

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Beatriz Pereira Savi

**Monitoramento em escala real de vírus entéricos e respiratórios humanos após  
evento de extravasamento de efluente sanitário na Lagoa da Conceição-  
Florianópolis/SC**

Florianópolis

2022

Beatriz Pereira Savi

**Monitoramento em escala real de vírus entéricos e respiratórios humanos após  
evento de extravasamento de efluente sanitário na Lagoa da Conceição-  
Florianópolis/SC**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profª Dra. Gislaine Fongaro

Florianópolis

2022

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

Savi, Beatriz

Monitoramento em escala real de vírus entéricos e respiratórios humanos após evento de extravasamento de efluente sanitário na Lagoa da Conceição - Florianópolis/SC / Beatriz Savi ; orientador, Gislaine Fongaro, 2022.  
84 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, , Graduação em , Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. . 2. Vírus entéricos e respiratórios. 3. Lagoa da Conceição. 4. Contaminação ambiental. 5. Efluentes sanitários. I. Fongaro, Gislaine. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em . III. Título.

Beatriz Pereira Savi

**Monitoramento em escala real de vírus entéricos e respiratórios humanos após  
evento de extravasamento de efluente sanitário na Lagoa da Conceição  
(Florianópolis/SC)**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Licenciada e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas

Florianópolis, 2 de dezembro de 2022.

---

Prof<sup>a</sup>. Daniela Cristina de Toni  
Coordenadora do Curso

**Banca examinadora**

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Gislaine Fongaro  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Dra. Doris Sobral Marques Souza  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Caroline Rigotto  
Universidade Feevale

Florianópolis, 2022.

Dedico este trabalho a todos aqueles que foram economicamente ou emocionalmente afetados pela irresponsabilidade de empresas que deveriam prezar pela saúde da população e pela integridade ambiental.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, Camila e Aquiles, que não apenas me incentivaram a seguir o caminho da pesquisa, como possuíam paciência infinita para me ouvir confabular sobre hipóteses e teorias que surgiam com cada resultado. Um agradecimento especial ao meu pai, que me acompanhou em cada uma das coletas, fazendo chuva ou sol, além de resgatar por inúmeras vezes os frascos de coleta quando estes decidiam tornar-se livres nas águas da lagoa.

Gostaria de agradecer aos meus avós, Eliana e Hamilton que, apesar de não estarem mais conosco de uma forma ou de outra, foram peças essenciais para que eu me tornasse a cientista e a pessoa que eu sou hoje. Horas sentada com um microscópio ou em um banco de livraria foram legados que eu nunca esperei serem tão importantes para mim. Gostaria de agradecer à minha tia, Melina, que me deu início em diversos processos que contribuíram para quem eu sou hoje e para estar no lugar que eu estou. Foi o primeiro ônibus, a primeira ida na UFSC e o primeiro museu de história natural, momentos que podem ser considerados banais, porém que fizeram toda a diferença.

Gostaria de agradecer também o meu namorado, Gabriel, não apenas pelo seu envolvimento neste trabalho, mas por sua ajuda ao longo de toda a graduação. Tenho certeza que não teria aguentado cinco zoologias e quatro botânicas sem ter tido esse companheiro cheio de amor, paciência e senso de humor do meu lado.

Gostaria também de agradecer imensamente à minha orientadora, Gislaine, por me dar a liberdade de escolher trabalhar com o que mais me interessasse, além de mergulhar de cabeça comigo neste projeto, estabelecendo contatos, fazendo parcerias e abrindo os braços para discutir estatística às 19 horas de uma quarta-feira.

Gostaria de já deixar meus agradecimentos à banca, pois de uma forma ou outra contribuíram para este trabalho sendo pesquisadores exemplares em suas respectivas áreas, porém que contemplaram muito bem todos os aspectos aos quais este trabalho se refere.

Por fim, gostaria de agradecer à equipe mais maravilhosa que alguém já pudesse ter imaginado. Quando nos referimos ao LVA como família, não é apenas um apelido carinhoso, mas sim uma fonte de afeto, companheirismo, parceria e muita fofoca. Rafael, nunca mais conseguirei comer amendoim ou ouvir Matuê sem lembrar de você, dos assuntos mais íntimos às piadas mais bobas, eu sei que posso contar com você para qualquer coisa. Giulia, eu nunca pensei que fosse gostar tanto de alguém que me fez trabalhar com galinhas, mas hoje em dia não tenho palavras para agradecer tudo que me ensinou. Mariana, foi uma honra ser ensinada pela rainha do PCR, a tua paciência e sabedoria para lidar com problemas é inestimável, a Espanha que aguarde, seu sucesso em qualquer lugar do mundo é certo. Isabella, tu és o melhor exemplo de vilão da Disney que existe, de aparência brava por fora, mas um docinho por dentro, não tenho palavras para agradecer tudo que me foi pacientemente ensinado por você. Lara, com sua doçura e animação de sempre, sempre foi maravilhoso trabalhar contigo, ainda lançaremos uma patente juntas.

Novamente, nossa equipe é uma família, e uma dessas famílias cheias de irmãos, primos e tios. Gostaria ainda de agradecer a Paula, Catielen, Lucas, Helena, Estêvão, por todas as parcerias já realizadas e aquelas que ainda estão por vir, me sinto muito feliz de fazer parte da trajetória de vocês e espero que saibam o quanto suas contribuições, nem que seja com uma pipetagem ou com um café, fizeram deste trabalho o que ele se tornou hoje.

## RESUMO

A Lagoa da Conceição, localizada na porção central-leste da ilha de Santa Catarina é um ponto turístico, cenário de uma paisagem deslumbrante aliada a uma alta produtividade econômica, principalmente associada às atividades pesqueiras e turísticas, que fornece sustento a diversas famílias. Pela sua ligação com o mar, a Lagoa da Conceição representa um ecossistema dinâmico, definido pela constante troca de águas entre a lagoa e o oceano. Em janeiro de 2021, ocorreu o rompimento da barragem de contenção da lagoa de evapoinfiltração da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Lagoa da Conceição, lançando um grande volume de esgoto no interior da Lagoa da Conceição. Apesar dessa lagoa de evapoinfiltração da ETE ser um local de armazenamento de efluentes de esgoto já tratados, existe o risco de contaminação da Lagoa da Conceição por patógenos entéricos ou respiratórios excretados em fezes humanas sendo estes resistentes aos processos de tratamento de esgoto aplicado em ETEs convencionais. Este estudo teve como objetivo monitorar vírus entéricos e respiratórios humanos presentes na Lagoa da Conceição após este evento de extravasamento e determinar se há tendência de redução da presença viral com base na recirculação de água e na resiliência da lagoa. Para tanto, foram coletadas amostras de água em três pontos ao longo da orla da Lagoa da Conceição quinzenalmente durante os sete meses seguintes ao evento (fevereiro até agosto/2021). As amostras de água foram concentradas pelo método de floculação orgânica usando leite acidificado. Foram investigadas a presença de vírus entéricos e respiratórios infecciosos (*Enterovirus* e *Mastadenovirus humanos*) nestas amostras por cultivo celular, como também a presença e quantificação das cópias genômicas dos vírus entéricos (*Vírus da Hepatite A*; *Rotavirus A*; *Norovirus humano genogrupos I e II*) e de respiratórios (*Mastadenovirus humano* e SARS-CoV-2), por técnica molecular (PCR em tempo real). Foram detectados enterovírus infecciosos e mastadenovírus humanos em 68,7% e 6,25%, respectivamente, nas amostras analisadas. Não foram detectados nenhum dos vírus investigados por PCR em tempo real, nas amostras. A presença de vírus entéricos nas amostras analisadas demonstra a contaminação da Lagoa da Conceição por patógenos virais, cuja presença foi detectada mesmo sete meses após a ocorrência do extravasamento de esgoto na Lagoa da Conceição. A presença de enterovírus nas amostras foi mais expressiva nos meses imediatamente posteriores a este evento, tornando-se mais escassa após os primeiros quatro meses subsequentes ao extravasamento. Essa dinâmica de detecção sugere a existência de sistemas de renovação da água da Lagoa da Conceição por meio da recirculação de águas e da vazão através do contato com o mar, reduzindo o efeito da contaminação por patógenos presentes nos efluentes sanitários. Mesmo com essa dinâmica, é necessário implementar um sistema de vigilância em saúde que inclua análise virológica para que seja possível identificar os patógenos contaminantes em tempo hábil para evitar a disseminação de doenças para a população.

**Palavras-chave:** monitoramento ambiental, vírus entéricos e respiratórios, lagunas costeiras.

## ABSTRACT

Lagoa da Conceição, located in the central-eastern portion of the island of Santa Catarina, is a tourist spot with a stunning landscape combined with high economic productivity, mainly associated with fishing and tourist activities, which provide sustenance to several families. Due to its connection with the sea, Lagoa da Conceição represents a dynamic ecosystem, defined by the constant exchange of water between the lagoon and the ocean. In January 2021, the containment dam of the evapoinfiltration pond of the Sewage Treatment Plant (STP) Lagoa da Conceição ruptured, releasing a large volume of sewage into Lagoa da Conceição. Although this STP evapoinfiltration lagoon is a storage place for already treated sewage effluents, there is a risk of contamination of Lagoa da Conceição by enteric or respiratory pathogens excreted in human feces, which are resistant to the sewage treatment processes applied in conventional STPs. This study aims to monitor human enteric and respiratory viruses present in Lagoa da Conceição after this extravasation event and to determine if there is a tendency of viral reduction based on water recirculation and the resilience of the lagoon. For this purpose, water samples were collected at three points along the edge of Lagoa da Conceição every two weeks during the seven months following the event (February to August/2021). The water samples were concentrated by the organic flocculation method using acidified milk. The presence of infectious enteric and respiratory viruses (*Enterovirus* and *Human mastadenovirus*) in these samples by cell culture, as well as the presence and quantification of genomic copies of enteric (*Hepatovirus A*; *Rotavirus A*; *Human norovirus genogroups I and II*) and respiratory viruses (*Human mastadenovirus* and SARS-CoV-2), by molecular technique (real-time PCR) were investigated. Infectious enteroviruses and human mastadenovirus were detected in 68.7% and 6.25%, respectively, of the analyzed samples. None of the viruses investigated by real-time PCR were detected in the samples. The presence of enteric viruses in the analyzed samples demonstrates the contamination of Lagoa da Conceição by viral pathogens, whose presence was detected even seven months after the occurrence of the sewage overflow in Lagoa da Conceição. The presence of enteroviruses in the samples was more expressive in the months immediately following this event, becoming scarcer after the first four months following the extravasation. This detection dynamics suggest the existence of water renewal systems in Lagoa da Conceição through water recirculation and flow through contact with the sea, reducing the effect of contamination by pathogens present in sanitary effluents. Even with this dynamic, it is necessary to implement a health surveillance system that includes virological analysis so that it is possible to identify contaminating pathogens in a timely manner to prevent the spread of diseases to the population.

**Keywords:** environmental monitoring, enteric and respiratory viruses, brackish lagoon.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Localização da Lagoa da Conceição e da ETE Lagoa da Conceição.. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 2 - Avenida das Rendeiras e ruas perpendiculares a ela momentos após o evento de extravasamento. .... **Erro! Indicador não definido.**17
- Figura 3 - Representação de uma partícula viral de enterovírus**Erro! Indicador não definido.**7
- Figura 4 - Representação de uma partícula viral de mastadenovírus humano .....29
- Figura 5 - Representação de uma partícula viral de norovírus humano ..... **Erro! Indicador não definido.**1
- Figura 6 - Representação de uma partícula viral de rotavírus A**Erro! Indicador não definido.**4
- Figura 7 - Representação de uma partícula viral do vírus da hepatite A..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 8 - Representação de uma partícula viral de SARS-CoV-2.....38
- Figura 9 - Presença de *E. coli* (UFC/100 mL) entre os meses de abril a agosto.....56

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Caracterização dos pontos de coleta avaliados na Lagoa da Conceição. .....	432
Quadro 2 – Iniciadores e sondas utilizados para análise molecular dos vírus de interesse .....	50
Quadro 3 – Detecção de enterovírus nos sete meses subsequentes ao evento de extravasamento.....	58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média dos parâmetros físico-químicos durante o período analisado .....	52
Tabela 2 – Média da temperatura atmosférica e pluviosidade mensais durante o período analisado .....	54
Tabela 3 – Resultado da detecção de <i>E.coli</i> durante o período de Abril a Agosto....	55
Tabela 4 – Concentração de Adenovírus Humano detectado nos primeiros dois meses de análise. ....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A549	Adenocarcinoma de Pulmão Humano
CASAN	Companhia Catarinense de Águas e Saneamento
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
FIOCRUZ	Instituto Oswaldo Cruz
HAV	Hepatite A
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus
IMA-SC	Instituto do Meio Ambiente de Santa Catarina
LIMNOS	Laboratório de Ecologia de Águas Continentais
MEM	Meio essencial mínimo
MHV-3	Coronavírus Murino
MNV	Norovírus Murino
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PSA	Penicilina, Estreptomicina e Anfotericina
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
RD	Rabdomiossarcoma Humano
RT-PCR	Transcriptase reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase
RT-qPCR	Transcriptase reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFP/L	Unidades Formadoras de Placa/Litro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>18</b>
2.1	CONTAMINAÇÃO DE AMBIENTES HÍDRICOS.....	18
2.2	VÍRUS ENTÉRICOS E RESPIRATÓRIOS .....	21
2.2.1	<b>Enterovírus</b> .....	<b>24</b>
2.2.2	<b>Mastadenovírus humanos</b> .....	<b>27</b>
2.2.3	<b>Norovírus Humano</b> .....	<b>29</b>
2.2.4	<b>Rotavírus A</b> .....	<b>32</b>
2.2.5	<b>Vírus da Hepatite A</b> .....	<b>34</b>
2.2.6	<b>SARS-CoV-2</b> .....	<b>36</b>
2.3	METODOLOGIAS PARA CONCENTRAÇÃO E DETECÇÃO VIRAL .....	38
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO .....	42
4.2	COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA .....	42
4.3	MEDIDA DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS .....	43
4.4	ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS .....	44
4.5	MONITORAMENTO VIRAL .....	44
4.5.1	<b>Floculação orgânica utilizando leite acidificado</b> .....	<b>44</b>
4.5.2	<b>Análise de Recuperação Viral</b> .....	<b>45</b>
4.5.3	<b>Avaliação de Infeciosidade Viral</b> .....	<b>46</b>
4.5.4	<b>Ensaio de detecção de enterovírus</b> .....	<b>47</b>
4.5.5	<b>Ensaio de detecção de mastadenovírus humanos</b> .....	<b>48</b>
4.5.6	<b>Determinação do título viral</b> .....	<b>49</b>
4.5.7	<b>Detecção molecular de genomas virais</b> .....	<b>50</b>
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>53</b>
5.1	PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS.....	53
5.2	PADRÃO BACTERIOLÓGICO.....	56

5.3	ANÁLISE DE RECUPERAÇÃO VIRAL .....	58
5.4	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE .....	58
5.5	ENSAIO DE DETECÇÃO DE ENTEROVÍRUS .....	59
5.6	ENSAIO DE DETECÇÃO DE MASTADENOVÍRUS HUMANO .....	60
5.7	PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL.....	60
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
5.8.1	<b>Correlação entre a presença de contaminação viral e bacteriana.....</b>	<b>61</b>
5.8.2	<b>Correlação entre índices de pluviosidade e contaminação bacteriana</b>	<b>62</b>
6	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
7	<b>SUMÁRIO DE RESULTADOS E CONCLUSÃO .....</b>	<b>72</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Lagoa da Conceição constitui uma bacia hidrográfica localizada na porção central-leste da Ilha de Florianópolis. É um ecossistema característico de laguna costeira, separado do oceano por porções de terras e com ligação com o mar através do Canal da Barra. Devido à interação entre a água doce continental e a água salgada oceânica, a Lagoa da Conceição se destaca por sua produtividade e complexidade, representando grande importância ambiental, social e econômica para o município e provendo sustento aos que dependem da atividade turística e pesqueira da região (FONSECA et al., 2000). O uso de seus recursos, no entanto, tem se intensificado nos últimos anos graças ao crescimento desordenado da população (SILVA, 2010a).

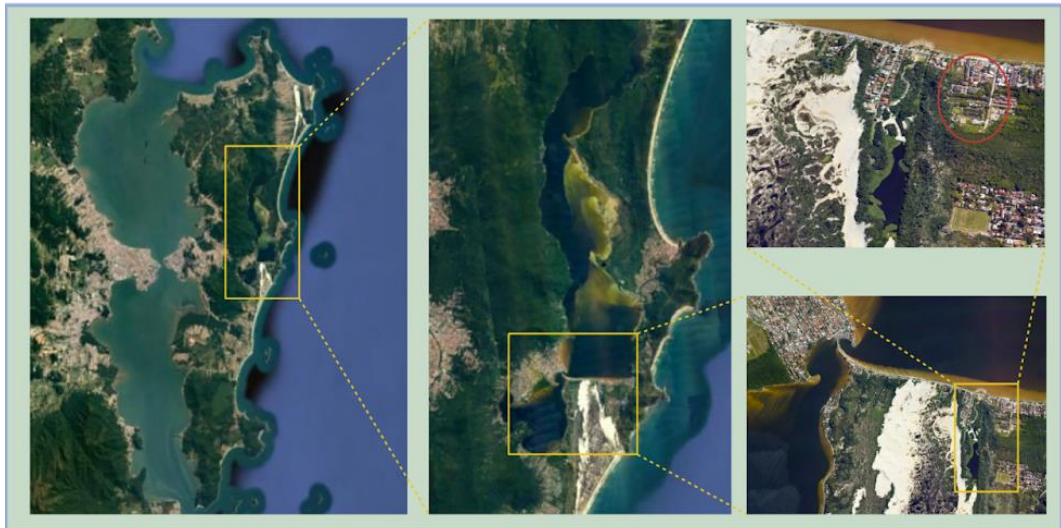
A bacia hidrográfica que compreende a Lagoa da Conceição possui aproximadamente 80 km<sup>2</sup> dispostos em uma faixa alongada no sentido norte-sul, com cerca de 20 km<sup>2</sup> sendo ocupados pelo corpo hídrico (GODOY, 2009). A Lagoa da Conceição é limitada a oeste por morros de baixa estatura com até 500 metros de altitude e a Leste por vegetação de restinga que ocupa a faixa entre a Lagoa da Conceição e o Oceano Atlântico. A profundidade média das águas da Lagoa da Conceição é de 1,7 metros, sendo que cerca de 30% da totalidade do corpo d'água possui profundidade inferior a 1 metro e a área com maior profundidade atinge 8,7 metros. A Lagoa da Conceição possui cerca de 35 afluentes de água doce, sendo o Rio João Gualberto Soares o principal (SILVA, 2010a).

Por ter ligação com o mar, a Lagoa da Conceição representa um ecossistema dinâmico, cujas características são definidas pela constante troca de água entre a laguna e o oceano. Essa capacidade de renovação está intimamente relacionada com a saída do material orgânico acumulado na lagoa e, conseqüentemente, com a qualidade da água. Com o adensamento populacional observado na região do entorno da lagoa nos últimos anos, é possível que a quantidade de dejetos e resíduos que estão sendo despejados em suas águas supere sua capacidade de renovação. A deterioração desse ambiente irá prejudicar não somente a comunidade que depende da lagoa como fonte de renda, mas também os organismos presentes nesse bioma (SOUZA JÚNIOR, 2021).

Localizada na margem sudeste da lagoa está a Estação de Tratamento de Esgoto Lagoa da Conceição, que atualmente atende cerca de 16.500 moradores. Os

efluentes coletados por esta unidade são direcionados a tanques de aeração, onde a presença de oxigênio dissolvido, em associação com a agitação mecânica e a ação de microrganismos, irão levar a formação de flocos. Com a sedimentação destes flocos há a formação do lodo ativado, que é direcionado a um tratamento específico. Após o tratamento destes efluentes, estes são depositados em uma lagoa de evapoinfiltração localizada a 350 metros da Lagoa da Conceição. Dada a proximidade da área de descarte de esgoto tratado e da lagoa, bem como a superficialidade do lençol freático da região, há o risco de transmissão de contaminantes tanto para a Lagoa da Conceição, quanto para águas subterrâneas (SANTOS, 2018).

