes fecais na água e alimentos. Estudos em citometria de fluxo demonstraram que a inativação desta espécie pela desinfecção solar é causada pela interrupção de uma sequência normal de funções celulares. A síntese de ATP e a atividade da bomba de efluxo cessam logo após o início da exposição seguido por uma gradual perda de potencial de membrana e de uma redução na absorção de glicose. Finalmente, a membrana citoplasmática das células bacterianas se torna permeável, levando à morte celular (BERNEY *et al.*, 2006). De acordo com nossos resultados, a inativação bacteriana ocorreu em apenas 15 minutos, quando o AM foi administrado junto com a radiação solar. Para o tratamento SODIS clássico, tanto irradiado artificialmente quanto naturalmente, foram necessários 120 minutos.

Em *Salmonella*, a inativação ocorreu somente no tratamento simultâneo, não sendo verificada com SODIS isoladamente até 180 min irradiados no LSS ou Sol. A resposta fisiológica ao SODIS pode ser diferente entre as bactérias entéricas, portanto, a espécie *E. coli* pode não ser a bactéria indicadora apropriada para testar a eficácia do SODIS sobre bactérias entéricas (BERNEY *et al.*, 2006).

Para os estudos com vírus bacterianos expostos ao LSS, Andrade em 2009, verificou a inativação de 90% das partículas em 60 min de exposição, enquanto que, no modelo com fotossensibilização, em apenas 30 min ocorre inativação quase total dos vírus (99,999%), como visto na Figura 35, publicada pelos autores.

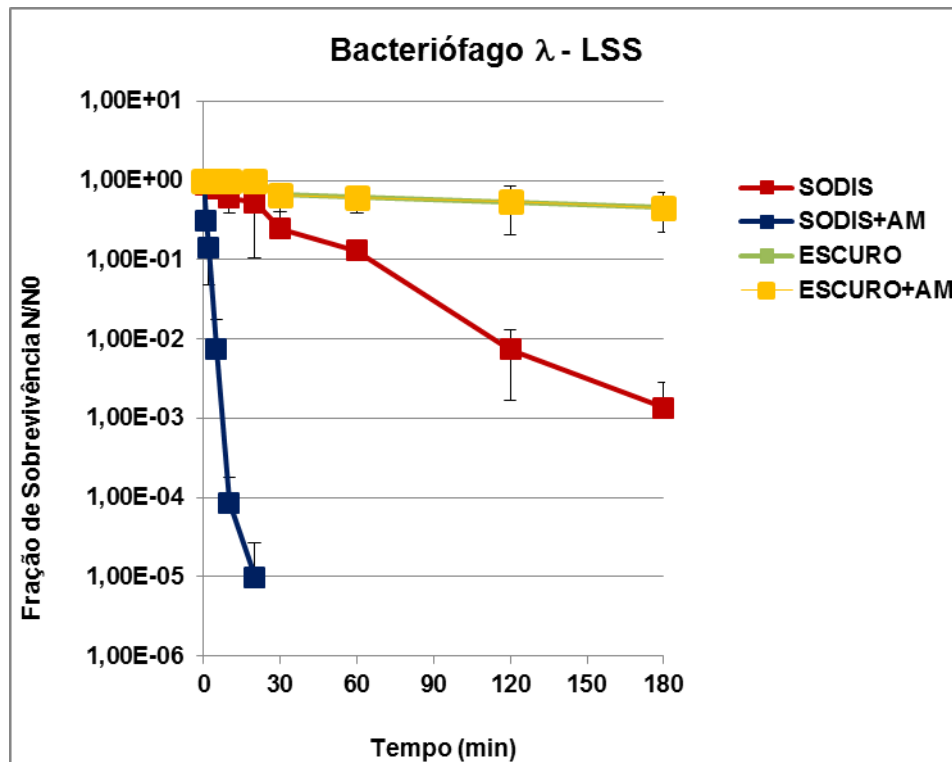


Figura 35 - Inativação dos vírus com o decorrer do tempo (ANDRADE, 2009)