Figura 1 - Localização da Lagoa da Conceição e da ETE Lagoa da Conceição



Fonte: Google Earth

Dia 25 de janeiro de 2021, o talude de areia que sustentava a lagoa de evapoinfiltração, destino dos efluentes após o tratamento, se rompeu, causando inundação da área e liberando um imenso volume de água residuária para o interior da laguna. Apesar do líquido extravasado ser proveniente do esgoto já tratado, ele pode conter patógenos residuais que resistiram ao tratamento, além de altíssimas concentrações de matéria orgânica (ZANATTA, 2014). A abrupta deposição de um grande volume de efluentes com potencial para presença de contaminantes biológicos e químicos em uma lagoa que já sofria processo de eutrofização contribuiu para o decaimento de sua qualidade e oferece riscos à população que utiliza esse recurso (BOTÂNICA, 2021). A Figura 2 traz retratos dos momentos que sucederam ao



rompimento da barragem e extravasamento de seu conteúdo para a Lagoa da Conceição.

Figura 2 - Avenida das Rendeiras e ruas perpendiculares a ela momentos após o evento de extravasamento



Fonte: Grupo Conexão

Análises microbiológicas da qualidade da água da Lagoa da Conceição após o evento de extravasamento ocorrido são imprescindíveis para averiguar a possível presença de patógenos entéricos e respiratórios. É preciso determinar a incidência desses microrganismos nesse ambiente, bem como compreender seu comportamento, risco de infecção e averiguar se os modelos de tratamento de dejetos rotineiros estão sendo eficientes. A proposta deste estudo é realizar o monitoramento da presença de vírus entéricos e respiratórios humanos na Lagoa da Conceição após o extravasamento de efluente sanitário. Devido à conectividade com o oceano e a ausência de ações de mitigação do risco sanitário, especula-se que ocorra a tendência de redução da contaminação resultante exclusivamente da troca de água e da resiliência da lagoa.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 CONTAMINAÇÃO DE AMBIENTES HÍDRICOS

Devido a questões históricas relacionadas à ocupação territorial, aproximadamente 50% da população mundial reside na região litorânea (KORAJKIC et al., 2018). No Brasil são 50,7 milhões de cidadãos localizados na área costeira do país, representando mais de 25% da população total brasileira (IBGE, 2011). Na região litorânea estão presentes importantes atividades de diversos setores econômicos, como pesca, turismo, extração de petróleo e gás natural, além de serviços gerais relacionados à manutenção da população que reside nesta área (IBGE, 2011). O grande adensamento populacional concentrado no litoral do país gera impactos para este ambiente, principalmente relacionado com o descarte de grandes volumes de efluentes sanitários tratados e, em grande proporção, não tratados, em corpos hídricos. Em relação às regiões da federação, enquanto a região Sudeste possui 96,5% dos municípios assistidos por rede coletora de esgoto, na região Nordeste este valor cai para 52,7%, na região Sul 44,6% e a região Norte apenas 16,2% de cobertura (IBGE, 2017).

Ambientes de lagunas costeiras são ecossistemas extremamente produtivos, tanto no âmbito econômico quanto ecológico, porém que sofrem com intensa ação antrópica devido a sua localização próxima ao litoral (NEWTON et al., 2014). Graças a urbanização e ao adensamento populacional, os cidadãos se voltam para as lagunas costeiras para atividades turísticas, recreativas e econômicas (SCHERNEWSKI et al., 2017). Como consequência dessa ocupação em torno das lagunas costeiras, estes ambientes acabam sendo alvo de descarte inapropriado de efluentes sanitários, o que acaba aumentando a concentração de matéria orgânica e microrganismos que estão presentes no esgoto, no interior da laguna (KATARZYTE et al., 2018).

Além da grande parcela de resíduos sanitários que não são coletados e acabam sendo diretamente descartados no ambiente, estes dejetos que acabam sendo coletados também são descartados em corpos de água após o tratamento (HENDRICKS E POOL, 2012). No entanto, os métodos de tratamento comumente aplicados em ETEs podem ser ineficientes na completa remoção dos patógenos presentes (SIDHU et al., 2017). A falta de infraestrutura sanitária que garanta que

estas águas residuais não estejam contaminando o ambiente, aliada à baixa cobertura do sistema de coleta e tratamento de esgoto, acabam inserindo patógenos em recursos hídricos com que a população posteriormente entrará em contato direta ou indiretamente (SINCLAIR et al., 2009; FONG et al., 2010).

Os efeitos da contaminação microbiana são intensificados quando esta ocorre em um ambiente de laguna, quando comparado com o oceano. Estes corpos hídricos continentais possuem características ambientais específicas que aumentam o risco potencial de exposição à poluentes, como a alta turbidez, a baixa profundidade, a grande concentração de matéria orgânica e a reduzida diluição dos contaminantes (KATARZYTE et al., 2018). Sabe-se que a turbidez e a alta concentração de matéria orgânica favorecem a resistência de coliformes fecais (KATARZYTE et al., 2018; PERKINS et al., 2016). A turbidez, advinda da presença de altas concentrações de partículas suspensas, também propicia a persistência de vírus, principalmente entéricos, nestes ambientes, já que possuem a tendência a se agregarem em partículas sólidas para evitar fatores inativantes (HEJKAL et al., 1981).

A Lagoa da Conceição se caracteriza como um ambiente de laguna devido a sua localização costeira, baixa profundidade das águas e conexão limitada com o mar através do Canal da Barra (WINGE et al., 2022). Devido ao contato entre água doce continental e água salina oceânica, a Lagoa da Conceição possui teor de salinidade que a classifica como sendo uma laguna de águas salobras, com salinidade entre 0,5 e 30 partes por mil. Os corpos de água salobra, por sua vez, ainda podem ser classificados entre quatro diferentes classes, dependendo da função e do uso desses ambientes aquáticos. As águas salobras pertencentes a Classe I são destinadas a atividades recreativas de contato primário, atividades pesqueiras, abastecimento para consumo humano e irrigação de hortaliças. Corpos hídricos da Classe II são utilizados para atividades recreativas de contato secundário e atividades pesqueiras de caráter amador. Águas da Classe III são utilizadas exclusivamente para navegação e paisagismo e, por fim, a última classe, caracterizada como "Classe Especial", contém ambientes aquáticos mantidos sob unidades de conservação de proteção integral, não sendo permitido o uso para atividades recreativas ou pesqueiras (CONAMA, 2005).

Devido a atividade pesqueira e recreativa desenvolvida na Lagoa da Conceição, com práticas esportivas que exigem o contato direto com as águas desta laguna, como natação e mergulho, a Lagoa da Conceição é classificada como laguna

salobra de Classe I. Os padrões de balneabilidade exigidos para esta classe de águas salobras estabelecem faixas de valores de parâmetros físico-químicos, bem como a presença de substâncias orgânicas e inorgânicas, considerados aceitáveis. Alguns dos parâmetros exigidos pelo CONAMA para avaliação do padrão de qualidade da água para lagunas salobras de Classe I são pH entre 6,5 e 8,5, oxigênio dissolvido superior a 5 mg/L, ausência de óleos, graxas, materiais flutuantes, substâncias que produzem cor, odor e turbidez e resíduos sólidos, e presença de até 250 UFC/100 mL de coliformes termotolerantes (CONAMA, 2005).

Apesar de já serem bem discutidos os potenciais riscos relacionados à contaminação de corpos hídricos por microrganismos presentes no esgoto, a legislação referente à balneabilidade desses ambientes aquáticos necessita de melhorias. O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), responsável por aconselhar o governo federal no que diz respeito às ações que envolvem a integridade ambiental do país, sugere a verificação do padrão de qualidade da água apenas visando parâmetros físico-químicos e presença de bactérias termotolerantes (CONAMA, 2000). A legislação em vigência, que trata sobre a questão da balneabilidade no Brasil, é a Resolução nº 274 de 2000. Mesmo ocorridas modificações, representadas pelas resoluções nº 357 (2005), nº 393 (2007), nº 397 (2008), nº 410 (2009) e nº 430 (2011), não houve mudanças no que diz respeito à análise microbiológica da água (CONAMA, 2000; CONAMA, 2005; CONAMA, 2007; CONAMA, 2008; CONAMA, 2009; CONAMA, 2011).

Apesar de terem sido selecionados como agentes indicadores de contaminação fecal, o padrão bacteriológico não é eficiente em determinar se há presença de contaminação viral, já que não parece haver correlação entre infecção bacteriana e viral em corpos d'água (FORMIGA-CRUZ et al., 2005; SINCLAIR et al., 2009). Inclusive, são diversos os casos de surtos de doenças virais relacionados ao contato ou consumo de água que estava em conformidade com o padrão bacteriológico (BROOKS et al., 2005; RIGOTTO et al., 2010). Comparando com os indicadores bacterianos utilizados atualmente para avaliar a qualidade da água, as partículas virais são, no geral, mais resistentes a processos de filtração e cloração, usualmente utilizados em ETEs (WHO, 2011). A resistência a variações de pH e temperatura também contribui para que permaneçam infecciosos por até 120 dias em

água doce e 130 em água marinha, superando o tempo em que os coliformes permanecem viáveis (KOCWA-HALUCH, 2001).

Em julho de 2021, a Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou um guia com sugestões para análise do padrão da qualidade de águas utilizadas para fins recreativos. Neste documento é reconhecida a grande prevalência de agentes virais em surtos de doenças relacionadas ao contato com águas recreativas. Nesse sentido, a OMS sugere a avaliação da presença de vírus como mastadenovírus humanos, enterovírus e reovírus, já que são grupos que facilmente se replicam na cultura celular (WHO, 2021).

Os vírus presentes em efluentes sanitários são principalmente aqueles excretados nas fezes de indivíduos infectados sintomáticos ou assintomáticos. Além do Brasil ainda ter uma parcela significativa de municípios que não são atendidos pelos sistemas de coleta e tratamento de esgoto, muitos dos vírus excretados em fezes de indivíduos acometidos são resistentes aos processos de tratamento convencionais que são utilizados em ETEs (BOSCH et al., 2008). Nesse sentido, através do descarte de esgoto tratado ou não-tratado no ambiente, estes vírus podem vir a contaminar o ambiente marinho, águas continentais como rios e lagoas de água doce ou salobra, água subterrânea, entre outros recursos hídricos (SINCLAIR et al., 2009).

## 2.2 VÍRUS ENTÉRICOS E RESPIRATÓRIOS

Os vírus entéricos são patógenos pertencentes a diferentes famílias de vírus, agrupados devido ao fato que se replicam principalmente no trato gastrointestinal do hospedeiro, sendo transmitidos através da via fecal-oral (FONG E LIPP, 2005). São excretados em altas concentrações nas fezes de indivíduos infectados sintomáticos ou assintomáticos ( $10^{11}$  partículas virais por grama de fezes) (BOSCH, 2008). Estes patógenos podem ser encontrados naturalmente em ambientes aquáticos, porém comumente atingem estes locais devido à atividades humanas, como vazamento ou descarte inapropriado de esgotos e sistemas sépticos, através do escoamento agrícola e urbano e a descarga de águas residuais de embarcações. O contato de efluentes sanitários com recursos hídricos através do descarte inapropriado ou da infiltração pelo solo é o principal causador da contaminação ambiental por vírus

entéricos (FONG E LIPP, 2005). Alguns dos principais integrantes deste grupo são os norovírus, rotavírus, enterovírus, vírus da hepatite A e mastadenovírus humanos (BOSCH, 1998).

Embora os sintomas das infecções por vírus entéricos normalmente se limitem a diarreias e gastroenterites restritas à humanos, eles também podem causar infecções respiratórias, conjuntivites, hepatites e doenças com altas taxas de mortalidade como meningite asséptica, encefalite e paralisia em indivíduos imunocomprometidos (BOSCH, 1998). Alguns gêneros de vírus entéricos como *Rotavirus*, *Astrovirus* e *Norovirus* possuem potencial zoonótico, podendo ser compartilhados entre populações humanas e animais, mas a maioria dos vírus entéricos possui transmissão intraespecífica (TAYLOR et al., 2001; MARTELLA et al., 2010; DE BENEDICTIS et al., 2011; IBRAHIM et al., 2022).

Como os vírus entéricos não são capazes de se replicar fora de uma célula hospedeira, a remoção eficiente destes patógenos em estações de tratamento de efluentes sanitários contribui de forma significativa evitando a disseminação destes agentes infecciosos. Interrompendo a via de transmissão através do tratamento eficiente de efluentes, é possível evitar a contaminação de diversas rotas ambientais, como pela ingestão de água potável, contato com águas recreacionais ou consumo de bivalves filtradores (SANO et al., 2016).

A completa remoção destes patógenos dos efluentes sanitários, no entanto, é uma tarefa difícil de se atingir. Além de serem excretados em altas concentrações nas fezes de indivíduos infectados, os vírus entéricos resistem a grandes variações de condições ambientais, bem como aos processos rotineiros de tratamento aplicados (HARAMOTO et al., 2018). Tratamentos de desinfecção utilizando filtração, cloração, radiação UV e ozonização não apresentam completa eficácia na remoção de vírus entéricos de resíduos sanitários devido às características físico-químicas das partículas virais (WHO, 2011). Considerando que menos de 10 partículas virais são suficientes para causar infecções, os vírus entéricos acabam se tornando uma preocupação no que diz respeito à saúde pública e ao uso da água (KIRBY et al., 2015; THEBAULT et al., 2013).

Além de sua presença indesejada nos recursos hídricos, os vírus entéricos possuem a tendência a se acumular no sedimento, tornando o fundo de rios e lagoas uma potencial fonte de partículas infecciosas (MACKOWIAK et al., 2018; SKRABER

et al., 2009). Os sedimentos agem como reservatório destes vírus, protegendo-os de fatores inativantes, como enzimas e radiação UV (GANTZER et al., 1998), e aumentando sua persistência inclusive enquanto são ressuspensos na coluna d'água por fenômenos naturais ou artificiais (ELMAHDY et al., 2016; RZEŻUTKA E COOK, 2004). A resistência dos vírus entéricos quando aderidos a partículas sólidas pode atingir meses, fazendo com que consigam percorrer longas distâncias no ambiente aquático sem perder a viabilidade (RAO et al., 1986).

Apesar de subnotificados, os vírus entéricos têm sido reconhecidos como agentes causadores de muitos casos de gastroenterites não bacterianas, sendo isolados e relacionados a surtos originados de fontes de água potável, águas recreacionais, águas subterrâneas, rios urbanos e mariscos recolhidos de águas contaminadas (BOSCH, 1998; FONGARO et al., 2015; LE GUYADER et al., 2008; SINCLAIR et al., 2009). A grande resistência às condições ambientais desfavoráveis e aos tratamentos rotineiros aplicados em ETEs, a pequena dose infecciosa e a alta concentração com que são excretados nas fezes torna os vírus entéricos patógenos de importância no que diz respeito à qualidade da água e saúde da população (FONG E LIPP, 2005; SINCLAIR et al., 2009).

A avaliação da presença de vírus respiratórios no âmbito da contaminação ambiental é importante devido à existência de patógenos como os mastadenovírus humanos e os coronavírus que, apesar de possuírem tropismo pelo sistema respiratório, também são encontrados nas fezes de indivíduos infectados. O gênero *Mastadenovirus humano* contém vírus que possuem tropismo entérico, respiratório e ocular, cuja transmissão ocorre através do contato com fezes, urina ou gotículas respiratórias de indivíduos infectados. Apesar de também acometer o sistema respiratório, causando infecções em brônquios, faringe e pulmões, os *Mastadenovirus humanos* são excretados nas fezes, gerando preocupações quanto à contaminação ambiental.

De forma semelhante aos *Mastadenovirus humanos*, o vírus causador da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 que teve início no final de 2019 e que, em novembro de 2022, já acometeu quase 650 milhões de indivíduos em todo o mundo, também é um vírus respiratório cuja presença é detectada nas fezes de pacientes acometidos pela doença. De forma contrária ao *Mastadenovirus humano*, no entanto, a transmissão de SARS-CoV-2 parece ocorrer exclusivamente através do contato

interpessoal e com gotículas respiratórias, não havendo confirmações de casos cujo contágio ocorreu por meio da rota fecal-oral.

O evento de extravasamento ocorrido na Lagoa da Conceição no início do ano de 2021 gera preocupações quando a contaminação deste ambiente por vírus entéricos e respiratórios justamente pelas propriedades destes patógenos. A baixa dose infecciosa, a alta taxa com que são excretados por indivíduos infectados, a tendência a se agregarem a partículas sólidas para proteção, a alta resistência à variações de condições ambientais e à tratamentos aplicados rotineiramente em ETEs são características deste grupo de vírus que faz com que se tornem um risco para a qualidade sanitária da Lagoa da Conceição

### **2.2.1 Enterovírus**

Os *Enterovirus* são um gênero viral pertencente à família *Picornaviridae*, composto por 15 espécies com cerca de 175 sorotipos diferentes. O gênero é subdividido entre as espécies de *Enterovirus A-L*, que são transmitidos através da rota fecal-oral, e os *Rhinovirus A-C*, classificados como vírus respiratórios (ICTV, 2021). O grupo dos enterovírus foi criado para abrigar uma nova classe de vírus encontrados em fezes humanas que causavam lesões no Sistema Nervoso Central (SNC), os poliovírus (MELNICK, 1993). A poliomielite, doença causada pela infecção por poliovírus, foi inicialmente descrita por Michael Underwood ainda em 1789. Anos depois, já em 1843, ocorre a primeira epidemia de poliomielite nos Estados Unidos, que é seguida de diversos casos isolados até o início dos século XX, onde as condições de higiene e saneamento sofrem uma melhora considerável (TULCHINSKY, 2018).

As primeiras tentativas de isolamento e caracterização dos poliovírus tiveram início em 1908, quando pesquisadores como Landsteiner e Flexner buscaram compreender a forma como ocorria a transmissão deste então desconhecido patógeno causador de lesões no SNC. Através de experimentos onde macacos eram infectados com poliovírus, Landsteiner e Flexner chegaram, de forma paralela, à conclusão que se tratava de um vírus respiratório, adquirido através da via nasal e que migrava diretamente para o SNC (MELNICK, 1993).



Já em 1932, Paul e Task encontraram uma alta carga viral referente à presença de poliovírus em fezes de indivíduos infectados, o que passou a levantar suspeitas sobre a rota de transmissão ser possivelmente fecal-oral. Anos depois, sob a árdua tarefa de classificar este patógeno, o Comitê Internacional de Nomenclatura decidiu, baseado nas similaridades químicas e físicas, na resistência ao éter e no comportamento similar ao de outros vírus transmitidos através da rota fecal-oral, que os poliovírus se tratavam de vírus entéricos. Dessa forma, o gênero *Enterovirus* foi criado como uma subcategoria dentro da família *Picornaviridae* (MELNICK, 1993).

Já em 1949, John Enders é bem sucedido em replicar pela primeira vez poliovírus em cultura de tecidos, o que possibilitou o desenvolvimento de vacinas com o vírus inativado, como a Vacina Inativada de Poliomielite por Jonas Salk em 1950. No ano seguinte, Salk evidencia a existência de 3 cepas distintas de poliovírus, produzindo uma vacina eficiente contra os diferentes sorotipos do vírus (TULCHINSKY, 2018).

Os coxsackievírus, também pertencentes ao gênero *Enterovirus*, foram primeiramente isolados em 1947 por Gilbert Dalldorf em fezes de crianças com sintomas semelhantes à poliomielite (TRACY et al., 2013; CDC, 2012). Utilizando ratos como modelo animal, Dalldorf evidenciou que o vírus não era neutralizado ao aplicar anticorpos específicos para poliomielite, determinando então que se tratava de uma nova espécie. Ainda trabalhando com camundongos recém-nascidos, Dalldorf foi capaz de distinguir duas categorias de coxsackievírus, baseado na velocidade com que estes diferentes grupos virais levavam ao desenvolvimento de sintomas. O grupo que causava paralisia fatal em menos de 24 horas foi categorizado como pertencentes a espécie *Coxsackievirus A*, enquanto que o grupo que possuía uma lenta evolução da patologia, foi classificado como *Coxsackievirus B* (DALLDORF E SICKLES, 1948).

Assim como os coxsackievírus, os echovírus foram acidentalmente isolados durante a tentativa de diagnosticar indivíduos com suspeita de poliomielite (CHOUDHARY, 2019). Apesar de apresentarem efeito citopático característico ao serem inoculados em cultura de tecidos, infecções por echovirus não demonstram lesões patológicas visíveis (CHOUDHARY, 2019). Devido ao conjunto de características que se conhecia em relação a estes vírus, eles foram nomeados com base no acrônimo ECHO, simbolizando que são vírus entéricos, citopatogênicos,

humanos e órfãos, já que não se sabia a que padrão de doença estavam associados (HYYPIA E HARVALA, 2015).