Outras experiências foram realizadas com cepas de *E. coli* deficientes em mecanismos de reparação do DNA. Estes resultados permite-nos sugerir que tipo de lesão está sendo produzido nos vírus pelo tratamento. Entretanto, não foi observada nenhuma diferença na inativação dos vírus, nem os irradiados na LSS, descrito por Andrade em 2009 (Figura 36), ou luz solar natural, quando inoculados nos diferentes mutantes bacterianos deficientes em um dos mecanismos de reparo do DNA. Esses dados sugerem que as lesões não foram do tipo dímero de pirimidinas, visto que estas são corrigidas pelo reparo por excisão de nucleotídeos, nem quebra na molécula de DNA, corrigidos pela recombinação genética. Se o fotossensibilizador atuasse nas fitas de DNA, quando os vírus lesados fossem inoculados na cepa selvagem, haveria o reparo no DNA do vírus pelas proteínas de reparo da bactéria

aumentando a sobrevivência viral, relativamente aos vírus inoculados nas cepas deficientes em reparo, o que não foi observado.

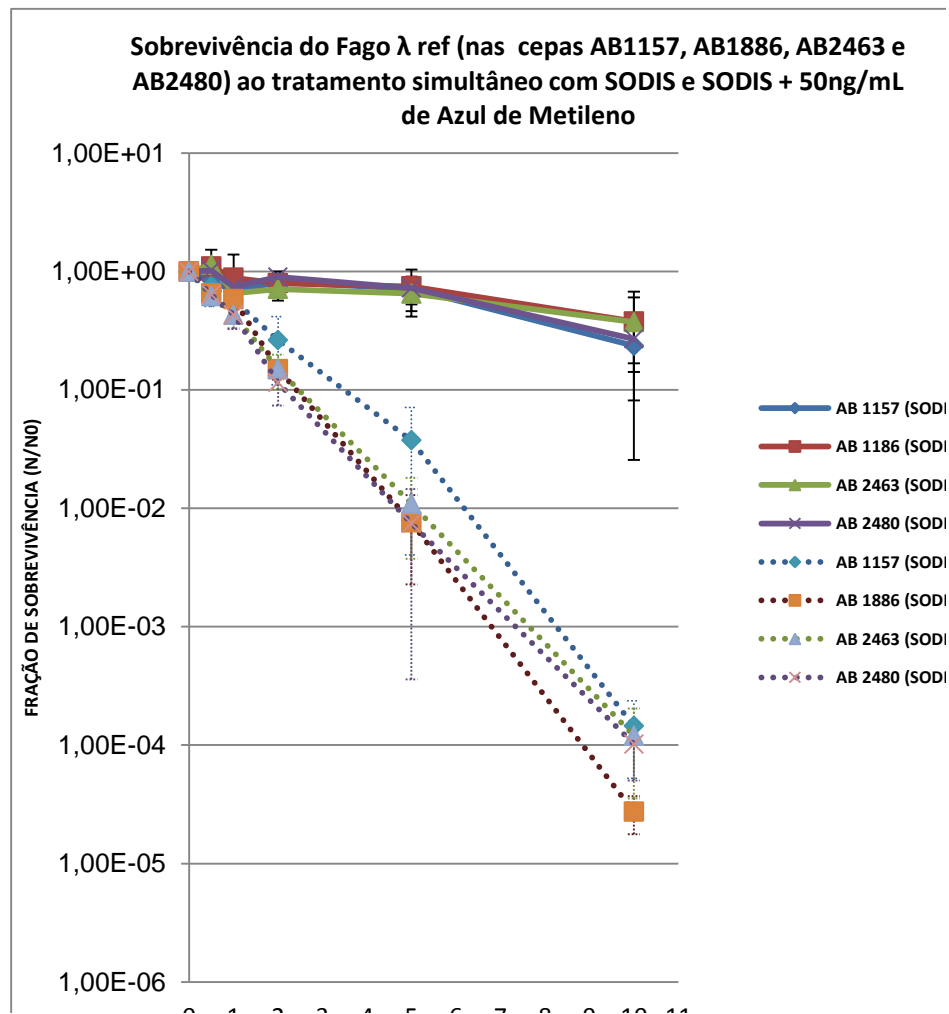


Figura 36 - Sobrevivência dos vírus quando inoculados em diferentes cepas de *E.coli*, após tratamento com SODIS e SODIS+AM (ANDRADE, 2009).