Após a realização de estudos sobre a propagação viral e isolamento em cultura de tecidos, os echovírus foram categorizados como pertencentes ao mesmo gênero que continha os poliovírus e coxsackievírus. Essas espécies foram então agrupadas dentro do gênero *Enterovírus* devido a semelhanças em suas propriedades físico-químicas, como resistência a solventes orgânicos e baixos valores de pH (HYYPIA and HARVALA, 2015).

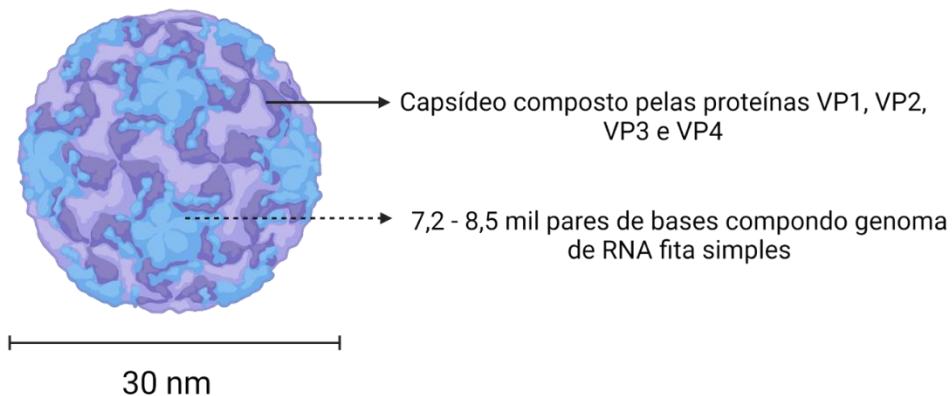
Anos depois, alterações na metodologia de nomenclatura dos enterovírus realizadas pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV) determinaram que as novas espécies e sorotipos isolados fossem nomeados utilizando o gênero seguido de um número e que as espécies já existentes fossem distribuídas entre 12 espécies de enterovírus nomeadas *Enterovírus A-L* (ZELL et al., 2017). Por fim, o sequenciamento de espécies de rhinovirus evidenciou que se tratam de espécies pertencentes ao gênero *Enterovírus* e não componentes de um gênero exclusivo como se pensava anteriormente (KING et al., 2011; PALMENBERG E GERN, 2015).

Os enterovírus possuem partícula viral não-envelopada, com capsídeo icosaédrico de aproximadamente 30 nm composto por 60 subunidades formadas por 4 proteínas estruturais diferentes e genoma composto por fita simples de RNA linear com aproximadamente 7.200 - 8.500 pares de base (HARVALA et al., 2018; CASAS et al., 2001). Os enterovírus comumente estão relacionados a patologias que afetam os humanos, possuindo uma alta taxa de mortalidade em crianças de até um ano (PALACIOS et al., 2005). Devido às diferentes manifestações clínicas que podem surgir em relação à infecções por enterovírus, os sintomas podem variar desde a uma leve gripe até doenças diarreicas ou paralisia (MUEHLENBACHS et al. 2015).

A transmissão de enterovírus ocorre através da rota fecal-oral ou respiratória, sendo portanto relacionado com situações de higiene e saneamento precários (MUEHLENBACHS et al. 2015). Poliovírus, coxsackievírus e echovírus são exemplos de enterovírus transmitidos através de água e alimentos contaminados, sendo excretados em altas concentrações nas fezes de indivíduos infectados e resistindo à condições ambientais desfavoráveis, como alterações de pH, temperatura e salinidade, e processos de desinfecção (FONG E LIPP, 2005).

Apesar de serem inúmeros os casos de enterovírus presentes em amostras ambientais, a legislação brasileira ainda não indica como obrigatória a avaliação da presença destes patógenos para determinação do padrão de qualidade da água. Os enterovírus já foram isolados de águas residuais, rios, água marinha, poços, água subterrânea, água potável e águas recreacionais, além de alimentos cultivados utilizando águas contaminadas (PIANETTI et al., 2000; BORCHARDT et al., 2003; COSTÁN-LONGARES et al., 2008; CESARI et al., 2010; OKOH et al., 2010; STEELE E ODUMERU, 2004).

Figura 3 - Representação de uma partícula viral de enterovírus



Fonte: A autora

### 2.2.2 Mastadenovírus humanos

*Mastadenovírus* é um gênero de vírus da família *Adenoviridae* que contém cerca de 50 espécies responsáveis por infectar mamíferos. Dentre as espécies contidas neste gênero, sete infectam humanos: *Mastadenovirus humano A - G* (ICTV, 2021). Foram primeiramente isolados a partir de amostras de glândulas adenóides removidas cirurgicamente de 53 crianças por Rowe e seus colegas (1953) em Washington, DC (ROWE et al., 1958; WADELL, 1999). Simultaneamente, Hilleman e Werner (1954), na tentativa de determinar qual o patógeno causador de epidemias semelhantes à influenza nas forças armadas durante a segunda guerra mundial, acabaram isolando um vírus que logo determinou-se ser o mesmo isolado por Rowe (GINSBERG, 2013). Devido ao seu isolamento a partir de cultura celular de

adenóides, o agente causador do efeito citopático nestas células foi nomeado como adenovírus humano (WADELL, 1999). Posteriormente, adaptações na nomenclatura renomearam as espécies contidas no gênero *Mastadenovirus*, fazendo com que os adenovírus humanos passassem a ser tratados como pertencentes às espécies *Mastadenovirus humano A - G*.

Os vírions de mastadenovírus são icosaédricos, não-envelopados, com cerca de 80 nm de diâmetro e compostos por pelo menos 10 polipeptídeos estruturais distintos. O mastadenovírus humano é o único grupo pertencente aos vírus entéricos que possuem genoma composto por DNA ao invés de RNA, sendo este caracterizado como linear dupla-fita, contendo 33.000 - 45.000 pares de base (WADELL, 1999; JIANG et al., 2001). As diferentes espécies de mastadenovírus humanos possuem variados tropismos, que se relacionam com as manifestações clínicas. Geralmente se replicam no trato gastrointestinal, no sistema respiratório ou no ocular, podendo ser adquirido através da rota fecal-oral ou respiratória e excretado através das fezes, urina e gotículas respiratórias (METCALF et al., 1995; JIANG et al., 2001; MENNECHET et al., 2019).

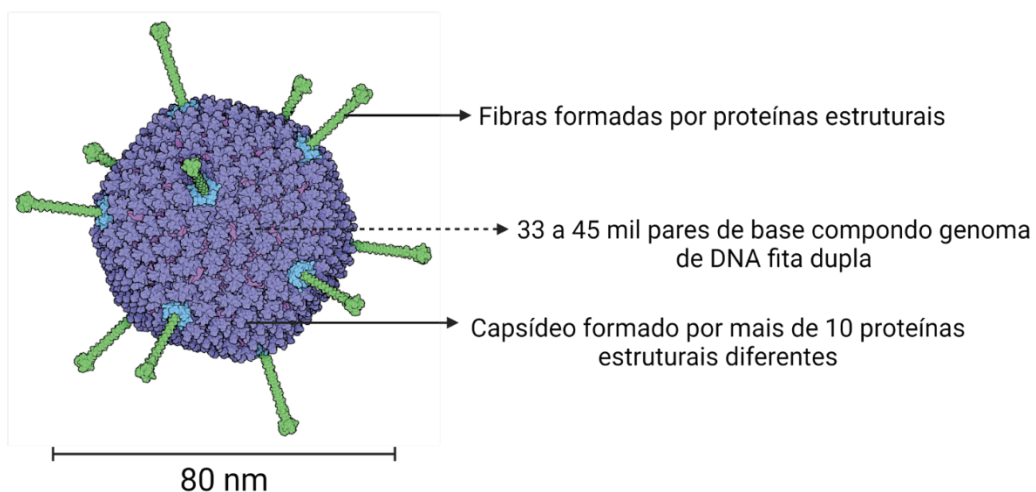
Doenças relacionadas com infecções por mastadenovírus humanos incluem infecções no trato respiratório superior e inferior, causando faringite, bronquite e pneumonia, além de conjuntivite, cistite e gastroenterites (MENA E GERBA, 2008). Os mastadenovírus humanos são o segundo maior causador de gastroenterites em crianças em todo o mundo, perdendo apenas para os rotavírus (JIANG et al., 2001; FONGARO et al., 2013). Estima-se que sejam os patógenos responsáveis por 6 a 20% das crianças hospitalizadas com infecções no trato respiratório inferior (CEBEY-LÓPEZ et al., 2015; ESPOSITO et al., 2016) e por 10 a 23% das crianças hospitalizadas com gastroenterites agudas (FISCHER et al., 2011; FLETCHER et al., 2015; LIU et al., 2015).

Os mastadenovírus são capazes de permanecerem viáveis em pH baixo e sob ação de enzimas proteolíticas, fazendo com que atinjam altos títulos virais no trato gastrointestinal (WADELL, 1999). Ao serem excretados nas fezes, estes vírus se tornam alvo de preocupação em relação à saúde pública, pois apesar de serem suscetíveis à desinfecção por adição de cloro, são frequentemente detectados em águas tratadas (THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2003). Além de resistir ao procedimento de desinfecção padrão aplicado em estações de tratamento, os

mastadenovírus humanos apresentam resistência à irradiação por UV (THOMPSON et al., 2003).

Devido à sua resistência às condições ambientais desfavoráveis, mastadenovírus humanos podem ser detectados tanto em águas tratadas como não-tratadas e geralmente em altas concentrações, sendo o vírus entérico que melhor se enquadra na função de biomarcadores de contaminações ambientais e de padrão de potabilidade da água (JIANG et al., 2001; SILVA et al., 2010b). A detecção desses vírus no ambiente pode ser determinada exclusivamente através de técnicas moleculares, ou em associação com avaliação em cultura celular, que possui a vantagem de determinar se estes vírus ainda são viáveis e possuem a capacidade de infectar células permissivas (HERZOG et al., 2008; SILVA et al., 2011).

Figura 4 - Representação de uma partícula viral de mastadenovírus humano



Fonte: A autora

### 2.2.3 Norovírus Humano

*Norovirus* é um dos onze gêneros pertencentes à família *Caliciviridae*, sendo que cada gênero abrange cerca de 1 a 2 espécies. O gênero *Norovirus* abrange uma única espécie, anteriormente chamada de "Norwalk vírus", que conta com cerca de seis genogrupos, cada um subdividido entre mais de trinta genotipos. Os norovírus dos genogrupos GI, GII e GIV são os responsáveis por infectar humanos, sendo que os outros gêneros da família *Caliciviridae* são capazes de infectar uma grande

variedade de mamíferos, além de peixes, aves, cobras e anfíbios (DE GRAAF et al., 2016; VINJÉ et al., 2019).

Este gênero foi primeiramente descrito após o estudo de dois surtos de gastroenterite ocorridos em Norwalk e Columbus, Ohio, no ano de 1968. Ambas as epidemias tiveram início em escolas, afetando em um primeiro momento os estudantes e funcionários, e depois passando também a infectar os familiares destes indivíduos. Os principais sintomas vivenciados nestes surtos foram vômito, diarreia, náusea e dores abdominais (ADLER E ZICKL, 1969).

Após testarem os alimentos distribuídos nas cafeterias, a água consumida pelo corpo docente e discente, bem como amostras de fezes e swabs retais e de garganta de indivíduos acometidos pela doença, averiguou-se que não se tratava de infecção por *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* enteropatogênica, *Staphylococcus aureus* ou *aeromonas*. A análise das amostras fecais também não detectou a presença de parasitas intestinais. Ao determinar que não se tratava de uma gastroenterite bacteriana ou parasitária, suspeitou-se que os surtos ocorridos no ano de 1968 poderiam ter como origem um agente viral. Muitos pesquisadores envolvidos com casos de gastroenterites não-bacterianas buscaram identificar o patógeno causador dos surtos ocorridos em Ohio, porém avanços relevantes só foram atingidos em 1972, por Albert Kapikian e sua equipe (ADLER E ZICKL, 1969; KAPIKIAN et al., 1972).

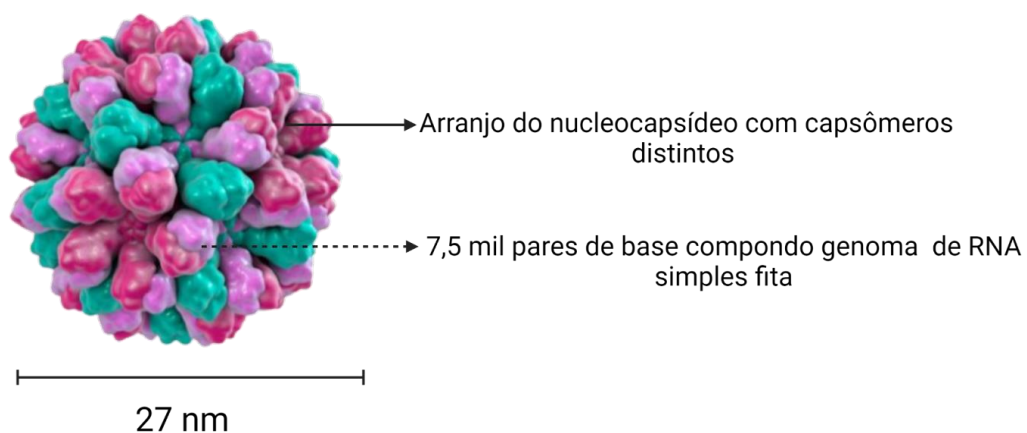
Albert infectou indivíduos com um filtrado do swab retal coletado de um dos acometidos pelo surto em Norwalk, em 1968. Estes indivíduos desenvolveram sintomas semelhantes ao dos pacientes, levando à conclusão que se tratava de um agente infeccioso filtrável, com menos de 36 nm e resistente à desinfecção por éter, ácido e altas temperaturas (DOLIN et al., 1972). Os filtrados de amostras fecais coletadas ainda em 1968, durante o surto, bem como destes indivíduos infectados pelo filtrado de swab retal, foram analisados através de microscopia imunoelétrica, método utilizado na época para visualização de vírus (KAPIKIAN et al., 1972).

Após estas e outras análises, envolvendo principalmente sorologia e detecção de anticorpos específicos para este agente viral, o pesquisador determinou que este vírus seria o agente causador dos surtos de gastroenterites ocorridos em Ohio em 1968. Devido à origem das amostras, este recém descrito vírus foi nomeado de acordo com a cidade Norwalk, passando então a ser denominado como Norwalk vírus (KAPIKIAN et al., 1972).

Norovírus humano é, portanto, um vírus entérico, transmitido pela via fecal-oral, através do consumo de água e alimentos contaminados ou contato com indivíduos infectados (LYSÉN et al., 2009). A transmissão através de alimentos contaminados é particularmente importante quando relacionada ao grupo dos norovírus pois estes patógenos já foram identificados em tecidos de mariscos cultivados em áreas costeiras que sofrem com o descarte inapropriado de dejetos sanitários, bem como em frutas irrigadas com água contaminada (LE GUYANDER et al., 2012). Apesar de não apresentar graves riscos à indivíduos saudáveis, os norovírus podem causar complicações severas em imunocomprometidos, bem como em idosos e crianças (TRIVEDI et al., 2013).

O genoma do norovírus humano é composto por RNA simples fita, com aproximadamente 7.500 pares de base. Como os outros vírus entéricos, o vírion é não-envelopado e possui cerca de 27 nm de diâmetro. O nucleocapsídeo possui simetria icosaédrica, com capsômeros com características distintas, permitindo a visualização de seu arranjo (MORILLO et al., 2011). São vírus extremamente resistentes à condições ambientais desfavoráveis, permanecendo viáveis por até 120 dias em temperaturas baixas e mantendo seu capsídeo estruturado e sem nenhum dano quando submetido a tratamentos com cloro, temperaturas elevadas e variações de pH (AUSAR et al., 2006; KESWICK et al., 1985; RICHARDS et al., 2012).

Figura 5 - Representação de uma partícula viral de norovírus humano



Fonte: A autora

#### 2.2.4 Rotavírus A

A família *Reoviridae* abriga gêneros de vírus que possuem capsídeo icosaédrico, porém apresentam partículas virais com formato esférico. Contém 15 gêneros subdivididos entre 2 subfamílias: *Spinareovirinae*, que abriga os gêneros que possuem espículas ou apêndices nos 12 vértices do icosaedro, e *Sedoreovirinae*, onde estão os gêneros que não possuem projeções em suas superfícies, dando-lhes a aparência de serem completamente esféricos, como os rotavírus (KING et al., 2011). *Rotavirus* é, portanto, um dos seis gêneros contidos na subfamília *Sedoreovirinae*.

O gênero *Rotavirus* abriga dez espécies (*Rotavirus A-J*) classificadas de acordo com diferenças em seus genomas (CRAWFORD et al., 2017). Dentre as espécies existentes de rotavírus, o grupo *Rotavírus A*, *Rotavírus B*, *Rotavírus C* e *Rotavírus H* infectam humanos, sendo o *Rotavírus A*, o principal causador de gastroenterites diarreicas em crianças, também capaz de infectar outros mamíferos e as aves (KING et al., 2011).

Os rotavírus foram identificados como agentes causadores de grande proporção dos casos de doenças diarreicas que acometem principalmente crianças por Ruth Bishop e seus colegas no ano de 1973. Realizando microscopia eletrônica, o grupo evidenciou a presença de um vírus circular presente em secções de muco intestinal de crianças com gastroenterite aguda (BISHOP et al., 1973). Estas partículas apresentavam-se em grandes concentrações, atingindo cerca de  $10^{10}$  partículas virais por mL de fezes diarreicas e possuíam cerca de 70 nm de diâmetro (BISHOP et al., 1974). Este vírus até então desconhecido chegou a ser comparado com o agente isolado de fezes de adultos descrito por Kapikian no mesmo ano, posteriormente nomeado em homenagem à cidade onde ocorreu o primeiro surto: Norwalk vírus (norovírus). Verificou-se, no entanto, que o norovírus não se assemelhava com o patógeno isolado de fezes de crianças por Bishop (KAPIKIAN et al., 1972).

Este desconhecido agente viral identificado por Bishop permaneceu sem nome, até que sua aparência arredondada visível através das imagens obtidas em microscopia eletrônica levou à nomeação como sendo *Rotavirus* (*rota* sendo roda em latim) (BISHOP et al., 2009). Os rotavírus logo foram relacionados com diversos outros casos descritos em literatura sobre gastroenterites diarreicas em diversos grupos



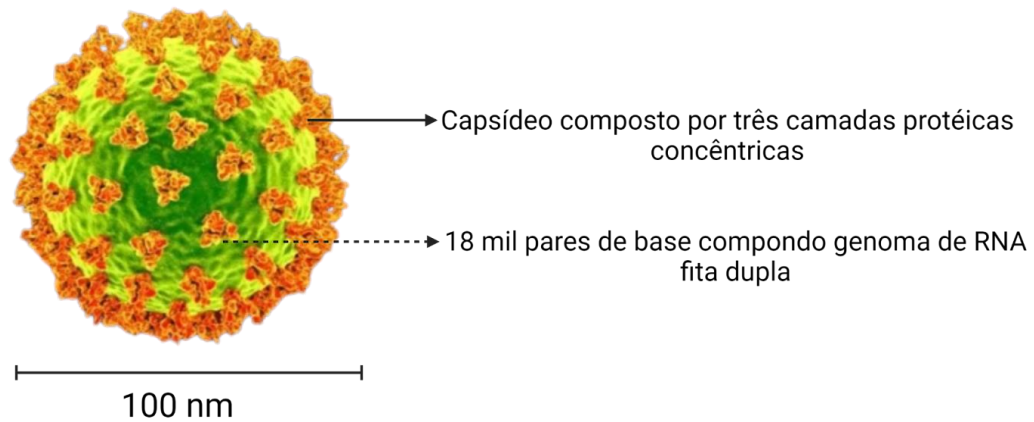
animais (ADAMS E KRAFT, 1963; MALHERBE E STRICKLAND-CHOLMEY, 1967; MEBUS et al., 1969). A importância das infecções por rotavírus em humanos foi devidamente estabelecida pelo estudo de Davidson, em união com Bishop e colaboradores, em que avaliou-se a presença de rotavírus em amostras fecais de crianças com até cinco anos admitidas em um hospital em Melbourne (Austrália) com diarreia aguda severa (DAVIDSON et al., 1975).

Durante o ano em que permaneceram realizando estas análises, o grupo demonstrou que os rotavírus estavam presentes em 52% das amostras dos pacientes admitidos com gastroenterite. Durante os meses de inverno, a proporção de casos admitidos onde o rotavírus foi identificado atingiu 73% (DAVIDSON et al., 1975). Até o início da década de 80 os rotavírus já haviam sido reconhecidos como o principal causador de gastroenterites em crianças nos Estados Unidos (CORTESE E HABER., 2021).