Postula-se que onde há bactérias é possível encontrar pelo menos um bacteriófago para cada hospedeiro diferente. Solo, água, esgoto, seres humanos e animais (pele, cavidade oral, saliva, fezes, intestino) e até mesmo os alimentos de consumo humano, são alguns exemplos de onde esses vírus podem ser isolados. Os bacteriófagos têm evoluído a ponto de sobreviverem

em ambientes inóspitos como temperaturas extremas (MARKS & SHARP, 2000; ASHELFORD *et al.*, 2003; MERRIL, 1974).

Segundo Jonczyk *et al.* (2011) os bacteriófagos podem ser resistentes a fatores físicos, químicos, como a temperaturas extremas (baixas e altas), pH, salinidade e concentração de íons. Entretanto, quando expostos à luz solar na presença do AM foi necessário apenas 1 minuto para inativação viral.

Corantes de fenotiazina, tais como a azul de metileno, azul-de-toluidina, vermelho neutro são fotossensibilizadores adequados uma vez que eles absorvem luz com comprimentos de onda acima de 500 nm, onde as proteínas plasmáticas não absorvem. Além disso, eles formam complexos fortes com as proteínas de superfície e os ácidos nucleicos do vírus (LÓ *et al.*, 2015).

Nossos resultados sugerem que a utilização do AM como sensibilizador associado ao tratamento SODIS, permitiu a redução drástica do tempo necessário para a desinfecção solar, permitindo a eliminação de bactérias e vírus presentes na água, de maneira eficaz, mesmo em condições adversas de temperatura e radiação solar, durante diferentes épocas do ano, fator de extrema relevância em populações que não têm acesso a água potável.

A quantidade desta substância adicionada à água não onera o tratamento, pois o preço de um frasco contendo 30 mililitros da solução de AM 1% (p/v) é bastante acessível à população, e poderia, assim, ser utilizada para tratar grandes volumes de água, uma vez que uma gota é capaz de desinfetar cerca de 10 litros de água. O uso do método SODIS com AM é válido, e de extrema relevância, principalmente, para as regiões que não dispõem de intensidade solar suficiente. Na Figura 37 encontra-se o esquema prático para a utilização doméstica do AM.



Figura 37 – Esquema proposto para o uso doméstico do AM na técnica SODIS para 10 litros de água

6 – CONCLUSÕES

- O material dos diferentes tipos de garrafas PET absorve radiação abaixo de 340 nm, ou seja, parte das radiações UV-A e visíveis não são absorvidas e, portanto atravessam todas as garrafas testadas;
- A transparência de diferentes tipos de garrafas PET é semelhante e capaz de barrar parte das radiações emitidas tanto pela LSS quanto pela luz solar. Além disso, essas garrafas são mais transparentes às radiações UV-A e UV-B solares do que às artificiais;
- A cor azul de soluções de AM nas concentrações de 2 µg/mL e 0,2 µg/mL desaparecem quando expostas ao sol por 3 horas constatando a

transformação do AM na sua forma leuco, um fenômeno devido à absorção da radiação UV-A, já descrito na literatura;

- O AM pode ser usado como sensibilizador nos testes SODIS porque reduziu drasticamente o tempo necessário para a desinfecção solar, tanto em dias ensolarados quanto em dias nublados, permitindo a eliminação de bactérias e vírus da água;

- Quando culturas bacterianas foram iluminadas na presença de AM, observou-se um efeito sinérgico que levou a letalidade de micro-organismo;

- A *Salmonella typhimurium* se mostrou mais resistente aos tratamentos SODIS clássico e SODIS + AM que a *E.coli*. Sabendo-se que este micro-organismo é uma enterobactéria patogênica, consideramos que este deva ter a mesma importância que a *E. coli*, no estudo de águas contaminadas;

- A técnica de membrana filtrante foi eficaz para coliformes, uma vez que a quantidade amostral que pode ser analisada é maior do que a usada em semeadura por espalhamento, e o uso do meio seletivo para coliformes facilita a avaliação da qualidade da água;

- O uso de um aditivo de baixo custo, como o AM, é capaz de acelerar a metodologia SODIS o que o torna de imensa importância para a aplicação em comunidades carentes de água potável, que dependem do Sol para desinfecção da água, durante o ano inteiro;

- A disseminação da técnica SODIS + AM na região Amazônica contribuiu para a melhoria da qualidade da água conforme aplicado e testado no Lago Puruzinho;

- O método SODIS + AM foi desenvolvido e validado, podendo ser utilizado como opção segura e eficaz de descontaminação microbiológica de água em nível caseiro para regiões sem acesso a água tratada.

7 - PERSPECTIVAS

- Evidentemente o uso do tratamento SODIS + AM levou à inativação de bactérias causadoras de doenças transmitidas pela contaminação da água, como *E. coli* que causa diarreia infecciosa e *Salmonella*, a disenteria (diarreia líquida). Sendo assim, como perspectivas para complementação do trabalho, avaliaremos a inativação de outras espécies causadoras de doenças transmitidas pela contaminação da água, principalmente disenteria por infecção parasitária (*Giardia lamblia* – Giardíase), (*Entamoeba histolytica* - Amebíase) ou cólera (infecção com o *Vibrio cholerae*);
 - Avaliar a inativação de fungos;
 - Aplicação da técnica de Desinfecção Solar SODIS + AM pode ter seu uso potencialmente estratégico principalmente durante calamidades públicas, como alagamentos e enchentes;
 - Capacitação de jovens (escolas e comunidades) para disseminar a técnica SODIS + AM em regiões carentes, desta forma, diminuindo os problemas associados ao consumo de águas contaminadas.

8 – ANEXO

A partir da implementação do Projeto – “Pensa Rio – Apoio ao Estudo de Temas Relevantes e Estratégicos para o Estado do Rio de Janeiro” /FAPERJ

(2007), iniciamos trabalhos de sensibilização, capacitação e divulgação do método SODIS + AM que foram realizados para ressaltar a importância do tratamento da água e dos hábitos de higiene pessoal. Essa abordagem foi realizada de diferentes maneiras, principalmente através de palestras e aulas práticas.

Atividades realizadas:

- Escola Municipal Leonel Azevedo - RJ (2009). Palestra e aula prática para os alunos do Ensino Fundamental II;
- Espaço Ciência Viva - RJ (2010). Realização de Oficinas;
- “Espaço Ciência Viva na Praça” - RJ (SNCT/2009 e 2011). Divulgação durante a Semana Nacional de Ciência e Tecnologia;
- Feira FAPERJ - Ciência, Tecnologia e Inovação – RJ (2011 e 2013). Exposição do método SODIS fotocatalisado;
- Escola Municipal Politécnica Antônio Luiz Pedrosa - Araruama (2012). Palestra para os alunos do Curso Técnico em Meio Ambiente;
- Através Do projeto do Instituto de Pesquisa Translacional em Saúde e Ambiente na Região Amazônica – *INPeTAm* (CNPq-FAPERJ) foi possível a formação de um grupo multidisciplinar e interinstitucional, incluindo a capacitação de recursos humanos, voltado para a questão da Educação em Saúde. No Curso prático para professores do ensino fundamental em Ouro Preto do Oeste (RO) apresentados nas figuras 38 e 39, foi possível demonstrar o método SODIS fotocatalisado.



Figura 38- Curso de Capacitação de professores do Ensino Fundamental.



Figura 39 - Aula prática para demonstração do método SODIS + AM.

O projeto “A desinfecção Solar melhorando a qualidade da água”, foi apresentado na I Expedição multidisciplinar ao Lago Puruzinho em Humaitá/AM em 2010 (Figura 40), logo após a avaliação bacteriológica das águas consumidas nas casas ao redor do Lago (Figuras 41, 42 e 43).



Figura 40 - Equipe multidisciplinar.



Figura 41 - Local para abastecimento da comunidade do Puruzinho.



Figura 42 - Avaliação microbiológica das águas consumidas e aplicação do método SODIS.



Figura 43 – Resultados da aplicação do método SODIS e divulgação para comunidade.

Em 2012, foi feita a divulgação do método SODIS + AM, conforme mostrado na Figura 44, avaliação bacteriológica das águas da comunidade de Buiuçu, na margem do Rio Madeira, e as consumidas a partir do poço artesiano construído ao redor do Lago Puruzinho.