O reconhecimento do volume de casos de gastroenterites que foram causados por infecção por rotavírus levou a OMS a incentivar o desenvolvimento de uma vacina (BISHOP et al., 2009). A primeira tentativa de vacina, com administração oral de rotavírus viáveis, não foi eficaz na proteção contra a reinfeção, apenas reduzindo a severidade dos sintomas (BISHOP et al., 1983). Após uma variedade de testes com diversos sorotipos de rotavírus, duas vacinas orais com vírus atenuado tornaram-se disponíveis no mercado, a Rotarix (GSK), contendo uma cepa de rotavírus humano atenuado, e a RotaTeq (Merck), composta de cinco sorotipos recombinantes de rotavírus bovino e humano. Estas vacinas mostraram-se seguras, atingindo 70% de eficácia contra gastroenterites causadas por infecção por rotavírus (RUIZ-PALACIOS et al., 2006; VESIKARI et al., 2006). Atualmente outras formulações estão sob pesquisa, principalmente para solucionar problemas como infecções por sorotipos que não são abrangidos pelas vacinas existentes (BISHOP et al., 2009).

Os rotavírus possuem RNA fita dupla como material genético, este com tamanho de cerca de 18.000 pares de base. O ácido nucleico está abrigado no interior de um capsídeo composto por três camadas de proteínas, atingindo aproximadamente 100 nm de diâmetro. Como anteriormente mencionado, pertencem à subfamília *Sedoreovirinae*, possuindo estrutura sem grandes projeções, com aparência basicamente esférica (KING et al., 2011).

Figura 6 - Representação de uma partícula viral de rotavírus A



Fonte: A autora

### 2.2.5 Vírus da Hepatite A

O vírus da Hepatite A é um vírus transmitido via fecal-oral, através da ingestão de água ou alimentos contaminados. Pertence à família *Picornaviridae*, sendo a única espécie contida no gênero *Hepatovirus* (NGUYEN E HAN, 2018). Existem sete genótipos já identificados do vírus da Hepatite A, sendo que três deles infectam primatas não-humanos, enquanto que os outros quatro são responsáveis por causarem infecções virais em humanos (PEREIRA E GONÇALVES, 2003). Após a ingestão, o vírus da Hepatite A infecta células epiteliais do intestino delgado, porém seu principal sítio de replicação são os hepatócitos de primatas. Ao afetar o fígado, o vírus da Hepatite A acaba sendo excretado na bile e pode ser identificado em altas concentrações em fezes de indivíduos infectados (KING et al., 2011).

A descrição de casos individuais, assim como de surtos, que se assemelham a infecções pelo vírus da Hepatite A, remonta à China há 5.000 anos atrás. Hipócrates, considerado “pai da medicina”, descreveu uma epidemia de icterícia que certamente se tratava de um surto de Hepatite A (SHERLOCK, 1984). A partir do século 17, essa doença recebeu maior atenção, passando a ser associada com campanhas militares. Os infectados pela suposta “icterícia do campo” entre a 1ª e a 2ª guerra mundial chegaram a atingir 16 milhões de civis e soldados (FONSECA, 2010a).

Devido às significativas perdas associadas à infecção viral até então desconhecida, iniciou-se um intenso trabalho, principalmente por parte das forças

armadas americanas, para identificar o agente causador dos surtos (FEINSTONE, 2019). Apesar do avanço do uso da cultura celular como ferramenta de isolamento viral, não foi possível obter resultados consistentes com a tentativa de inocular amostras de pacientes em linhagens celulares (CROSS E MARMION, 1966). Feinstone e Kapikian, em 1973, ao analisar por microscopia eletrônica amostras de fezes de indivíduos acometidos pela doença, finalmente foram capazes de definir o patógeno envolvido. Os pesquisadores detectaram pequenas partículas virais, com cerca de 27 nm de diâmetro, diferentes de todos os outros componentes da amostra fecal (FEINSTONE et al, 1973).

Após a primeira visualização do vírus, iniciou-se uma busca por anticorpos que neutralizassem seu antígeno. Para isto, as fezes dos indivíduos infectados foram utilizadas para analisar a reação com diferentes grupos de soro, a qual foi avaliada através de microscopia eletrônica. Através deste estudo os pesquisadores concluíram que as partículas virais presentes nas fezes de indivíduos acometidos com hepatite eram os causadores da tal doença (FEINSTONE et al, 1973).

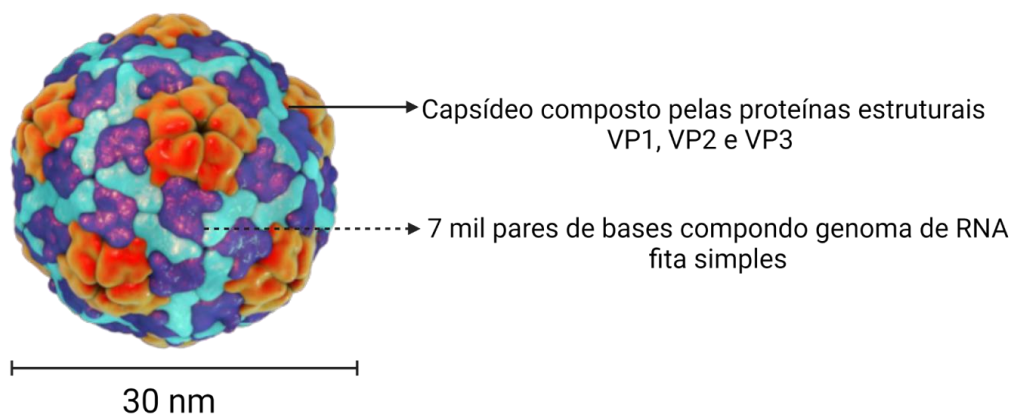
Estima-se que anualmente 1,4 milhões de pessoas contraíam o vírus da Hepatite A (HAV) em todo o mundo e quem, em regiões endêmicas, até 90% das crianças até dez anos de idade estejam infectadas por HAV (JACOBSEN E WIERSMA, 2010; SILVA et al., 2020). No Brasil o vírus da Hepatite A é um dos mais prevalentes nos casos de hepatites virais, sendo que entre 2009 e 2018, dos quase 410 mil casos confirmados de hepatite, 12,5% tenham sido em decorrência de infecções por HAV (SILVA et al., 2020; BRASIL, 2020). É um vírus não envelopado, cujo material genético é composto por RNA fita simples com cerca de 7.500 pares de base, envolto em capsídeo composto pelas proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3 e que causa infecções sintomáticas ou assintomáticas, estando associado principalmente com águas e alimentos de qualidade duvidosa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

A severidade dos sintomas está relacionada com a idade do indivíduo acometido, enquanto que crianças de até seis anos geralmente são assintomáticas, adultos com mais de cinquenta anos estão mais propensos a desenvolverem complicações (HADLER et al., 1980). Após o período de incubação, que ocorre entre 15 a 50 dias, o aparecimento de sintomas ocorre de forma abrupta, com sinais como náusea, vômito, diarreia, urina escurecida, icterícia (pele amarelada), febre, dor de

cabeça e dor abdominal. O aumento do tamanho do fígado e do baço, quadro caracterizado com hepatomegalia e esplenomegalia, também podem estar presentes (MATHENY E KINGERY, 2012).

No ano de 1995 foi licenciada a primeira vacina contra o vírus da Hepatite A nos Estados Unidos. Com o início da campanha de vacinação, houve redução de 92% do número de casos até o ano de 2012 (CDC, 2020). Em 2014, o Programa Nacional de Imunização de responsabilidade do Ministério da Saúde implementou o programa universal de vacinação contra o vírus da Hepatite A. A vacina utilizada contém o vírus inativado e é aplicada em dose única, sendo preparada a partir de culturas celulares de fibroblastos humanos (STRIKAS et al., 2018). É recomendado que crianças entre 12 a 24 meses sejam imunizadas com a vacina, cuja duração atinge cerca de 15-20 anos (MATHENY E KINGERY, 2012; BRITO E SOUTO, 2020).

Figura 7 - Representação de uma partícula viral do vírus da Hepatite A



Fonte: A autora

### 2.2.6 SARS-CoV-2

O vírus SARS-CoV-2 pertence à família *Coronaviridae*, família essa que abriga vírus envelopados, com material genético composto por RNA fita simples e capazes de infectar mamíferos, aves e peixes (KING et al., 2011). São vírus responsáveis por causarem infecções respiratórias e intestinais, podendo também causar danos neurológicos e hepatite (HOLMES, 2001; MASTERS, 2006). Os coronavírus foram os agentes causadores de três pandemias de larga-escala ao longo da história: a

Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), originária da província de Guangdong (China), entre 2002 e 2003, a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (SROM), advinda dos países do oriente médio, ocorrida em 2012 e, mais recente, a Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SRAG-2), descoberta em Wuhan (China) em dezembro de 2019 (DROSTEN et al., 2003; ZAKI et al., 2012; ZHU et al., 2020).

Graças às altas taxas de infecciosidade e o grande número de indivíduos que permanecem assintomáticos ou com sintomas leves, o coronavírus causador da pandemia de SARS-CoV-2 se espalhou rapidamente pelo mundo (REMUZZI E REMUZZI, 2020; ZOU et al., 2020). Em março de 2020, a Organização Mundial da Saúde declarou estado de pandemia, porém as medidas protetivas de isolamento em que os países se mantiveram não foram capazes de restringir a disseminação da doença, que acabou afetando mais de 210 países, infectando centenas de milhões de pessoas e matando 6,5 milhões de indivíduos (OMS, 2020a; WHO, 2020b).

Em dezembro de 2019, na província de Wuhan, foram realizadas diversas notificações por autoridades locais de saúde sobre casos de pneumonia de causa desconhecida. Ao investigar os casos, foi possível relacionar epidemiologicamente os indivíduos afetados pela doença com um mercado de frutos do mar existente na cidade (ZHU et al., 2020). Utilizando o protocolo implementado durante a epidemia de SARS em 2003, hospitais locais executaram o mecanismo de vigilância destinado a pneumonias de causa desconhecida, evidenciando que se tratava de um novo tipo de coronavírus (WU et al., 2020; LI et al., 2020).

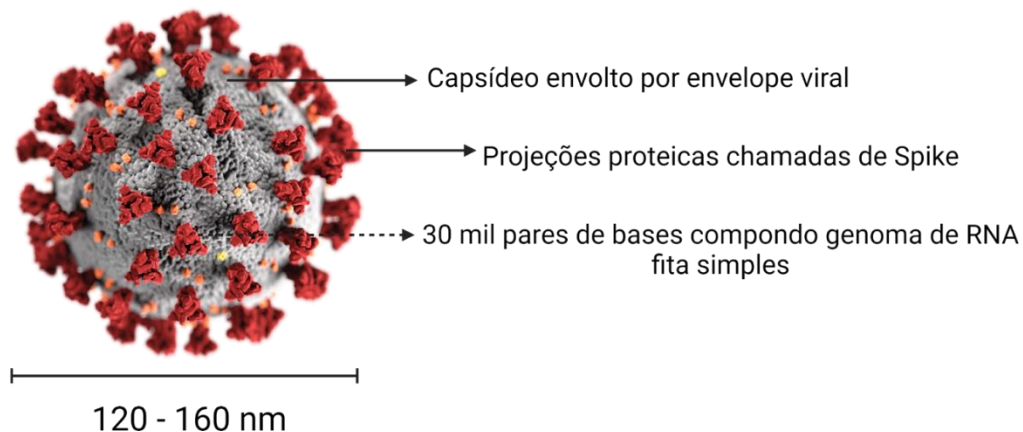
Animais selvagens acabam servindo como reservatório de patógenos, sendo potenciais transmissores de vírus zoonóticos à humanos. Morcegos servem como reservatório de ebola vírus, nipah vírus e coronavírus, levantando suspeitas sobre seu papel na transmissão de SARS-CoV-2. Kawashima comparou o genoma do SARS-CoV-2 com o de cepas de coronavírus que circulavam em diversos animais, chegando a conclusão que os sorotipos que infectam morcegos são significativamente semelhantes com o novo coronavírus causador da COVID-19 (KAWASHIMA et al., 2022).

Os membros da família *Coronaviridae* possuem sua partícula viral com formato esférico e com cerca de 120-160 nm de diâmetro. Envolvendo o envelope há projeções proteicas em formato de espículas chamadas de spikes. É a partir destas proteínas spike que o coronavírus se liga ao receptor da célula hospedeira (NAQVI et

al., 2020). O material genético, composto por RNA, possui cerca de 30 mil pares de base. Por conta do tamanho do genoma e da complexidade da partícula viral, os membros desta família de vírus são considerados os maiores vírus de RNA existentes até o momento (KING et al., 2011).

A principal rota de transmissão do SARS-CoV-2 é através de gotículas respiratórias e do contato interpessoal (JIN et al., 2020). Considerando que muitos indivíduos permanecem assintomáticos, porém ainda transmitem o vírus, se torna evidente o motivo pelo qual esta doença se disseminou tão rápido na população mundial. Além de gotículas respiratórias, foi comprovada a presença de SARS-CoV-2 em fezes de indivíduos doentes. A presença deste vírus nas fezes indica que são capazes de sobreviver e se replicar no trato gastrointestinal, levantando hipóteses quanto a uma possível rota fecal-oral de transmissão (CERRADA-ROMERO et al., 2022). Apesar da detecção do genoma e de partículas viáveis nas fezes destes indivíduos infectados, não foi comprovado que é uma provável rota de transmissão (WU et al., 2020).

Figura 8 - Representação de uma partícula viral de SARS-CoV-2



Fonte: A autora

### 2.3 METODOLOGIAS PARA CONCENTRAÇÃO E DETECÇÃO VIRAL

Um dos principais desafios na análise de águas ambientais é recuperar os vírus que estão presentes nestes grandes volumes de amostra. Como os vírus estão distribuídos de forma heterogênea e dispersa em grandes mananciais como rios,

lagos e mares, é essencial que a coleta de água seja representativa, o que resulta na necessidade de trabalhar com grandes volumes. Portanto, se torna necessário o processamento da amostra, a fim de concentrar os agentes virais presentes na água, otimizando assim os ensaios de detecção realizados posteriormente (WYN-JONES, 2007).

A seleção do método de concentração que melhor se aplica a natureza de sua amostra deve cumprir alguns critérios, como ser tecnicamente simples, rápida, sem grandes custos, ter uma boa recuperação viral, ser adequada para uma variedade de vírus entéricos e respiratórios e fornecer um pequeno volume de amostra concentrada. Dificilmente haverá uma técnica que cumpra todos os pré-requisitos, sendo essencial que a seleção também se baseie na existência de evidências que comprovem a eficácia de cada sistema (BOSCH et al., 2008).

Dentre os principais métodos de concentração de matrizes ambientais estão a filtração utilizando membranas positiva ou negativamente carregadas, a ultracentrifugação, precipitação, floculação orgânica e polietilenoglicol (BOSCH et al., 2008). A natureza da amostra também deve ser levada em conta, assim como a possível presença de inibidores que irão prejudicar os ensaios de detecção. Devido às propriedades das amostras de água analisadas, que define-se como salobra devido a sua salinidade média que permanece entre 0,5 a 30 ppt, foi selecionada a técnica de concentração por floculação orgânica, baseada na metodologia descrita por Calgua et al. (2008).

A técnica de floculação orgânica possui algumas vantagens, como a concentração de vírus presentes em 10 litros de água em um volume consideravelmente menor, além de ser um procedimento rápido, sem a necessidade de uso de muitos reagentes ou equipamentos. Esta técnica se baseia na manipulação do pH da água, com o objetivo de fazer com que as partículas virais presentes se mantenham aderidas aos flóculos de leite adicionados na amostra. Posteriormente ao período de agitação, as amostras são mantidas em repouso para que os flóculos de leite em que os vírus estão adsorvidos precipite, sendo este material do fundo do recipiente coletado, centrifugado, ressuspendido e utilizado nos ensaios de detecção (CALGUA et al., 2008).

Posterior ao processo de concentração, as principais metodologias aplicadas para detecção de vírus em amostras de água são por meio de cultura celular e ensaios

moleculares. A avaliação da presença de vírus utilizando linhagens de culturas celulares possui como vantagem a possibilidade de determinar se os vírus presentes estão viáveis, já que se baseia na avaliação do efeito citopático causado nas células. No entanto, não são todos os vírus que possuem linhagens permissivas disponíveis, assim como também há vírus fastidiosos que não se replicam em cultura celular, sendo uma técnica limitada somente a grupos específicos de vírus, como os enterovírus e os mastadenovírus humanos (WYN-JONES, 2007).

Os ensaios moleculares como PCR e RT-PCR são a técnica mais comumente empregada atualmente, sendo considerada “padrão ouro” para detecção de vírus em amostras ambientais. Apesar de possuírem alta sensibilidade na detecção do genoma viral, não fornecem informações quanto à infecciosidade dos vírus presentes. Mesmo com esta limitação, a capacidade de realizar a identificação viral a nível de genogrupo, bem como a possibilidade de quantificação do número de partículas virais com o desenvolvimento da técnica de PCR em tempo real, torna os ensaios moleculares ferramentas importantes para estudos de monitoramento epidemiológico de doenças virais (WYN-JONES, 2007).



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a presença de vírus entéricos e respiratórios - *Mastadenovirus Humano*, *Enterovírus*, *Norovírus Humano tipos GI e GII*, *vírus da Hepatite A*, *Rotavírus A* e *SARS-CoV-2* - na Lagoa da Conceição (Florianópolis/SC) após extravasamento de efluente sanitário e determinar se há tendência de decaimento do título viral ao longo do tempo

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Monitorar áreas estratégicas da Lagoa da Conceição visando vírus entéricos e respiratórios humanos, correlacionando-os com contaminação fecal (*Escherichia coli*) e parâmetros físico-químicos;
- Avaliar a infecciosidade viral dos vírus entéricos e respiratórios de interesse;
- Determinar se há decaimento da contaminação viral sete meses após o evento de extravasamento de esgoto sanitário na Lagoa da Conceição.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 MATERIAL BIOLÓGICO**

As células de Adenocarcinoma de Pulmão Humano ATCC (CCL-185) e de Rabdomyosarcoma Humano T utilizadas no presente trabalho, foram comercialmente adquiridas do American Type Culture Collection em 2010 e do Instituto Adolfo Lutz em 2011, respectivamente. Os vírus inoculados como controle interno viral das amostras, coronavírus murino (MHV-3) e norovírus murino (MNV) foram gentilmente cedidos pela Unicamp em 2020 e pela Universidade de Barcelona em 2010, respectivamente.

### **4.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA**

Nos meses de fevereiro e março de 2021 o Laboratório de Ecologia de Águas Continentais (LIMNOS) da Universidade Federal de Santa Catarina realizou coletas de amostras de água em doze pontos distribuídos de forma homogênea ao longo da Lagoa da Conceição. Estas amostras foram gentilmente cedidas ao Laboratório de Virologia Aplicada para realização de análise quanto à presença de patógenos virais. Dentre os doze pontos selecionados pela equipe do LIMNOS para coleta, três foram escolhidos para dar continuidade às análises do presente estudo. Devido à organização da logística de coleta, e para que pudesse ser cumprido o cronograma de coletas quinzenais, foram selecionados três pontos estratégicos para a amostragem localizados na margem Oeste da Lagoa da Conceição. Os três pontos selecionados e sua caracterização e coordenadas geográficas estão dispostos no Quadro 1.

Quadro 1 – Caracterização dos pontos de coleta avaliados na Lagoa da Conceição.

Identificação dos Pontos de Coleta	Local	Caracterização	Coordenadas	
P1	Ponta das Almas	Local de circulação de barcos (transporte e pesqueiros)	27°35'57" S	48°27'49" W
P2	Osni Ortiga	Local de circulação de carros	27°36'34" S	48°27'50" W
P3	Canto da Lagoa	Área residencial	27°36'39" S	48°28'47" W

Fonte: A autora.

Entre os meses de abril e agosto de 2021 foram realizadas coletas quinzenais de amostras de água da Lagoa da Conceição, seguindo a metodologia utilizada anteriormente pelo LIMNOS. As coletas foram realizadas entre 6 e 8 horas da manhã, a uma profundidade entre 50 a 80 cm e com a amostragem de 5 L de água em cada um dos três pontos. As amostras foram armazenadas em caixas térmicas até o deslocamento ao laboratório.

#### 4.3 MEDIDA DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

A análise dos parâmetros físico-químicos foi realizada para que seja possível averiguar se há correlação entre a presença de patógenos e as condições climáticas e ambientais. As amostras coletadas entre fevereiro e agosto/2021 tiveram seus parâmetros físico-químicos avaliados utilizando os kits comerciais de Condutivímetro Salinômetro AT 215, pHmetro AT 315 SP Microprocessado e Oxímetro AT 155 Microprocessado (Alfakit).

Os parâmetros analisados foram temperatura, pH, oxigênio dissolvido, condutividade, salinidade, total de sólidos dissolvidos e resistividade. A seleção destes parâmetros se deu de acordo com sua importância para a análise da qualidade da água (PATIL et al., 2012).

Além dos parâmetros mensurados por meio do uso de kits comerciais de análise ambiental, também foram avaliadas as médias de precipitação e temperatura atmosférica mensais da região da Lagoa da Conceição durante o período analisado.

Estes dados foram obtidos através dos portais Weather Spark e Climate Data e foram analisados quanto a sua influência na contaminação viral e bacteriana na Lagoa da Conceição, bem como sua relação com outros parâmetros físico-químicos, como a salinidade desta laguna de água salobra.

#### 4.4 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS

Conforme a Resolução nº 274 do CONAMA, a análise da qualidade da água para fins de determinação de balneabilidade possui como padrão para avaliação de qualidade microbiológica a detecção de bactérias termotolerantes (CONAMA, 2000). Para aferir se as águas da Lagoa da Conceição estão de acordo com o padrão preconizado pela legislação ambiental e se há correlação entre uma possível contaminação viral e bacteriana, uma parte das amostras de água coletadas entre abril e agosto foram destinadas à análise de coliformes termotolerantes.

Para este fim, logo ao chegar ao laboratório, 1 mL das amostras foram inoculadas em placas com meio de crescimento seletivo para enterobactérias (Ágar MacConkey da KASVI) e incubadas em estufa a 37°C. Após 24 horas, colônias típicas de *Escherichia coli* foram contabilizadas para que seja possível expressar o resultado em Unidades Formadoras de Colônia (UFC/100 mL). Após a contagem, as colônias isoladas foram preservadas em freezer -20°C em mistura de meio de crescimento LB e glicerol, a fim de manter a viabilidade bacteriana.

As colônias isoladas destas amostras de água foram enviadas para o Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (UFRJ) para realização do teste MALDI-TOF-MS. O objetivo desta avaliação é realizar a identificação e genotipagem do microrganismo, através de ionização das moléculas e proteínas que o compõem, que são posteriormente codificadas através de espectrofotometria de massa, criando uma “impressão digital” do agente microbiano analisado.

#### 4.5 MONITORAMENTO VIRAL

##### 4.5.1 Floculação orgânica utilizando leite acidificado

Para realizar a concentração através de floculação orgânica, as amostras coletadas foram depositadas em baldes com capacidade de 10 L. Para avaliar a eficácia do método de concentração selecionado, as amostras foram semeadas com 1 mL de controle interno, sendo utilizados os vírus coronavírus murino e norovírus murino, com concentrações conhecidas ( $10^8$  e  $10^7$  cópias genômicas/mL respectivamente). Após a adição do controle, o pH das amostras foi ajustado para 3,5 utilizando HCl 1M de forma a contribuir com a agregação viral e com a adsorção dos vírus nos flóculos de leite. Em seguida, adicionou-se 50 mL de solução de leite desnatado acidificado preparado em água do mar artificial (Sea Salts - SIGMA). O leite utilizado foi o Powder Skimmed Milk (BD Difco) pois contém baixíssimo teor de proteínas e lipídeos, substâncias que agem como inibidores de reações moleculares. Após a dissolução do leite na água marinha artificial, o pH da solução foi ajustado para 3,5 utilizando HCl 1M. Nesta faixa de pH a solução de leite forma os flocos em que as partículas virais são adsorvidas.

Após as etapas de inóculo de controle viral, ajuste do pH da amostra e adição de solução de leite acidificado, as amostras permanecem 8 horas sob agitação, utilizando agitadores magnéticos. Durante esse período as partículas virais presentes irão interagir com os flóculos de leite, ocorrendo a agregação entre vírus e as partículas sólidas. Em seguida, as amostras passam por um período de 8 horas em repouso, de forma que os flóculos de leite sedimentam e formam o precipitado. Após esse período, o sobrenadante é aspirado com o auxílio de mangueira e bomba manual e o restante (cerca de 100 mL) é centrifugado a 8.000 rpm, a 4°C por 30 minutos.

Encerrada a centrifugação, o sobrenadante é novamente descartado e o precipitado é solubilizado em tampão fosfato, solução tamponante preparada seguindo a proporção 1:2 v/v de soluções de fosfato monossódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) e fosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) com pH 7,5. Como a amostra se encontrava sob pH ácido (3,5) esta solução age neutralizando o pH. O concentrado final foi alíquotado em microtubos de 1,5 mL e armazenado em freezer -80°C até o momento da análise.

#### **4.5.2 Análise de Recuperação Viral**

A eficiência do processo de concentração viral foi avaliada através da realização de RT-qPCR utilizando como alvos os vírus inoculados antes da

concentração das amostras (MHV-3 e MNV-1). A média dos resultados de recuperação viral do ensaio de RT-qPCR, expressos em CG/L, foram comparados com a concentração inicial do inóculo viral que foi semeado nas amostras. Dessa forma é possível comparar como os processos de concentração e de extração dos ácidos nucleicos podem ter interferido na recuperação da concentração inicial de fluido viral inoculada nas amostras. Com um resultado positivo de recuperação viral é possível afirmar que os vírus de interesse, entéricos e respiratórios, cuja presença será posteriormente avaliada, também foram recuperados da matriz ambiental. O cálculo de recuperação viral foi executado conforme a fórmula que segue:

$$\text{Eficiência viral (\%)} = \frac{(\text{Amostra de água semeada com vírus e floculada})}{\text{Inóculo inicial semeado na amostra (controle interno)}} \times 100$$

#### 4.5.3 Avaliação de Infeciosidade Viral

As células utilizadas para detecção e viabilidade viral através de infecção *in vitro* foram as linhagens celulares de Adenocarcinoma de Pulmão Humano (A549), permissivas aos mastadenovírus humanos respiratórios, e as células Rbdomiossarcoma Humano (RD), permissivas aos enterovírus humanos. O crescimento e manutenção das células foram realizados em garrafas de cultivo celular com tamanho de 150 cm<sup>2</sup> utilizando como meio de crescimento, meio essencial mínimo com sais de Eagle (MEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Ambas as células cultivadas foram mantidas em estufa a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

A detecção de vírus em amostras ambientais apresenta diversos desafios, sendo um deles a presença de variadas classes de substâncias e componentes possivelmente tóxicos às linhagens celulares trabalhadas. Para determinar se as amostras concentradas apresentam citotoxicidade e qual melhor concentração amostral para fins de replicação viral sem efeitos citotóxicos, amostras foram inoculadas em placas de cultivo celular de RD e A549, em sua concentração bruta e diluída, seguindo a metodologia descrita por Rigotto et al. (2005) e avaliadas quanto ao seu efeito citotóxico.

Para este fim, foram produzidas placas de cultivo celular de 24 cavidades, contendo linhagens RD e A549 na concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL, mantidas sob meio DMEM suplementado com 10% de SFB e incubadas por 24 horas em estufa a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas, as placas apresentam a confluência ideal para que seja realizado o ensaio de citotoxicidade. Para isto, as amostras são diluídas em meio MEM tratado com 1% de SFB, nas proporções 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64. Com as diluições realizadas, o meio é aspirado das placas e estas são lavadas duas vezes com solução de tampão fosfato (PBS), com objetivo de remover células não-aderidas e resquícios de SFB (inibidor da adsorção viral na célula).

A amostra bruta, bem como cada diluição da amostra, são inoculadas em réplica nas placas de cultura celular de RD e A549, mantendo-se sempre ao menos duas cavidades de cada placa livres para que sejam utilizadas como controle celular. Após o inóculo das amostras, as placas são incubadas em estufa durante o período de uma hora. Passado este período, o sobrenadante é aspirado e adiciona-se meio de manutenção DMEM suplementado com 2% de SFB e 1% de PSA (penicilina, estreptomicina e anfotericina). As placas são novamente incubadas em estufa e observadas diariamente por um período de 5 a 7 dias para avaliação do surgimento de efeito citotóxico.

Passado o período de incubação, aspira-se o meio de manutenção e é adicionado o corante preto de naftaleno, responsável por corar as células que se mantiveram viáveis até o fim do ensaio. Com a adição do corante, as placas devem ser mantidas sob agitação durante 15 minutos, a temperatura ambiente. Após esse período, o excesso do corante é removido e é possível avaliar o efeito citotóxico comparando as cavidades em que foram inoculadas amostras com o controle celular.

#### **4.5.4 Ensaio de detecção de enterovírus**

Para a detecção da presença de Enterovírus em amostras ambientais, a Organização Mundial da Saúde preconiza o uso de células da linhagem de Rbdomiossarcoma Humano (RD), que são permissivas para a maioria dos Enterovírus humanos já identificados (OMS, 2015). Para realizar este ensaio de detecção, foi necessário o preparo de placas de 24 cavidades semeadas com células

RD na concentração de  $3 \times 10^5$  células/mL, mantidas sob meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas da montagem das placas, o tapete celular encontra-se confluyente e é possível dar início ao processo de infecção.

Após a confirmação que as placas contendo o cultivo celular encontram-se em boas condições para que ocorra o ensaio de detecção, aspira-se o meio de cada cavidade, lavando-as duas vezes com PBS. Após a remoção de células não-aderidas e de resquícios de SFB é possível inocular as amostras em cada cavidade. As amostras foram inoculadas em sua concentração não-tóxica e acrescidas de 1% de antibióticos e antifúngico PSA (penicilina, estreptomicina e anfotericina B). Cada amostra foi inoculada em réplica na placa de cultivo celular, mantendo-se sempre livre ao menos duas cavidades para que sejam utilizadas como controle celular. Após a adição das amostras, as placas são incubadas em estufa a  $37^\circ\text{C}$ , sob atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , durante o período de uma hora.

Após o período de incubação, o sobrenadante de cada cavidade é aspirado e adiciona-se meio DMEM suplementado com 2% de SFB e 1% de PSA. As placas novamente são incubadas em estufa e avaliadas diariamente por um período de 5 a 7 dias, até que seja observado o efeito citopático, caracterizado por células arredondadas desaderidas da monocamada celular. As amostras que apresentaram efeito citopático foram coletadas diretamente da cavidade da placa de cultivo celular, para que posteriormente seja realizada a genotipagem do Enterovírus detectado.

#### **4.5.5 Ensaio de detecção de mastadenovírus humanos**

Para avaliar a presença e viabilidade de mastadenovírus humano nas amostras, foi executada a metodologia descrita por Rigotto et al. (2011) com algumas modificações. Primeiramente, foram obtidas placas de 24 cavidades semeadas com cultivo de células A549 na concentração ideal de  $3 \times 10^5$  células/mL. As células foram mantidas sob meio DMEM suplementado com 10% de SFB durante 24 horas em estufa a  $37^\circ\text{C}$ , sob atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Após esse período, as cavidades das placas apresentam monocamada celular confluyente, ideal para a realização do ensaio de detecção.



Antes da inoculação das amostras, cada cavidade é lavada duas vezes com PBS a fim de que sejam removidas células não-aderidas e resquícios de SFB. Após, as amostras são inoculadas em concentração não-citotóxica, suplementadas apenas de 1% de PSA para evitar o crescimento de bactérias e fungos. As amostras são inoculadas em réplicas, mantendo-se sempre ao menos duas cavidades livres para controle celular. Após a infecção, as placas são incubadas em estufa a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, durante o período de uma hora, com homogeneização a cada quinze minutos.

Finalizado o período de incubação, o sobrenadante é aspirado e é adicionado meio de manutenção DMEM suplementado com 2% de SFB, 1% de PSA e 1% de piruvato. As placas retornam novamente à estufa, sendo observadas diariamente por 4 a 5 dias, até que seja observado o surgimento de efeitos citopáticos característicos da infecção por mastadenovírus humano, que geralmente são alterações na morfologia da célula, como o arredondamento das células e o desprendimento da monocamada celular.

#### **4.5.6 Determinação do título viral**

As amostras que apresentaram resultado positivo para a presença de mastadenovírus humano foram avaliadas quanto à concentração de vírus presentes, com objetivo de quantificar o número de partículas virais infecciosas presentes nestas amostras. Com este objetivo, foi realizado o ensaio de placa de lise, conforme descrito por Burleson et al. (1992) e Cromeans et al. (2008). Seguindo a metodologia descrita por estes pesquisadores, foram montadas placas de cultivo celular contendo a linhagem A549 em uma densidade conhecida. Após atingirem confluência, a amostra é adicionada em diferentes diluições, a fim de facilitar a contabilização de placas de lise. Após um período de incubação, as amostras foram descartadas e foi adicionado uma solução contendo meio de cultivo, substância espessante e outros componentes que garantem a nutrição das células durante o período de avaliação da infecção. Após sete dias, o meio é cuidadosamente removido, sendo as placas então coradas com cristal violeta, permitindo a contabilização das placas de lise formadas pela presença de vírus infecciosos.

#### 4.5.7 Detecção molecular de genomas virais

Após o processo de concentração das amostras através da técnica de leite floculado, procedeu-se a extração do material genético presente. Esta etapa é essencial para que se obtenha os ácidos nucleicos que serão utilizados posteriormente para realização das reações de PCR, tanto para avaliação da recuperação do controle interno, quanto para detecção dos vírus entéricos e respiratórios de interesse. Para isto, foi utilizada a técnica de extração através de tubos com coluna de sílica, fornecidos pelo kit PureLink Viral RNA/DNA kit Invitrogen by Life Technologies, realizando o procedimento de acordo com as instruções do fabricante. Este kit possibilita a extração do material genético de vírus tanto de genomas de DNA como de RNA, seguindo uma metodologia baseada na técnica descrita por Boom et al. (1990).

Esta técnica de extração se baseia na atração entre a carga naturalmente negativa dos ácidos nucleicos e na positividade dos íons sódio permeados na coluna de sílica (SHI et al., 2001). Uma vez centrifugado, o material genético presente na amostra irá passar pela coluna de sílica, mantendo-se retido devido a atração pelas partículas naturalmente positivas de íons sódio. Após, seguem-se diversas rodadas de centrifugação que possuem como objetivo remover impurezas e inibidores que se mantiveram unidos ao material genético. Por fim, acrescenta-se água livre de nuclease, que sofrerá dissociação iônica e competirá com o ácido nucleico com as ligações aos íons sódio. Dessa forma o material genético, após isolado e removido de impurezas, é eluído da coluna de sílica e mantém-se disponível para os ensaios de detecção.

Após a extração dos ácidos nucleicos, as amostras tiveram sua concentração de DNA e RNA quantificadas utilizando o espectrofotômetro NanoVue Plus. Esta avaliação garante a eficiência e qualidade do procedimento de extração dos ácidos nucleicos através da quantificação de material genético presente, além de informar o grau de pureza do DNA ou RNA extraído, o que irá definir em que concentração será realizado o PCR das amostras. Após extraídas, as amostras que apresentaram resultado positivo para Enterovírus em cultivo celular foram encaminhadas para o Laboratório de Enterovírus do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) para genotipagem.

Após a extração e quantificação do material genético, foram realizadas rodadas de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) e RT-PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) para avaliar a recuperação dos vírus inoculados como controle interno (MNV-1 e MHV-3) e a presença dos vírus de interesse: mastadenovírus humano, vírus da hepatite A, rotavírus A, norovírus humano tipo GI e GII e SARS-CoV-2. Também foi realizado PCR qualitativo para avaliar a presença de enterovírus. As reações foram realizadas utilizando 5 microlitros de amostra, em réplicas, e diluídas na proporção 1:10. Todas as reações foram executadas no equipamento StepOne Plus, seguindo as instruções do fabricante. Os iniciadores, suas sequências nucleotídicas e a respectiva referência estão listados no Quadro 2 abaixo.

Quadro 2 - Iniciadores e sondas utilizados para análise molecular dos vírus de interesse.

<b>Vírus</b>	<b>Iniciadores/sondas</b>	<b>Sequência</b>	<b>Referência</b>
<i>Norovirus murino tipo 1</i>	MNV-F	CACGCCACCGATCTGTTCTG	Baert et al. (2008)
	MNV-R	GCGCTGCGCCATCACTC	
	MNV-1P	6FAM-CGC TTT GGA ACA ATG-MGBNFQ	
<i>Coronavirus murino tipo 3</i>	MHV-F	GGAACTTCTCGTTGGGCATTATACT	Besselsen et al. (2002)
	MHV-R	ACCACAAGATTATCATTTCACAACATA	
	MHV-probe	5'-(FAM) ACATGC TAC GGC TCG TGT AAC CGA ACT GT (MGB)-3'	
<i>Mastadenovirus humano</i>	HAdV-F	CATTACATGCACATCGTCCGGG	Hernroth et al. (2002)
	HAdV-R	CAGC GGG CGAA ACTT GCA	
	ADP1	5'-(6FAM) CCG GGC TCA GGT ACT CCG AGG CGT CCT(TAMRA)-3'	
<i>Virus da</i>	HAV-F	GGTAGGCTACGGGTGAAAC	Jothikumar et al.

<i>Hepatite A</i>	HAV-R	GCGGATATTGGTGAGTTGTT	(2005)
	HAV	5'- (6FAM)CTTAGGCTAATACTTTATGA AGAGATGC(TAMRA)-3'	
<i>Rotavirus A</i>	NSP3-F	ACCATCTWCACRTRACCCTCTATG AG	Zeng et al. (2008)
	NSP3-R	GGTCACATAACGCCCCTATAGC	
	NSP3-P	FAM- AGTAAAAGCTAACACTGTCAAA- MGB	
<i>Norovirus humano tipo GI</i>	QNIF4-F	CGCTGGATGCGNTTCCAT	Da Silva et al. (2007)
	NV1LCR-R	CCTTAGACGCCATCATCATTTAC	
	NoV-ring 1A	FAM-AGATYGCGATCYCCTGTCCA- TAMRA	
<i>Norovirus humano tipo GII</i>	NoVG2-F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATG AG	Kageyama et al., 2003
	NoVG2-R	TCGACGCCATCTTCATTCA	
	NoV-ring2	FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT- TAMRA	
SARS-CoV-2	N_Sarbeco_F	CACATTGGCACCCGCAATC	Corman et al. (2020)
	N_Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	
	N_Sarbeco_P	FAM- ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA- MGB	
<i>Enterovirus</i>	EntFc	CCTCCGGCCCCTGAATG	De Leon et al. (1990)
	EntRc	ACCGGATGGCCAATCCAA	

Fonte: A autora

## 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar como se caracteriza a distribuição dos dados, foram examinados os histogramas referentes a estes valores, sendo também aplicado o Teste de Shapiro, ambos através do software estatístico RStudio. Após a averiguação de que se trata ou não de uma distribuição normal, as variáveis foram avaliadas em testes paramétricos ou não-paramétricos. Os testes de Coeficiente de Correlação de Pearson e o Teste-t de Student foram aplicados visando verificar correlação e significância dos dados virais, bacterianos e físico-químicos. Ambos os testes foram realizados através do Microsoft Excel. O Coeficiente de Correlação de Pearson sempre resultará em um valor entre -1 e 1, sendo que quanto mais próximo ao valor negativo, maior a probabilidade de não haver associação entre os dados, enquanto que resultados próximos ao limite positivo indicam que há correlação linear entre as variáveis analisadas. O Teste-t de Student, por sua vez, possui a função de evidenciar se os dados avaliados diferem de forma estatisticamente significativa (KIM, 2015; PARANHOS et al., 2014).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Durante a realização das coletas alguns parâmetros físico-químicos foram coletados para avaliação de uma possível correlação entre contaminação viral e condições ambientais e climáticas. Os parâmetros selecionados para esta observação foram temperatura (°C), pH, oxigênio dissolvido (mg/L), total de sólidos dissolvidos (ppm), condutividade (mS), resistividade (Ohm.m) e salinidade (ppt). A Tabela 1 que segue traz a média destes parâmetros coletados nos sete meses subsequentes ao evento de extravasamento nos três pontos de coleta analisados.