Figura 44 – Abordagem dos habitantes locais para coleta de água e divulgação do método.

Em 2014 a aplicação real na população ribeirinha do Lago Puruzinho em Humaitá, como apresentado na Figura 45.



Figura 45 – Garrafas PET incolores expostas ao Sol, utilizadas pela população local.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT- NBR 9648 - Estudo de concepção de sistemas de esgoto

Origem: NB-566/1986CB-02 - Comitê Brasileiro de Construção Civil
CE-02:009.27 - Comissão de Estudo de Projetos de Sistemas de Esgoto Sanitário, 1986.

ACHER, A.J., JUVEN, B.J. **Destruction of coliforms in water and sewage water by dye-sensitized photo oxidation.** Applied and Environmental Microbiology, v. 33, n. 5, p.1019-1022, 1977.

ACRA, A., RAFFOUL, Z., KARAHAGOPIAN, Y. **Solar disinfection of drinking water and oral rehydration solutions.** United Nations Children's Fund, Amman, Jordan, p. 56, 1984.

ALROUSAN, D.M., DUNLOP, P.S., MCMURRAY, T.A., BYRNE, J.A. **Photocatalytic inactivation of E. coli in surface water using immobilized nanoparticle TiO₂ films.** Water Research. v.43, n.1, p.47-54, 2009.

ANDERSON, A.W., NORDAN, H.C., CAIN, R.F., PARRISH, G., DUGGAN, D. **Studies on a radio-resistant micrococcus. Isolation, morphology, cultural characteristics and resistance to gamma radiation.** Food Technology, 10(12), p. 575-578, 1956.

ANDRADE, J.C. **A Desinfecção Solar promovendo a qualidade da água: inativação de vírus.** 2009. 39p (Monografia). Trabalho de Conclusão de Curso. Coordenação Pedagógica do Curso de Ciências Biológicas. Universidade Gama Filho.

APHA-AWWA-WEF, American Public Health Association, A.W. Works, W.E.F. Association, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater in, New York, NY, 1998.

ASIIMWE, J.K., QUILTY, B., MUYANJA, C.K., McGUIGAN, K.G. **Field comparison of solar water disinfection (SODIS) efficacy between glass and polyethylene terephthalate (PET) plastic bottles under sub-Saharan weather conditions.** Journal of Water and Health, v. 11, issue 4, p. 729-737, 2013.

ASHELFORD, K.E., DAY, M. J. and FRY, J.C. **Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil.** Applied and Environmental Microbiology, v. 69, p. 285-289, 2003.

BERNEY, M., WEILENMANN, H.U., EGLT, I. **Flow-cytometric study of vital cellular functions in *Escherichia coli* during solar disinfection (SODIS),** Microbiology, v. 152, p. 1719–1729, 2006.

BERNEY, M.; WEILENMANN, H.U.; IHSEN, J. BASSIN, C., EGLI, T. **Specific growth rate determines the sensitivity of *Escherichia coli* to thermal, UVA, and solar disinfection,** Applied and Environmental Microbiology, v. 72, p. 2586–2593, 2006.

BYRNE, J.A., FERNANDEZ-IBAÑEZ, P.A., DUNLOP, P.S.M., ALROUSAN, D.M.A., HAMILTON, J.W.J. **Photocatalytic Enhancement for Solar Disinfection of Water: A Review**. International Journal of Photoenergy, v. 2011, Article ID 798051, 12 pages, 2011.

BOTTO, M.P. **Avaliação do processo de desinfecção solar (SODOS) e de sua viabilidade social no estado do Ceará**. 2006. 196p (Dissertação de Mestrado). Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.

BREITKREUTZ, M., MOHR, H. **Hepatitis C and human immunodeficiency virus RNA degradation by methylene blue/light treatment of human plasma**. Journal of Medical Virology, v. 56, p. 239-245, 1998.

CASLAKE, L.F., CONNOLLY, D.J., MENON, V., DUNCANSON, C.M., ROJAS, R., TAVAKOLI, J. **Disinfection of contaminated water by using solar irradiation**. Applied and Environmental Microbiology, v. 70, n. 2, p. 1145-1150, 2004.