Tabela 1 - Média dos parâmetros físico-químicos durante o período analisados

	Pontos de Coleta		
	P1 - Ponta das Almas	P2 - Osni Ortiga	P3 - Canto da Lagoa
Temperatura (°C)	19,6 ± 1,8	19,35 ± 1,5	19,6 ± 1,6
pH	7,92 ± 0,42	7,62 ± 0,46	7,65 ± 0,3
Resistividade (Ohm.m)	32 ± 13,4	38 ± 18,6	37 ± 18,2
Condutividade (mS/m)	161,65 ± 10.910,1	133,45 ± 9587	104,75 ± 9547,8
Salinidade (ppt)	25,35 ± 176,2	19,75 ± 106,4	19,6 ± 101,6
Total de sólidos dissolvidos (ppm)	21.693 ± 38.095,5	17.096,5 ± 28.522,6	17.056 ± 53.577,2
Oxigênio dissolvido (mg/L)	7,23 ± 29,3	7,76 ± 31,4	7,98 ± 29,5

Fonte: A autora

De acordo com a resolução CONAMA nº 357 de 2005, as águas da Lagoa da Conceição se enquadram na categoria de águas salobras devido ao teor de salinidade presente. Baseado nas atividades desenvolvidas neste ambiente hídrico, ainda é possível caracterizá-lo como sendo uma laguna de água salobra de Classe I pois são destinadas a atividades recreativas de contato primário e também utilizadas para práticas de aquicultura e atividade pesqueira. Observando os valores dos parâmetros físico-químicos estabelecidos para a determinação de balneabilidade de águas salobras Classe I, é possível determinar que o teor de oxigênio dissolvido coletado das amostras se enquadra com o preconizado pela população (mínimo de 5 mg/L). Os valores de pH também vão de encontro ao estabelecido pelo CONAMA, que sugere a faixa de pH entre 6,5 a 8,5 como sendo o padrão ideal e não-tóxico para utilização destas águas.

A legislação referente à balneabilidade de corpos hídricos não estabelece uma faixa de temperatura ideal para águas, provavelmente por ser um parâmetro que acaba acompanhando as alterações sazonais de temperatura atmosférica. No entanto, foi possível evidenciar que a temperatura da água coletada durante as

amostragens não difere da faixa obtida pelas análises realizadas em 2020 pelo Instituto do Meio Ambiente de Santa Catarina (IMA-SC) e em 2021, após evento de extravasamento de efluente sanitário, pela Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN). Em coletas realizadas no mês de maio, o IMA-SC observou temperaturas da água entre 20,9 e 21,3°C e a CASAN, no mês de junho, constatou uma variação de temperatura entre 17,1 e 20,5°C (IMA, 2020; CASAN, 2021). As médias das temperaturas observadas durante as coletas realizadas se encontram entre esta faixa de temperatura.

Apesar de não ser um parâmetro cuja análise é exigida para avaliar o padrão de qualidade da água, a condutividade traz informações importantes sobre os sais dissolvidos nesta matriz. A condutividade é um parâmetro relacionado à capacidade de conduzir corrente elétrica e depende principalmente dos íons dissolvidos na água. Por sua vez, os íons derivam principalmente da dissociação de sais, relacionando-se com a quantidade de sólidos totais dissolvidos no corpo hídrico (MACHADO, 2006). Segundo a análise realizada pela CASAN durante o mês de junho, a condutividade amostrada na Lagoa da Conceição permaneceu entre 1,98 a 4,46 mS/m, valor consideravelmente abaixo do obtido ao realizar a medição dos parâmetros das amostras coletadas durante o período analisado (CASAN, 2021).

A condutividade é o inverso da resistividade, valor que identifica o quanto um material, nesse caso água salobra, se opõe à passagem de corrente elétrica. Ambos os parâmetros, condutividade e resistividade, estão relacionados com o total de sólidos dissolvidos na amostra. Como não há registros de análises ou estudos que incluíram a coleta de dados sobre a resistividade da água da Lagoa da Conceição, utilizou-se como base a faixa de resistividade média entre água doce (25  $\Omega$ .m) e água salgada (0,2  $\Omega$ .m). Seguindo este padrão, as amostras de água coletadas neste ambiente de água salobra ultrapassam o limite de resistividade esperado, possuindo a variável resistividade semelhante à apresentada por mananciais de água doce (LOBARINHAS et al., 2011).

Outros parâmetros importantes para a avaliação da correlação entre contaminação viral e bacteriana e as condições ambientais são os níveis médios mensais de precipitação e temperatura atmosférica. Estes parâmetros podem influenciar tanto a presença de patógenos, através do escoamento urbano, como os resultados de outros parâmetros físico-químicos, como a salinidade, pH e teor de

oxigênio dissolvido (SILVA et al., 2008). As médias mensais de temperatura atmosférica e pluviosidade durante os meses de estudo estão presentes na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2 - Médias da temperatura atmosférica e pluviosidade mensais durante o período analisado

	Temperatura atmosférica (°C)	Pluviosidade (mm)
Fevereiro	25	151,2
Março	24	108,5
Abril	22	84,2
Maió	18	85,6
Junho	17	86,3
Julho	17	97,2
Agosto	18	86,1

Fonte: Weather Spark e Climate Data (2021)

Conforme observado na tabela, os meses que apresentaram um maior volume de chuva se relacionam com o verão em Florianópolis, onde as temperaturas também são mais elevadas. Aproximando-se do inverno, entre os meses de maio e junho, vemos que há uma redução significativa da temperatura, que permanece até o término das análises. A baixa na temperatura atmosférica em Florianópolis durante a estação de inverno também acompanha uma redução da precipitação média mensal, evidenciando o padrão de verão úmido e inverno seco característico de regiões subtropicais.

## 5.2 PADRÃO BACTERIOLÓGICO

Para determinar o nível de contaminação por coliformes termotolerantes nas amostras da Lagoa da Conceição, uma fração da água coletada foi destinada à análise em busca da presença de *Escherichia coli*. Após 24 horas da inoculação das amostras em placas de crescimento com meio MacConkey, as colônias com tom de rosa foram contabilizadas e seu valor foi expresso em Unidades Formadoras de Colônias em 100



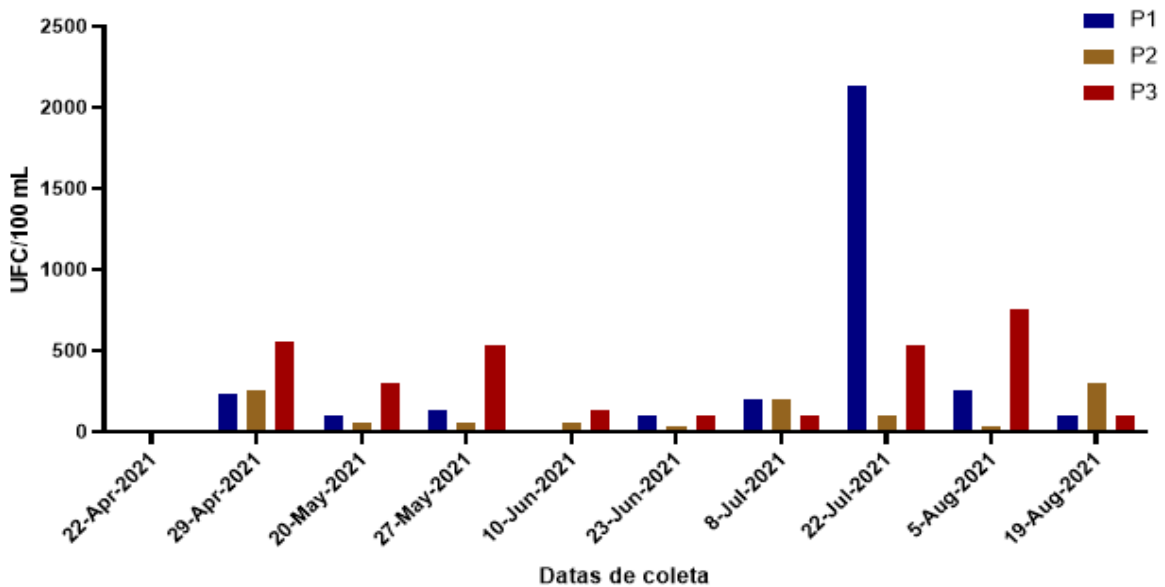
mL, padronização preconizada pela resolução nº 274 do CONAMA. Segundo esta legislação, este valor não pode ultrapassar 250 UFC/100 mL para que este ambiente seja considerado próprio para atividades recreativas e pesqueiras, sendo que este valor cai para 43 UFC/100 mL em áreas de cultivo de moluscos bivalves. A Tabela 3 abaixo indica os resultados obtidos da análise do padrão bacteriológico das amostras, expressos em UFC/100 mL.

Tabela 3 - Resultado da detecção de *E. coli* durante o período de abril a agosto.

Data de Coleta	P1	P2	P3
22/04/2021	Não detectado	Não detectado	Não detectado
29/04/2021	230	260	560
20/05/2021	100	60	300
27/05/2021	130	60	530
10/06/2021	Não detectado	60	130
23/06/2021	100	30	100
08/07/2021	200	200	100
22/07/2021	2130	100	530
05/08/2021	260	30	760
19/08/2021	100	300	100

Fonte: A autora

A Figura 9 abaixo evidencia a flutuação na detecção de *E. coli* ao longo do período entre abril e agosto de 2021. É possível ver como o limite máximo da presença de *E. coli* preconizado pela legislação frequentemente é ultrapassado, sendo os pontos P1 e P3 localidades onde este padrão geralmente não é cumprido. A presença destes coliformes possivelmente está relacionada com a contaminação recorrente por resíduos sanitários presentes no esgoto.

Figura 9 - Presença de *E. coli* (UFC/100 mL) entre os meses de abril a agosto

Fonte: A autora

### 5.3 ANÁLISE DE RECUPERAÇÃO VIRAL

Por meio da realização de RT-qPCR dos controles internos (MNV-1 e MHV-3) foi possível avaliar se o processo de concentração viral baseado em floculação orgânica foi eficiente em recuperar os vírus entéricos e respiratórios de interesse. Realizando a média do resultado obtido com a reação de amplificação foi possível determinar uma recuperação de 5,84% e 8,91% de MHV-3 e MNV-1 semeados no início do experimento, respectivamente. Apesar de baixa, a recuperação de parte dos vírus inoculados antes do processo de concentração confirma que é um procedimento válido para concentração de amostras de água salobra. Com a validação deste protocolo é possível afirmar que se há a presença de vírus nas amostras, eles provavelmente foram recuperados pelo processo de concentração selecionado.

### 5.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Antes de realizar o ensaio de detecção da presença de enterovírus e mastadenovírus humanos, foram realizados ensaios em cultura celular cujo objetivo seria definir a concentração não-tóxica das amostras para que assim fosse possível determinar que qualquer efeito citopático advindo da inoculação da amostra derivasse de infecção pelo vírus e não pela ação de componentes citotóxicos, fungos ou bactérias. Os resultados do ensaio apontaram que a concentração bruta (não diluída)

das amostras não apresentou nenhum nível de citotoxicidade para ambas as linhagens trabalhadas (RD e A549) sendo esta a concentração selecionada para dar continuidade aos ensaios.

### 5.5 ENSAIO DE DETECÇÃO DE ENTEROVÍRUS

Após a definição da concentração não-citotóxica das amostras, deu-se início aos ensaios de detecção de Enterovírus presentes nas águas da Lagoa da Conceição, utilizando a linhagem RD, conforme recomendado pela Organização Mundial da Saúde. Os resultados apontaram que 22 dentre o total de 32 amostras analisadas (68,7%) apresentaram efeito citopático característico de infecção por Enterovírus. Conforme visualizado no Quadro 3, é possível ver que Enterovírus foram detectados em amostras das três localidades selecionadas para coleta, porém em diferentes proporções.

Quadro 3 - Detecção de Enterovírus nos setes meses subsequentes ao evento de extravasamento

	P1	P2	P3
17/02/2021	+	+	+
20/03/2021	+	+	+
22/04/2021	+	+	+
29/04/2021	-	-	-
20/05/2021	-	+	-
27/05/2021	+	+	+
10/06/2021	+	+	+
23/06/2021	+	+	+
08/07/2021	-	+	+
22/07/2021	-	+	-
05/08/2021	-	-	-
19/08/2021	-	-	-

Fonte: A autora

## 5.6 ENSAIO DE DETECÇÃO DE MASTADENOVÍRUS HUMANO

Em paralelo aos ensaios de detecção de enterovírus, foram realizados experimentos para determinar a presença e viabilidade de mastadenovírus humanos nas amostras coletadas na Lagoa da Conceição. Para este fim, foi utilizada a linhagem celular A549, permissiva a este vírus respiratório. Apenas as coletas referentes aos dois meses após o evento de extravasamento apresentaram positividade em cultura celular. Para determinar o número de partículas infecciosas presentes nestas amostras, foi realizado ensaio de placa de lise, sendo sua concentração determinada por Unidades Formadoras de Placa/Litro (UFP/L) e expressas na Tabela 4.

Tabela 4 - Concentração de mastadenovírus humano detectado nos primeiros dois meses de análise

	P1	P2	P3
17/02/2021	420000 UFP/L	63000 UFP/L	4500 UFP/L
20/03/2021	37000 UFP/L	43000 UFP/L	42000 UFP/L

Fonte: A autora

## 5.7 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

Para avaliar a presença de vírus fastidiosos que não se replicam em cultura celular, foram realizadas rodadas de RT-PCR em tempo real para os vírus da hepatite A, rotavírus A, norovírus humano do tipo GI e GII e SARS-CoV-2, além de PCR tempo real e PCR qualitativo para confirmar a detecção de mastadenovírus humanos e enterovírus, respectivamente. Nenhuma das amostras apresentaram positividade para os vírus de interesse por meio de métodos moleculares. Devido a boa recuperação do controle interno semeado nas amostras anteriormente ao processo de concentração, é válido inferir que estes patógenos não encontravam-se presente nas águas da Lagoa da Conceição nos pontos analisados, ou possa haver ocorrido algum processo de inibição da reação de amplificação para estes vírus, desafio já relatado em diversos trabalhos que envolvem análise molecular de amostras ambientais (IJZERMAN et al., 1997; SCHRADER et al., 2012; TROMBLEY HALL et al., 2013). No caso do mastadenovírus humano e dos enterovírus que foram

detectados em cultura celular mas não em análises moleculares, é possível que encontravam-se em concentrações tão baixas nas amostras concentradas, que foi necessária sua replicação em cultivo celular para que pudesse ser detectada suas presenças.

As amostras que apresentaram positividade para Enterovírus foram encaminhadas para genotipagem na FIOCRUZ, porém não foram obtidos resultados positivos para as análises moleculares. A incapacidade de detecção de enterovírus em amostras que se apresentaram positivas em cultivo celular pode ser decorrente de uma baixa concentração viral ou de uma alta especificidade dos iniciadores utilizados.

## 5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 5.8.1 Correlação entre a presença de contaminação viral e bacteriana

Através da realização de histogramas contendo a distribuição dos dados de detecção de *Escherichia coli* e enterovírus e da realização do Teste de Shapiro foi possível determinar que estas variáveis não seguem a distribuição normal, sendo recomendada a realização de testes não-paramétricos. Os valores de  $p$  obtidos através do Teste de Shapiro para determinar a normalidade da distribuição da presença de patógenos virais e bacterianos foi de, respectivamente,  $p=0,017$  e  $p=0,006$ . Valores de  $p$  abaixo do índice de confiabilidade 0,05 sugerem que se trata de dados com distribuição fora do normal, sendo esta a conclusão obtida através desta análise.

Apesar da distribuição fora do normal, foram realizados os testes paramétricos Teste-T de Student e o teste de Coeficiente de Correlação de Pearson, já que são ensaios sensíveis que permitem a aplicação em dados que destoam da distribuição normal. O Teste-t, cuja função é avaliar se os dados diferem de forma estatisticamente significativa, obteve como resultado o valor de  $p = 0,015$ . Valores de  $p$  menores que 0,05 indicam que os dados obtidos não variam por acaso, sendo variáveis que diferem de forma significativa. De acordo com este resultado, deve-se rejeitar a hipótese nula de que não há correlação entre as variáveis analisadas, que neste caso foram a detecção de enterovírus e *E. coli*.

Através da aplicação do teste de Coeficiente de Correlação de Pearson, cujo resultado indica o nível de correlação dos dados de acordo com sua proximidade ao valor -1 ou 1. O resultado deste teste indicou  $r = -0,44$ , demonstrando uma correlação negativa entre a presença dos patógenos analisados. Nesse sentido, através de um resultado de Teste-T de  $p = 0,015$  e de Pearson de  $r = -0,44$  é possível concluir que a contaminação viral e bacteriana não ocorre por acaso, sendo uma associação linear negativa. Ou seja, quando a concentração de vírus presentes aumenta, a de coliformes diminui, sendo o recíproco verdadeiro.

### **5.8.2 Correlação entre índices de pluviosidade e contaminação bacteriana**

Para avaliar se há correlação entre os índices de pluviosidade e a contaminação bacteriana presente na Lagoa da Conceição, foram aplicados o Teste-t de Student e o teste de Correlação de Pearson. O valor obtido com o Teste-t ( $p = 0,04$ ) indica que a hipótese nula, que sugere que os dados se distribuem ao acaso, deverá ser rejeitada e a hipótese alternativa, que há algum tipo de associação entre os dados, provavelmente estará correta. Quanto ao teste de Pearson, foi obtido como resultado o valor  $r = 0,9$ . Devido a proximidade com o valor limite que este teste pode fornecer, é possível determinar que há associação positiva entre as variáveis analisadas. Ou seja, a pluviosidade provavelmente influencia na presença de *E. coli* na Lagoa da Conceição.

## **6 DISCUSSÃO**

Por meio da realização deste trabalho foi possível evidenciar que o extravasamento de efluentes sanitários, inclusive após tratamento, pode ser um risco para a integridade ambiental de ecossistemas brasileiros. A lagoa de evapoinfiltração localizada na ETE Lagoa da Conceição foi utilizada como depósito de esgoto já tratado, que retornaria ao ambiente através do escoamento natural pelo solo. O rompimento da barragem que continha os efluentes sanitários presentes nesta lagoa acabou por fazer com que milhares de litros destes resíduos fossem descartados de forma abrupta no interior da Lagoa da Conceição, possivelmente contaminando este ambiente com patógenos resistentes ao processo de desinfecção.

O trabalho de Schlindwein et al. (2010) evidenciou a presença e infectividade de vírus entéricos em amostras de lodo e águas residuais tratadas coletados em uma ETE localizada em Florianópolis. Após a realização dos métodos de concentração baseados em adsorção e eluição (águas residuais) e polietilenoglicol (lodo), metodologias descritas por Katayama et al. (2002) e Lewis e Metcalf (1988), respectivamente, Schlindwein inoculou os concentrados em culturas celulares permissivas aos vírus de interesse, além de realizar PCR e RT-PCR para confirmar a detecção. Como resultado, todas as amostras de lodo e 75% das amostras de águas residuais contavam com a presença do genoma de mastadenovírus humanos e 91,7% de todas as amostras apresentaram positividade para Poliovírus em cultura celular.

Sabe-se, através de estudos como de Bosch et al. (2008) e Okoh et al. (2010), que os vírus entéricos resistem a diversos tratamentos aplicados rotineiramente em ETE. Okoh e sua equipe evidenciaram que tratamentos utilizando lodo ativado, tanques oxidativos, carbono ativado, filtração e coagulação removem apenas entre 50 e 90% dos vírus presentes no esgoto. Através do guia de qualidade da água potável, a OMS aponta que agentes virais específicos podem ser menos sensíveis aos processos de desinfecção quando comparados com a estabilidade de bactérias e protozoários (OMS, 2021). Atrelando a resistência aos processos de tratamento com a baixa dose infecciosa e a persistência em condições desfavoráveis no ambiente aquático, a contaminação de recursos hídricos por vírus entéricos causam preocupações quanto à saúde pública.

O trabalho de coleta, processamento e realização dos ensaios de detecção, executados durante esta pesquisa, corroborou com a hipótese de que a Lagoa da Conceição estaria contaminada por vírus entéricos, devido aos resultados positivos obtidos nos ensaios de detecção de *Enterovirus* e *Mastadenovirus humano*. No entanto, apesar da provável influência da presença do efluente sanitário extravasado na contaminação deste ecossistema, é possível que a Lagoa da Conceição já contasse com a presença de patógenos entéricos antes do evento de rompimento da lagoa de evapoinfiltração.

De acordo com o Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento, o índice de atendimento pela rede coletora de esgoto em Florianópolis é de 65% (SNIS, 2018), um índice relativamente baixo quando comparado com outras capitais brasileiras como São Paulo (92,6%) e Curitiba (96,3%) (MASSA E FILHO, 2020).