CLIFTON, J. 2nd., LEIKIN, J.B. **Methylene blue**. American Journal of therapeutics, v. 10, p. 289–291, 2003.

CONROY, R.M., MEEGAN, M.E., JOYCE, T., McGUIGAN, K., BARNES, J. **Solar disinfection of drinking water protects against cholera in children under 6 years of age**. Archives of Disease in Childhood, v. 85, n. 4, p. 293-295, 2001.

DALY, M.J. GAIDAMAKOVA, E.K. MATROSOVA, V.Y. VASILENKO, A. ZHAI, M. LEAPMAN, R.D. LAI, B. RAVEL, B. LI, S.M. KEMNER, K.M. FREDRICKSON, J.K. **Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radio resistance**. PLoS Biology, 5(4):e92, 2007.

DEMIDOVA, T. N., HAMBLIN, M. R. **Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 49, p. 2329-2335, 2005.

DOWNES, A., BLUNT, T.P. **Researches on the effect of light upon bacteria and other organisms**. Proceedings of the Royal Society. p. 488-500, 1877.

EAWAG/SANDEC – INSTITUTO FEDERAL SUÍÇO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AQUÁTICA/DEPARTAMENTO DE ÁGUA E SANEAMENTO BÁSICO PARA PAÍSES EM DESENVOLVIMENTO. **Desinfecção solar da água: Guia de aplicações do SODIS**. Dübendorf, Outubro 2002.

EISENSTARK, A., BUZARD, R.L., HARTMAN, P.S. **Inactivation of phage by near-ultraviolet radiation and hydrogen peroxide**. Photochemistry and Photobiology, v. 44, p. 603-606, 1986.

FISHER, M.B., IRIARTE, M., NELSON, K.L. **Solar water disinfection (SODIS) of *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*, and MS2 coliphage: Effects of additives and alternative container materials**. Water Research, v. 46, p. 1745-1754, 2012.

FISHER, M.B., KEENAN, C.R., NELSON, K.L. **Speeding up solar disinfection (SODIS): effects of hydrogen peroxide, temperature, pH, and copper plus ascorbate on the photoinactivation of *E. coli*.** Journal of Water and Health. v. 6, p. 35-51, 2008.

GAD, F., ZAHRA, T., HASAN, T. **Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 48, p. 2173-2178, 2004.

GARCEZ, A.A.; RIBEIRO, M.S.; NUNES, S.C.; SOUZA, F.R. **Terapia fotodinâmica em odontologia laser de baixa potencia para redução microbiana.** Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas, v. 57, n. 3, p. 223-226, 2003.

GINIMUGE, P.R., and JYOTHI, S. D. **Methylene blue: Revisited.** Journal of anesthesiology, clinical pharmacology, v. 26, n. 4, p. 517-520, 2010.

GONÇALVES, T.C.W. **Contribuições do componente oxidativo da radiação UV-B na toxicidade e mutagênese induzidas em *Saccharomyces cerevisiae*.** 2014.120p (Tese de doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, RJ.

IBGE - Censo Demográfico de 2011.

JOŃCZYK, E., KŁAK, M., MIĘDZYBRODZKI, R., GÓRSKI A. **The influence of external factors on bacteriophages—review.** Folia Microbiology, vol. 56, p.191–200, 2011.

LAMBRECHTS, S. A. G., AALDERS, M. C. G., MARLE, J. V. **Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 49, p. 2026-2034, 2005.

LEITÃO, A.C., LAGE, C., CABRAL-NETO, J., *et al.* **Respostas celulares às lesões induzidas por agentes físicos e químicos.** Radiobiologia e Fotobiologia, Apostila Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ, 2005.

LO, J.C.Y., DARRACQ, M.A., CLARK, R.F. **A review of methylene blue treatment for cardiovascular collapse.** The Journal of Emergency Medicine, v. 46, n. 5, p. 670–679, 2014.

LONNEN, J. KILVINGTON, S., KEHOE, S.C., AL-TOUATI, F., McGUIGAN, K. G. **Solar and photocatalytic disinfection of protozoan, fungal and bacterial microbes in drinking water.** Water Research, v. 39, n. 5, p. 877-883, 2005.