Florianópolis ainda possui outro desafio, além da necessidade de expansão da cobertura de saneamento básico. Atualmente a disposição final dos efluentes tratados acaba utilizando corpos hídricos da ilha como bacias e lagos. No entanto, essa alternativa enfrenta algumas adversidades, já que os maiores recursos hídricos da ilha são a baía norte e sul, que são ambientes semifechados, e lagunas e lagoas, como a Lagoa da Conceição, que é um ambiente praticamente fechado, com uma baixa taxa de vazão e diluição, além de ser um ecossistema complexo e delicado (FLORIANÓPOLIS, 2021).

Complementando as questões de logística de coleta e descarte pós-tratamento, a cidade de Florianópolis vem se consolidando como um polo turístico da região Sul, recebendo milhares de turistas anualmente. Esse processo produz um incremento populacional significativo que ultrapassa as diretrizes existentes contidas nos Planos Diretores, tornando-se uma expansão descontrolada em desacordo com a capacidade de saneamento e com o planejamento para evitar a degradação do meio ambiente (FLORIANÓPOLIS, 2021). Estes fatores, a baixa cobertura da rede coletora de esgoto, as adversidades do processo de descarte de efluentes tratados e o grande inchaço populacional que a cidade de Florianópolis sofre, principalmente em época de veraneio, contribuem para o descarte contínuo de efluentes sanitários contaminados com a presença de patógenos entéricos em grandes corpos de água da ilha.

Apesar da suspeita que o extravasamento ocorrido em janeiro de 2021 tenha contribuído para a contaminação viral existente na Lagoa da Conceição, os fatores mencionados anteriormente levam à conclusão de que este ambiente provavelmente já se encontrava contaminado com patógenos resistentes ao processo de tratamento inclusive anteriormente à este evento. Estudos realizados por Moresco et al. (2012) e Rigotto et al. (2010) demonstraram que a contaminação deste ambiente de laguna por vírus entéricos é um problema recorrente e a detecção de uma variedade de espécies destes patógenos já era uma realidade a dez anos atrás.

No trabalho de Rigotto e equipe, amostras de água foram coletadas da Lagoa da Conceição durante o período de junho de 2007 a maio de 2008. Apesar da concentração da salinidade da água desta lagoa classificá-la como um ambiente de água salobra, as amostras foram processadas de acordo com a metodologia descrita por Katayama et al. (2002) para concentração de água doce. Através de ensaios de



detecção por meio de cultura celular e análise molecular, os resultados apontaram a presença de mastadenovírus humanos em 75% das amostras e Rotavírus A e vírus da Hepatite A presentes em 16,6% das amostras. A contaminação por vírus entéricos na Lagoa da Conceição evidenciada por este estudo corrobora a hipótese que este ambiente vem sendo receptor do descarte inapropriado de resíduos sanitários. No entanto, a alta prevalência de mastadenovírus humanos nas amostras também pode estar relacionada à resistência deste vírus ao processo de cloração para desinfecção aplicado nas ETE de Florianópolis (DE ABREU CORRÊA et al., 2012).

De forma semelhante, no trabalho de Moresco amostras de água da Lagoa da Conceição foram coletadas durante o período de agosto de 2009 a julho de 2010 e, assim como no presente trabalho, foram concentradas a partir do método de floculação orgânica padronizado por Calgua (2008). Após processamento, Moresco e equipe realizaram PCR quantitativo e qualitativo visando a detecção de uma variedade de vírus entéricos (mastadenovírus humanos, poliomavírus cepa JC, vírus da hepatite A e norovírus humano tipo GI e GII). Os resultados obtidos apontaram a presença dos vírus da hepatite A e mastadenovírus humanos em concentrações de  $1 \times 10^2$  CG/L e  $1 \times 10^5$  CG/L, respectivamente.

Estes trabalhos corroboram com a hipótese de que a Lagoa da Conceição acaba por ser um ambiente hídrico que sofre com o descarte inapropriado de dejetos humanos, ou que acaba por receber uma dose de patógenos que são naturalmente resistentes aos processos de desinfecção usualmente aplicados nas ETE. No entanto, não necessariamente descartam a suspeita que o evento de rompimento do talude de contenção da lagoa de evapoinfiltração tenha contribuído para a presença de *Enterovirus* e *Mastadenovirus humano* na Lagoa da Conceição.

Como não há legislação vigente que recorra à análise da presença de vírus entéricos como indicadores do padrão de qualidade sanitária necessária à determinação de balneabilidade, não é possível estabelecer se a presença destes patógenos excede um limite considerado seguro para a população. No entanto, devido às propriedades naturais das partículas virais deste grupo, principalmente relacionadas à dose infecciosa e a resistência a condições desfavoráveis, é possível concluir que os resultados obtidos em cultura celular são suficientes para determinar que a Lagoa da Conceição oferece riscos quanto ao contato direto com suas águas.

Com o objetivo de determinar se há correlação entre a contaminação viral e bacteriana presente na Lagoa da Conceição, Moresco também inoculou suas amostras em kits de detecção de *E. coli*, contabilizando as colônias que se desenvolveram em 24 e 48 horas. De forma semelhante aos resultados obtidos neste trabalho, Moresco e sua equipe também demonstraram que há uma grande variação no nível de contaminação por *E. coli* ao longo dos meses. A média de detecção de *E. coli* no período analisado por Moresco foi de 250 UFC/100 mL, porém com uma variação entre 0 a 6000 UFC/100 mL. Apesar do valor de contaminação por *E. coli* exceder o exigido na legislação, não houve correlação entre a contaminação viral e bacteriana detectada, sendo o aumento no nível de detecção de *E. coli* um fenômeno relacionado ao aumento da pluviosidade recorrente nos meses de inverno e à diminuição da salinidade local.

Através do escoamento dos centros urbanos, incrementado pela ação da chuva intensa, patógenos contidos nestes ambientes atingem corpos hídricos, aumentando a taxa de contaminação por coliformes. Estas águas residuais também causam o efeito de redução da salinidade do ambiente marinho ou salobro, facilitando a persistência de patógenos na água, já que a salinidade oferece maior resistência à viabilidade destes agentes bacterianos afetando sua fisiologia celular.

No caso deste estudo, o mês com o maior índice de detecção de *E. coli* também foi o mês com a maior média de precipitação mensal. Apesar dos efeitos do despejo de um grande volume de águas residuais ocorrido após o evento de extravasamento, trabalhos como o de Moresco e a distância temporal entre o ocorrido e o mês com maior detecção de coliformes, sugerem que a contaminação por patógenos entéricos presentes neste ambiente está relacionada principalmente com parâmetros como a pluviosidade e o escoamento urbano, por consequência.

De acordo com os dados climatológicos de Florianópolis, fornecidos pela organização Weather Spark, durante o ano de 2021, os meses de abril e maio apresentaram a menor pluviosidade, com índices de 84,2 e 85,6 mm de chuva respectivamente. Comparando com os meses em que ocorrem o verão (dezembro-fevereiro), cuja precipitação média foi de 142,6 mm, é possível afirmar que abril e maio foram meses extremamente secos (Weather Spark, 2021). Julho foi o mês com o maior índice de precipitação, com uma média de 97,2 mm de chuva. Corroborando com o que foi observado por Moresco e sua equipe, durante a realização deste

trabalho os meses mais secos foram os que apresentaram menor taxa de contaminação da água por *E. coli*, enquanto o mês mais chuvoso (julho) também foi o que apresentou uma maior taxa de concentração de UFC/100mL.

Através do Teste-t de Student e do cálculo do Coeficiente de Correlação de Pearson foi possível determinar que de fato há correlação entre a pluviosidade e presença de *Escherichia coli*. O resultado do Teste-t ( $p = 0,04$ ) indica que a hipótese nula, que sugere que a distribuição dos dados ocorre de forma aleatória, deve ser rejeitada, havendo algum tipo de associação entre os dados analisados. De acordo com o resultado do teste de Pearson, cujo resultado foi muito próximo ao valor máximo de 1 (0,9) indica que há correlação entre os dados analisados. Por fim, associando ambos as análises e considerando a literatura revisada, é possível afirmar que a pluviosidade e a detecção de *E. coli* possuem correlação positiva, ou seja, quando o nível de precipitação aumenta, se eleva também a taxa de contaminação do ambiente hídrico analisado por coliformes.

Os resultados obtidos através da análise estatística levam à conclusão de que a presença de *Escherichia coli* na Lagoa da Conceição está relacionada com os índices pluviométricos mensais. No entanto, devido ao histórico desse ecossistema e à literatura anteriormente mencionada, não se deve descartar a hipótese que este ambiente sofre com a ação antrópica e com o despejo inadequado de resíduos tratados e não-tratados, que acabam por contaminar as águas da lagoa com patógenos entéricos.

Uma vez no ambiente, bactérias como a *E. coli* podem permanecer viáveis por um ou dois dias em água marinha, até alguns poucos meses no solo, Berthe et al. (2013) realizou experimentos avaliando a viabilidade de 88 isolados de *Escherichia coli* obtidos de amostras ambientais em corpos de água doce. Os isolados permaneceram infecciosos por 2 a 14 dias, sendo que a metade perdeu viabilidade com 3 dias em ambiente aquático. Essa resistência varia conforme o fenótipo da *Escherichia coli* presente, porém também é afetado por parâmetros físico-químicos da água, como pH, temperatura, turbidez, salinidade, teor de oxigênio dissolvido, concentração de partículas em suspensão e presença de matéria orgânica, conforme evidencia Rozen e Belkin (2005) e Van Elsas et al. (2011).

Conforme já mencionado, os vírus entéricos já foram reconhecidos como agentes causadores de surtos de gastroenterites não-bacterianas relacionadas ao

contato com águas que estavam em conformidade com o padrão bacteriológico preconizado na legislação. Estes vírus possuem propriedades que os tornam mais resistentes às condições ambientais desfavoráveis, permanecendo infecciosos no ambiente aquático por um período muito maior quando comparados com bactérias como a *Escherichia coli*. Nesse sentido, os resultados deste trabalho, que apontam a inexistência de uma correlação entre contaminação viral e bacteriana, vão de acordo com o estabelecido pelo trabalho de Lee et al. (2013), Fong e Lipp (2005) e Ley et al. (2002).

Conforme o trabalho de Wong et al. (2009) a taxa com que vírus e bactérias entéricas são excretados nas fezes, bem como diferenças na resistência aos processos usuais de tratamento de esgoto e às condições desfavoráveis no ambiente, fazem com que as bactérias não sejam indicadores de contaminação fecal precisos. Nesse sentido, o resultado obtido neste trabalho corrobora com o apresentado por estes pesquisadores, já que não foi evidenciada nenhuma relação entre a presença de indicadores bacterianos e a contaminação por vírus comprovada pelos ensaios em cultura celular. Possivelmente, a detecção de *E. coli* nestas amostras indica uma contaminação recente e recorrente, já que há flutuação entre períodos com alta detecção da bactéria e momentos em que este valor se encontra dentro do permitido pela legislação.

Como anteriormente mencionado, a análise de amostras ambientais, principalmente de águas, requer a etapa da concentração de partículas virais presentes em grandes volumes para que se otimizem os ensaios de detecção. Utilizando a metodologia desenvolvida por Calgua et al. (2008) para processamento de amostras de água do mar, obteve-se um índice de recuperação de 5,84% e 8,91% de MHV-3 e MNV, respectivamente. Esta taxa de recuperação baixa quando comparada com a obtida pelo desenvolver do método, que atingiu uma recuperação entre 42,53 - 49,33% em água marinha natural, pode ser explicada por variações na natureza da amostra que acabaram influenciando a recuperação dos vírus ali presentes.

Estudos prévios como o de Gonzales-Gustavson et al. (2017) obtiveram maiores taxas de recuperação dos vírus semeados como controles internos ao executarem o método de concentração através da floculação orgânica em amostras de águas potável, obtendo uma taxa de recuperação de 66% para mastadenovírus

humanos e 28% para rotavírus A. De forma semelhante, Assis et al. (2018) avaliou a recuperação destes mesmos vírus em amostras de águas residuais, obtendo índices de recuperação entre 12,6 - 69,8%. Ao adaptar sua metodologia para amostras de água de rios, Calgua et al. (2013) obteve uma recuperação entre 20 - 95% dos vírus entéricos utilizados como controle do processo de concentração. Apesar de apontarem uma melhor recuperação das partículas virais utilizando o método de floculação orgânica, Assis e Calgua também apontaram inibição das reações moleculares devido a compostos presentes nas amostras de água analisadas. Como as amostras coletadas para análise neste trabalho também foram obtidas do ambiente, é possível que a inibição das reações moleculares seja um dos motivos para a baixa recuperação dos vírus semeados no início do procedimento de concentração.

Em relação a detecção de Enterovírus, 68,7% das amostras coletadas, processadas e analisadas obtiveram resultado positivo para a presença de Enterovírus em cultura celular. No entanto, nenhum resultado positivo foi obtido ao realizar RT-PCR para estas mesmas amostras. Monpoeho et al. (2001) avaliou a presença e infectividade de Enterovírus em amostras de esgoto coletadas em uma estação de tratamento na França. Ao comparar os resultados obtidos através da análise em cultura celular e os ensaios moleculares, detectou-se o genoma de Enterovírus em 41 amostras que não apresentaram viabilidade em cultura celular. De forma contrária, 12 amostras continham partículas virais viáveis, porém não apresentaram positividade após a realização de RT-PCR (MONPOEHO et al. 2001).

A discrepância entre os resultados obtidos a partir de análises moleculares e em cultura celular podem ser justificadas pela presença de partículas virais danificadas, porém que ainda apresentam um capsídeo protegendo o material genético e impedindo sua degradação (no caso de amostras positivas para RT-PCR e negativas em cultura celular) ou também pela presença de inibidores de reações moleculares (no caso de amostras positivas em cultura celular, porém negativas para RT-PCR). Estes inibidores podem estar presentes na amostra ou serem inseridos durante seu processamento. Através da inibição parcial ou total da reação de PCR, a sensibilidade de detecção do genoma viral decai, resultando em falsos-negativos (SCHRADER et al., 2012).

As amostras coletadas da Lagoa da Conceição caracterizam-se como amostras ambientais, sendo uma categoria de análise que geralmente conta com a presença de substâncias orgânicas e inorgânicas que agem como inibidoras da reação de PCR. O processo de concentração, intrínseco à análise de grandes volumes de água, também acaba por concentrar substâncias inibidoras, como ácidos húmicos e fúlvicos, que geralmente estão presentes em solos e são capazes de inibir as reações moleculares mesmo quando presentes em baixíssimas concentrações (IJZERMAN et al., 1997).

Amostras advindas de locais que possuem contato com efluentes sanitários também podem ter a reação de PCR prejudicada por outras substâncias como lipídeos, proteínas, polifenóis e metais pesados (SCHRADER et al., 2012). No caso da Lagoa da Conceição, por se tratar de um local onde a contaminação por efluentes sanitários é reconhecidamente um problema, é possível especular que há componentes presentes na água que agem inibindo a reação de PCR. No entanto, como foram obtidos bons resultados de recuperação dos controles internos semeados nas amostras, é possível que a inexistência de resultados positivos para Enterovírus por análise molecular decorra de outra irregularidade, como uma alta especificidade dos iniciadores, por exemplo.

Em relação à presença de Enterovírus nos pontos analisados, foi possível detectar uma distribuição homogênea das partículas virais infecciosas, estando presente em todas as localidades analisadas. Estudos prévios realizados na Lagoa da Conceição por Fonseca (2010) e Silva (2013) demonstraram uma maior heterogeneidade e estratificação na coluna d'água localizada próxima ao oceano e na região central da lagoa, quando comparada com a orla voltada para o interior da ilha. Dessa forma é possível inferir que devido à distância do ponto de conexão entre a lagoa e o oceano, local onde ocorre a troca de água com o mar adjacente, os pontos avaliados neste trabalho acabam tendo menor escoamento e baixa velocidade de recirculação, concentrando uma maior proporção de nutrientes orgânicos e inorgânicos, material particulado e contaminação fecal (FONSECA et al., 2010b; SILVA et al., 2013).

Dentre os pontos analisados, o local de coleta com maior número de amostras positivas para a presença de Enterovírus foi P2, caracterizado por estar próximo a uma avenida com grande circulação de automóveis. A recorrência na detecção de

Enterovírus neste local, que atinge 75% das amostras coletadas, pode ser explicada pelas características presentes neste ambiente. A localização deste ponto, situado na rua Osni Ortiga, sofre intensa influência antrópica pois está muito próximo a um fluxo constante de automóveis, a residências e empreendimentos, sendo também utilizado para atividades recreativas.

O segundo ponto com maior taxa de detecção de Enterovírus foi P3, com 58,3% das amostras apresentando efeitos citopáticos característicos deste vírus em cultura celular. Este ponto está localizado em um condomínio residencial que, apesar de contar com baixo fluxo de carros e pedestres, contém muitas moradias localizadas exatamente ao entorno da lagoa. A CASAN, em parceria com a Prefeitura Municipal, verificou que, no início do ano de 2021, 91% dos imóveis localizados na Lagoa da Conceição apresentam alguma irregularidade nas ligações hidrossanitárias (CASAN, 2021b).

Do total de 278 residências, comércios e condomínios vistoriados, 238 não apresentavam Caixa de Gordura ou sifão, estruturas que impedem a obstrução da tubulação e o consequente extravasamento do esgoto para as ruas, atingindo a lagoa. Também foi constatado que 54 imóveis estavam parcialmente conectados à rede coletora, enquanto 23 não estavam sequer ligados, descartando a totalidade de seus resíduos no ambiente. Estes dados refletem a necessidade do mapeamento e regularização dos sistemas de coleta e tratamento de esgoto, principalmente com a crescente urbanização e adensamento populacional que vem ocorrendo na região do entorno da Lagoa da Conceição nos últimos anos.

Por fim, o ponto que apresentou menor taxa de detecção de enterovírus foi P1, caracterizado por ser um local com maior tráfego de embarcações de médio e pequeno porte. Do total de 12 coletas realizadas, 50% das amostras indicaram a presença de enterovírus. Apesar de ser um ponto localizado na região central do bairro que permeia a Lagoa da Conceição, o trânsito de pessoas e de automóveis, bem como a presença de residências e comércios, não é tão evidente neste local. No entanto, a detecção da presença de contaminação por vírus entéricos em metade das amostras coletadas ainda representa um padrão de contaminação bem distribuído pela orla da lagoa.

Se tratando da presença de mastadenovírus humanos, estes patógenos estavam presentes na Lagoa da Conceição, nas localidades amostradas, apenas nos

dois meses subsequentes ao evento de extravasamento. Metodologias baseadas em ensaios em cultura celular possuem a vantagem de evidenciar a presença de partículas virais infecciosas, quando em comparação com métodos moleculares, que detectam apenas a presença do genoma do vírus. A obtenção de resultados positivos para mastadenovírus humanos em cultura celular e a ausência de detecção por ensaios moleculares sugerem que há presença de inibidores de reações moleculares nas amostras ou que contavam com um título viral tão baixo que apenas a replicação em cultura celular permitiu que fosse evidenciada sua presença.

Para determinar o padrão de contaminação ambiental da Lagoa da Conceição por vírus entéricos, seria necessário a ampliação deste estudo. No entanto, é possível inferir que locais que contam com maior presença de residências, comércios e condomínios acabam por ter um maior trânsito de pessoas e automóveis e, por consequência, possuem também um maior nível de descarte de efluentes sanitários no meio ambiente.

## 7 SUMÁRIO DE RESULTADOS E CONCLUSÃO

No início do ano de 2021, o talude de areia que dava suporte e sustento à lagoa de evapoinfiltração da Estação de Tratamento de Esgoto localizada às margens da Lagoa da Conceição se rompeu, liberando milhares de litros de águas residuais tratadas para o interior da lagoa. Apesar de ser o destino de esgoto já tratado, estas amostras podem conter patógenos resistentes ao processo de desinfecção comumente aplicado, como os vírus entéricos. Para avaliar se o evento de extravasamento de efluentes sanitários para a Lagoa da Conceição contaminou este ambiente hídrico com patógenos entéricos, realizaram-se coletas nos sete meses subsequentes ao ocorrido. Através do processamento e análise destas amostras foi possível evidenciar que a Lagoa da Conceição se encontrava contaminada por vírus entéricos pertencentes aos gêneros *Enterovirus* e *Mastadenovirus humano*. Verificou-se também a presença de *Escherichia coli*, bactéria indicadora de contaminação fecal, em concentrações que ultrapassam o limite preconizado pela legislação.