MAISCH, T. **A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment.** Mini reviews in medicinal chemistry, v. 9, n. 8, p 947-83, 2009.

MARKS, T., SHARP, R. **Bacteriophages and biotechnology: a review.** Journal of Chemical Technology Biotechnology, v. 75, p. 6-17, 2000.

MATHERS, C., STEVENS, G., MASCARENHAS, M., **Global Health Risks: Mortality and Burden of Disease Attributable to Selected Major Risks.** World Health Organization (WHO). 70 pages, 2009.

McGUIGAN, K.G., CONROYA, R.M., MOSLERB, H., DU PREEZC, M., UBOMBA-JASWAC, E., FERNANDEZ-IBAÑEZD, P. **Solar water disinfection (SODIS): A review from bench-top to roof-top.** Journal of Hazardous Materials. v. 235– 236, p. 29– 46, 2012.

MEIERHOFER, R., LANDOLT, G. **Factors supporting the sustained use of solar water disinfection: experiences from a global promotion and dissemination programme,** Desalination, v. 248, p. 144–151, 2009.

MELO, W.C.M.A., PERUSSI, J.R. **Comparando inativação fotodinâmica e antimicrobianos.** Revista de ciências farmacêuticas básica aplicada, v. 33, n. 3, p. 331-340, 2012.

MERRIL, C. R. **Bacteriophage interactions with higher organisms.** Transaction of the New York Academy of Sciences, v. 36, p. 265-272, 1974.

MILLER, J. H. **Experiments in Molecular Genetics.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1992.

Ministério da Saúde – Portaria MS Nº 2914 DE 12/12/2011 (Federal) para Potabilidade da Água

MINTZ, E., BARTRAM, J., LOCHERY, P., WEGELIN, M. **Not just a drop in the bucket: expanding access to point-of-use water treatment systems.** American Journal of Public Health, v. 91, n. 10, p.1565-1570, 2001.

MIYABE, M., JUNQUEIRA, J.C., COSTA, A.C., JORGE, A.O., RIBEIRO, M.S., FEIST, I.S. **Effect of photodynamic therapy on clinical isolates of *Staphylococcus* spp.** Brazilian Oral Research, v. 25, n. 3, p. 230-234, 2011.

NOBLE, R.T., LEE, I.M., SCHIFF, K.C. **Inactivation of indicator microorganisms from various sources of fecal contamination in seawater and freshwater.** Journal of Applied Microbiology. v. 96, p. 464-472, 2004.

NOVA PORTARIA DE POTABILIDADE DE ÁGUA: **Busca de consenso para viabilizar a melhoria da qualidade de água potável distribuída no Brasil.** Revista DAE; Edição189, Publicação quadrimestral da Sabesp, maio/agosto – 2012. <http://www.revistadae.com.br>

OLIVEIRA, C.S. **Propriedades fotoquímicas dos fotossensibilizadores cristais violeta e azul de metileno em sistemas micro heterogêneo e em células cancerosas em cultura.** 124p. Tese de Doutorado em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46131/tde-12062008-135805/>>. Acesso em: 2014-12-01.

PATERNIANI, J.E.S.; SILVA, M.J.M. **Desinfecção de efluentes com tratamento terciário utilizando energia solar (sodis): avaliação do uso do**

dispositivo para concentração dos raios solares. Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental, v. 10, n. 1, p. 9-13, 2005.

PARJAM, Z.S., PACKER, S., SINGER, M., *et al.* **In vivo killing of *Staphylococcus aureus* using light-activated antimicrobial agent.** BMC Biology. v. 9, p. 27, 2009.

PELCZAR JR, M.J. **Microbiologia: conceitos básicos e aplicações.** 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996.

PERUSSI, J.R. **Inativação fotodinâmica de micro-organismos.** Química. Nova. v. 30, n. 4, p.988-994, 2007.

PFEIFFER, W.C.; LACERDA, L.D. **Mercury inputs to the Amazon region, Brazil.** Environmental Technology Letters. v. 9, p. 325-350, 1988.

PLANSAB - PLANO NACIONAL DE SANEAMENTO BÁSICO – **Mais saúde com qualidade de vida e cidadania.** Ministério das Cidades - Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental, 2013.

RIJAL, G. K., FUJIOKA, R. S. **Use of reflectors to enhance the synergistic effects of solar heating and solar wavelengths to disinfect drinking water sources.** Water Science and Technology. v. 48, p. 481-488, 2003.

RIJAL, G.K., FUJIOKA, R. S. **Synergistic effect of solar radiation and solar heating to disinfect drinking water sources.** Water Science Technology. v. 43, n. 12, p.155-162, 2001.

SALAH, M., SAMY, N., FADEL, M. **Methylene blue mediated photodynamic therapy for resistant plaque psoriasis.** Journal of Drugs in Dermatology. v. 8, p. 42-49, 2009.

SCHIRMER, R.H., ADLER, H., PICKHARDT, M., MANDELKOW, E. **Last we forget you – methylene blue.** Neurobiology of Aging. v. 32, n.12, p.2325.e7-2325.e16, 2011.

SCHMID P., KOHLER, M., MEIERHOFER, R., LUZI, S., WEGELIN, M. **Does the reuse of PET bottles during solar water disinfection pose a health risk due to the migration of plasticisers and other chemicals into the water?** Water Research. v. 42, n. 20, p.5054-60, 2008.

SLADE, D.; RADMAN, M. **Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*,** Microbiology and molecular biology reviews. p.133 –191, vol. 75, No. 1, 2011.

SICHEL, C., FERNANDEZ-IBANEZ, P., DE CARA, M. **Lethal synergy of solar UV-radiation and H₂O₂ on wild *Fusarium solani* spores in distilled and natural well water.** Water Research. v. 43, p. 1841-1850, 2009.

SINTON, L. W., HALL, C. H., LYNCH, P. A., **Sunlight inactivation of fecal indicator bacterial and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters.** Applied and Environmental Microbiology, v. 68, p. 1122-1131, 2002.

Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento de 2010, da SNSA/Ministério das Cidades.

SOBSEY, M. D., BROWN, J. **Evaluating household water treatment options: health-based targets and microbiological performance specifications.** OMS Press, Geneva, Switzerland. 2011.

TARRASS, F., BENJELLOUN, M. **The effects of water shortages on health and human development.** Perspectives in Public Health, v. 132, n. 5, p. 240-244, 2012.

TEICHERT, M. C., JONES, J. W., USACHEVA, M. N. **Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immune deficient murine model.** Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, v. 93, p. 155-160, 2002.

TEIXEIRA, J.C., GUILHERMINO, R.L. **Análise da associação entre saneamento e saúde nos estados brasileiros, empregando dados secundários do banco de dados indicadores e dados básicos para a saúde 2003– IDB 2003.** Engenharia Sanitaria Ambiental, v. 277(11), n. 3, p. 277-282, 2006.

THE UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND (UNICEF)/WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Diarrhea: Why children are still dying and what can be done.** 2009.

ISBN 978-92-806-4462-3 (UNICEF)

ISBN 978-92-4-159841-5 (NLM classification: WS 312) (WHO)

UNITED NATIONS HUMAN SETTLEMENTS PROGRAMME (UNHSP). **Water and Sanitation in the World's Cities: Local Action for Global Goals.** London: Earthscan, 2003

WAINWRIGHT, M. **The emerging chemistry of blood product disinfection.** Chemical Society Reviews, v. 31, p. 128-136, 2002.

WAINWRIGHT, M. **Pathogen inactivation in blood products.** Current Medicinal Chemistry. v. 9, p. 127-143, 2002.

WORLD BANK (WB). **World Development Report 1990, Poverty.** Oxford: Oxford University Press, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking-water quality - 4th edition.** 2011.

ISBN 978 92 4 154815 1

WORLD HEALTH ORGANIZATION/UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND – OMS/UNICEF, 2014. **Progress on Drinking Water and Sanitation – 2014 update.** ISBN 978 92 4 150724 0 (NLM classification: WA 670).

ZAHRADKA, K., SLADE, D., BAILONE, A., SOMMER, S., AVERBECK, D., PETRANOVIC, M., LINDNER, AB., RADMAN, M. **Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*.** Nature, Oct 5. 443(7111):569-73, 2006.