Através deste trabalho, que visou um monitoramento em larga escala da presença de patógenos entéricos neste ambiente hídrico já fragilizado, foi possível evidenciar que a contaminação deste ambiente não é uma suposição, sendo um



potencial risco para a saúde de indivíduos que possuem contato direto ou indireto, através do consumo de alimentos, com as águas da Lagoa da Conceição. Apesar de ter sido um evento que afetou em diversos níveis a integridade deste ecossistema, é possível que este ambiente já se encontrava contaminado com patógenos entéricos, devido ao seu histórico de ocupação populacional associado a uma baixa cobertura do sistema de coleta e tratamento de esgoto. O padrão de detecção de mastadenovírus humanos, presente apenas nos dois meses subsequentes ao rompimento da lagoa, sugere a influência deste evento na contaminação da lagoa. A detecção de enterovírus, no entanto, cuja presença foi mais notória, não exclui essa possibilidade, porém também demonstra que a contaminação deste ambiente através do descarte inapropriado de dejetos é recorrente, já que há períodos em que estes vírus deixam de ser detectados e, após um período, novamente estão presentes nas amostras.

Por fim, o padrão de detecção de coliformes fecais nas amostras analisadas sugerem que, conforme o relatado em literatura, não há associação linear positiva entre a contaminação viral e bacteriana neste ambiente. As análises realizadas em cima destes resultados apontam, inclusive, uma correlação negativa entre a presença dos dois patógenos: ao passo em que há detecção de *Enterovirus*, a taxa de *Escherichia coli* presente nas amostras se reduz. Este dado é importante para ressaltar como não há confiabilidade do padrão de análise de qualidade da água para consumo e balneabilidade exigido pela legislação. Vírus entéricos muitas vezes estão presentes em águas que se encontram de acordo com o padrão de qualidade sanitária exigido, oferecendo assim riscos de infecção à população. A presença de coliformes termotolerantes parece estar mais bem relacionada com os níveis de precipitação mensais, que acabam realizando o escoamento da contaminação sanitária presentes nos centros urbanos para o interior de corpos d'água.

Considerando o evento do extravasamento de esgoto sanitário na Lagoa da Conceição e dificuldades de enfrentamento aos lançamentos de esgotos irregulares em corpos hídricos, medidas preventivas podem acionadas para que os locais destinados ao descarte final do esgoto tratado de fato fossem capazes de acolher o grande volume de efluentes sanitários ali depositados, levando em conta que o verão, estação responsável por trazer milhares de turistas para Florianópolis, é uma temporada com grandes volumes de precipitação. De forma semelhante, não foram

executadas ações de mitigação para avaliar e conter os riscos que patógenos resistentes ao processo de tratamento na ETE poderiam oferecer à população. O processo de recuperação deste ambiente após evento de extravasamento limitou-se à remoção do material decorrente do rompimento da lagoa e a coleta de parâmetros físico-químicos, medidas que não possuem relação com a contaminação microbiana deste ambiente.

Conclui-se que estudos de monitoramento ambiental como este são importantes para evidenciar urgente melhoria no processo de tratamento e descarte de efluentes sanitários, bem como evidenciar necessidade de maior segurança sanitária em águas balneáveis e de recreação.

## REFERÊNCIAS

- ABBASZADEGAN, Morteza et al. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1318-1324, 1993.
- ADAMS, W. R.; KRAFT, L. M. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science*, v. 141, n. 3578, p. 359-360, 1963.
- ADLER, Jonathan L.; ZICKL, Raymond. Winter vomiting disease. **The Journal of infectious diseases**, v. 119, n. 6, p. 668-673, 1969.
- ASSIS, Andrêssa Silvino Ferreira et al. Adenovirus and rotavirus recovery from a treated effluent through an optimized skimmed-milk flocculation method. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 17, p. 17025-17032, 2018.
- AUSAR, Salvador F. et al. Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles: effect of pH and temperature. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 28, p. 19478-19488, 2006.
- BAERT, Leen et al. Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 2, p. 543-546, 2008.
- BENKŐ, Mária et al. ICTV virus taxonomy profile: Adenoviridae 2022. **Journal of General Virology**, v. 103, n. 3, p. 001721, 2022.
- BERTHE, T. et al. Evidence for coexistence of distinct *Escherichia coli* populations in various aquatic environments and their survival in estuary water. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 15, p. 4684-4693, 2013.
- BESSELSSEN, David G.; WAGNER, April M.; LOGANBILL, Jessie K. Detection of rodent coronaviruses by use of fluorogenic reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. **Comparative medicine**, v. 52, n. 2, p. 111-116, 2002.
- BISHOP, Ruth F et al. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. **The Lancet**, v. 302, n. 7841, p. 1281-1283, 1973.
- BISHOP, Ruth F et al. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. **The Lancet**, v. 303, n. 7849, p. 149-151, 1974.
- BISHOP, Ruth F. et al. Clinical immunity after neonatal rotavirus infection: a prospective longitudinal study in young children. **New England Journal of Medicine**, v. 309, n. 2, p. 72-76, 1983.

BISHOP, Ruth. Discovery of rotavirus: Implications for child health. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 24, p. S81-S85, 2009.

BOOM, R. C. J. A. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of clinical microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BORCHARDT, Mark A. et al. Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 2, p. 1172-1180, 2003.

BOSCH, Albert. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. **Int Microbiol**, v. 1, n. 3, p. 191-6, 1998.

BOSCH, Albert et al. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 295-301, 2008.

BOTÂNICA, Departamento de. **Nota técnica sobre O rompimento da barragem da CASAN**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2021. 8 p. Acesso em: 12 set. 2022.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Hepatites Virais**. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/h/hepatites-virais>. Acesso em: 15 out. 2022.

BRITO, Wagner Izidoro de; SOUTO, Francisco José Dutra. Vacinação universal contra hepatite A no Brasil: análise da cobertura vacinal e da incidência cinco anos após a implantação do programa. **Revista Brasileira de epidemiologia**, v. 23, p. e200073, 2020.

BROOKS, Hilary A.; GERSBERG, Richard M.; DHAR, Arun K. Detection and quantification of hepatitis A virus in seawater via real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 127, n. 2, p. 109-118, 2005.

CALGUA, B. et al. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. **Journal of virological methods**, v. 153, n. 2, p. 79-83, 2008.

CALGUA, Byron et al. Detection and quantification of classic and emerging viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas. **Water research**, v. 47, n. 8, p. 2797-2810, 2013.

CASAN. COMPANHIA CATARINENSE DE ÁGUAS E SANEAMENTO. . **Relatório de Monitoramento da Lagoa da Conceição**: relatório de comprovação da execução dos programas ambientais da autorização ambiental nº 003/floram/2021.. Florianópolis: Governo de Santa Catarina, 2021a. 33 p.

CASAN. COMPANHIA CATARINENSE DE ÁGUAS E SANEAMENTO. . **TRATO PELA LAGOA REGISTRA 91% DE IRREGULARIDADE NA LIGAÇÃO DE ESGOTO**. 2021b. Acesso em: 12 nov. 2022.

CASAS, I. et al. Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples: comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequencing of products. **Journal of medical virology**, v. 65, n. 1, p. 138-148, 2001.

CDC. Centers For Disease Control And Prevention. Division Of Viral Hepatitis. **Hepatitis A Questions and Answers for Health Professionals**. 2020. ESTADOS UNIDOS. Acesso em: 29 out. 2022.

CEBEY-LÓPEZ, Miriam et al. Viral co-infections in pediatric patients hospitalized with lower tract acute respiratory infections. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0136526, 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Etymologia: coxsackievirus**. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 18, n. 11, p. 1871-1871, nov. 2012. Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION et al. Enterovirus surveillance guidelines: guidelines for enterovirus surveillance in support of the Polio Eradication Initiative. 2015.

CERRADA-ROMERO, Cristina et al. Excretion and viability of SARS-CoV-2 in feces and its association with the clinical outcome of COVID-19. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1-5, 2022.

CESARI, C. et al. Detection of enteroviruses from urban sewage in Parma. **Acta Biomed**, v. 81, n. 1, p. 40-6, 2010.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **RESOLUÇÕES DO CONAMA Nº273, DE 29 DE NOVEMBRO DE 2000**. [s.l: s.n.]. Acesso em: 23 set. 2022.

CHOUDHARY, Madhu Chhanda. **Echovirus Infection**. 2019. University of Pittsburgh School of Medicine. Acesso em: 29 set. 2022.

CLIMATE DATA (Florianópolis). **CLIMA FLORIANÓPOLIS (BRASIL)**. 2021. Acesso em: 7 dez. 2022.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **RESOLUÇÃO CONAMA Nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005**. [s.l: s.n.]. Acesso em: 23 set. 2022.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **RESOLUÇÃO CONAMA Nº 393, DE 08 DE AGOSTO DE 2007**. [s.l: s.n.]. Acesso em: 23 set. 2022.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **RESOLUÇÃO CONAMA Nº 397, DE 03 DE ABRIL DE 2008**. [s.l: s.n.]. Acesso em: 23 set. 2022.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **RESOLUÇÃO CONAMA Nº 410, DE 04 DE MAIO DE 2009**. [s.l: s.n.]. Acesso em: 23 set. 2022.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **RESOLUÇÃO CONAMA Nº 430, DE 13 DE MAIO DE 2011**. [s.l: s.n.]. Acesso em: 23 set. 2022.

COSTAN-LONGARES, A. et al. Occurrence and distribution of culturable enteroviruses in wastewater and surface waters of north-eastern Spain. **Journal of applied microbiology**, v. 105, n. 6, p. 1945-1955, 2008.

CORMAN, Victor M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 3, p. 2000045, 2020.

CORTESE, Margaret M.; HABER, Penina. Rotavirus. **Centro de Controle e Prevenção de Doenças**, Estados Unidos, p. 289-300, ago. 2021. Acesso em: 16 out. 2022.

CRAWFORD, Sue E. et al. Rotavirus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 1-16, 2017.

CROMEANS, Theresa L. et al. Development of plaque assays for adenoviruses 40 and 41. **Journal of Virological Methods**, v. 151, n. 1, p. 140-145, 2008.

CROSS, G. F.; MARMION, B. P.. Cell culture and infectious hepatitis. **Cab Direct**, Estados Unidos, v. 2, n. 26, p. 1214-1217, jan. 1966.

DALLDORF, Gilbert; SICKLES, Grace M. An unidentified, filtrable agent isolated from the feces of children with paralysis. **Science**, v. 108, n. 2794, p. 61-62, 1948.

DA SILVA, Allegra Kyria et al. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 24, p. 7891-7897, 2007.

DAVIDSON, G. P. et al. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. **The Lancet**, v. 305, n. 7901, p. 242-246, 1975.

DE ABREU CORRÊA, Adriana et al. Comparative inactivation of murine norovirus, human adenovirus, and human JC polyomavirus by chlorine in seawater. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 18, p. 6450-6457, 2012.

DE BENEDICTIS, Paola et al. Astrovirus infections in humans and animals—molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 7, p. 1529-1544, 2011.

DE GRAAF, Miranda; VAN BEEK, Janko; KOOPMANS, Marion PG. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 7, p. 421-433, 2016.

DOLIN, Raphael et al. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 140, n. 2, p. 578-583, 1972.

DROSTEN, Christian et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. **New England journal of medicine**, v. 348, n. 20, p. 1967-1976, 2003.

ELMAHDY, M. E. I. et al. Spatial distribution of enteric viruses and somatic coliphages in a Lagoon used as drinking water source and recreation in Southern Brazil. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 219, n. 7, p. 617-625, 2016.

EMANUEL SOARES (Florianópolis). Grupo Conexão. **FOTOS: Rompimento de lagoa artificial provoca caos na Lagoa da Conceição e pessoas ficam ilhadas**. 2021. Acesso em: 15 nov. 2022.

ESPOSITO, Susanna et al. Epidemiology and clinical characteristics of respiratory infections due to adenovirus in children living in Milan, Italy, during 2013 and 2014. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0152375, 2016.

FEINSTONE, Stephen M.; KAPIKIAN, Albert Z.; PURCELL, Robert H. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. **Science**, v. 182, n. 4116, p. 1026-1028, 1973.

FEINSTONE, Stephen M. History of the discovery of hepatitis A virus. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 9, n. 5, p. a031740, 2019.

FISCHER, Thea K. et al. The burden of rotavirus disease in Denmark 2009–2010. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 30, n. 7, p. e126-e129, 2011.

FLETCHER, Stephanie et al. Descriptive epidemiology of infectious gastrointestinal illnesses in Sydney, Australia, 2007–2010. **Western Pacific surveillance and response journal: WPSAR**, v. 6, n. 4, p. 7, 2015.

FLORIANÓPOLIS. PREFEITURA MUNICIPAL DE FLORIANÓPOLIS. **PLANO MUNICIPAL DE SANEAMENTO BÁSICO**. Florianópolis: Governo de Santa Catarina, 2021. 273 p.

FONG, Theng-Theng; LIPP, Erin K. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 69, n. 2, p. 357-371, 2005.

FONG, Theng-Theng et al. Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 3, p. 715-723, 2010.

FONGARO, Gislaine et al. Evaluation and molecular characterization of human adenovirus in drinking water supplies: viral integrity and viability assays. **Virology journal**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2013.

FONGARO, Gislaine et al. Human and animal enteric virus in groundwater from deep wells, and recreational and network water. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 24, p. 20060-20066, 2015.

FONSECA, ALESSANDRA; BRAGA, ELISABETE S.; EICHLER, BEATRIZ B. Distribuição espacial dos nutrientes inorgânicos dissolvidos e da biomassa

fitoplanctônica no sistema pelágico da Lagoa da Conceição, Santa Catarina, Brasil (Setembro, 2000). **Atlântica, Rio Grande**, v. 24, n. 2, p. 69-83, 2002.

FONSECA, A. et al. CARACTERÍSTICA FÍSICA, QUÍMICA E BIOLÓGICA AO LONGO DA COLUNA D'ÁGUA SOB INFLUÊNCIA DE EVENTO ANÓXICO NA LAGOA DA CONCEIÇÃO (SC, BRASIL). III Congresso Brasileiro de Oceanografia, Rio Grande (RS), 17 a 21 de maio de 2010.

FONSECA, José Carlos Ferraz da. Histórico das hepatites virais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, p. 322-330, 2010.

FORMIGA-CRUZ, Meritxell et al. Nested multiplex PCR assay for detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. **Journal of virological methods**, v. 125, n. 2, p. 111-118, 2005.

GANTZER, Christophe et al. Influence of environmental factors on the survival of enteric viruses in seawater. **Oceanologica Acta**, v. 6, n. 21, p. 983-992, 1998.

GINSBERG, Harold S. (Ed.). **The adenoviruses**. Springer Science & Business Media, 2013.

GODOY, Fabio Bertini. **Modelagem hidrológico-hidrodinâmica da Lagoa da Conceição - SC**. 2009. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

GONZALES-GUSTAVSON, Eloy et al. Characterization of the efficiency and uncertainty of skimmed milk flocculation for the simultaneous concentration and quantification of water-borne viruses, bacteria and protozoa. **Journal of microbiological methods**, v. 134, p. 46-53, 2017.

HADLER, Stephen C. et al. Hepatitis A in day-care centers: a community-wide assessment. **New England Journal of Medicine**, v. 302, n. 22, p. 1222-1227, 1980.

HARAMOTO, Eiji et al. A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. **Water research**, v. 135, p. 168-186, 2018.

HARVALA, Heli et al. Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. **Journal of clinical virology**, v. 101, p. 11-17, 2018.

HEJKAL, Thomas W. et al. Distribution of viruses associated with particles in waste water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 628-634, 1981.

HENDRICKS, Rahzia; POOL, Edmund John. The effectiveness of sewage treatment processes to remove faecal pathogens and antibiotic residues. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 47, n. 2, p. 289-297, 2012.

HERNROTH, Bodil E. et al. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first



Scandinavian report. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4523-4533, 2002.

HERZOG, Petra; DROSTEN, Christian; MÜLLER, Marcel A. Plaque assay for human coronavirus NL63 using human colon carcinoma cells. **Virology journal**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2008.

HOLMES, Kathryn V. Enteric infections with coronaviruses and toroviruses. In: **Gastroenteritis Viruses: Novartis Foundation Symposium 238**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2001. p. 258-275.

HYYPÄÄ, T.; HARVALA, H.. Echoviruses☆. **Reference Module In Biomedical Sciences**, [S.L.], p. 65-71. 2015. Elsevier.

IBRAHIM, Yassein M. et al. Potential Zoonotic Swine Enteric Viruses: The Risk Ignored for Public Health. **Virus Research**, p. 198767, 2022.

ICTV, International Committee On Taxonomy Of Viruses. **Virus Taxonomy: 2021 release**. 37. ed. Estados Unidos: National Institutes Of Health, 2021.

IJZERMAN, M. Marian; DAHLING, Daniel R.; FOUT, G. Shay. A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of virological methods**, v. 63, n. 1-2, p. 145-153, 1997.

IMA, Instituto do Meio Ambiente de Santa Catarina. **Informação Técnica IMA/DIEA nº 4/2020**.: monitoramento ambiental da lagoa da conceição. Florianópolis: Instituto do Meio Ambiente de Santa Catarina, 2020. 12 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Atlas geográfico das zonas costeiras e oceânicas do Brasil. 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Governo Federal. **Pesquisa nacional de saneamento básico : 2017 : abastecimento de água e esgotamento sanitário / IBGE, Coordenação de População e Indicadores Sociais**. **Ibge**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 628, p. 1-128, jan. 2017.

JACOBSEN, Kathryn H.; WIERSMA, Steven T. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. **Vaccine**, v. 28, n. 41, p. 6653-6657, 2010.

JIANG, Sunny; NOBLE, Rachel; CHU, Weiping. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 179-184, 2001.

JIN, Ying-Hui et al. A rapid advice guideline for the diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infected pneumonia (standard version). **Military Medical Research**, v. 7, n. 1, p. 1-23, 2020.

JOTHIKUMAR, N. et al. Development and evaluation of a broadly reactive TaqMan assay for rapid detection of hepatitis A virus. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 6, p. 3359-3363, 2005.

KAGEYAMA, Tsutomu et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1548-1557, 2003.

KAPIKIAN, Albert Z. et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. **Journal of virology**, v. 10, n. 5, p. 1075-1081, 1972.

KATARŽYTĚ, M. et al. Fecal contamination in shallow temperate estuarine lagoon: Source of the pollution and environmental factors. **Marine pollution bulletin**, v. 133, p. 762-772, 2018.

KATAYAMA, Hiroyuki; SHIMASAKI, Akihiro; OHGAKI, Shinichiro. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1033-1039, 2002.

KAWASHIMA, Irina Yuri et al. SARS-CoV-2 host prediction based on virus-host genetic features. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2022.

KESWICK, B. H. et al. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 261-264, 1985.

KIM, Tae Kyun. T test as a parametric statistic. **Korean journal of anesthesiology**, v. 68, n. 6, p. 540-546, 2015.

KING, Andrew MQ et al. (Ed.). Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, 2011.

KIRBY, Amy E.; TEUNIS, Peter F.; MOE, Christine L. Two human challenge studies confirm high infectivity of Norwalk virus. *The Journal of infectious diseases*, v. 211, n. 1, p. 166-167, 2015.

KOCWA-HALUCH, R. Waterborne enteroviruses as a hazard for human health. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 10, n. 6, p. 485-488, 2001.

KORAJKIC, Asja; MCMINN, Brian R.; HARWOOD, Valerie J. Relationships between microbial indicators and pathogens in recreational water settings. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 15, n. 12, p. 2842, 2018.

LEE, Gyu-Cheol et al. A 5-year survey (2007–2011) of enteric viruses in Korean aquatic environments and the use of coliforms as viral indicators. **Microbiology and Immunology**, v. 57, n. 1, p. 46-53, 2013.

LE GUYADER, Françoise S. et al. Detection and quantification of noroviruses in shellfish. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 3, p. 618-624, 2008.

LE GUYADER, Françoise S.; ATMAR, Robert L.; LE PENDU, Jacques. Transmission of viruses through shellfish: when specific ligands come into play. **Current opinion in virology**, v. 2, n. 1, p. 103-110, 2012.

LEON D. Detection of enteroviruses and hepatitis A virus in environmental samples by gene probes and polymerase chain reaction. **Advances in Water Analysis and Treatment: Proceeding of the Water Quality Technology Conference**, 833-853, 1990

LEWIS, Gillian D.; METCALF, Theodore G. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1983-1988, 1988.

LEY, Victoria; HIGGINS, James; FAYER, Ronald. Bovine enteroviruses as indicators of fecal contamination. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 3455-3461, 2002.

LI, Qun et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus–infected pneumonia. **New England journal of medicine**, 2020.

LIU, Chunyan et al. Adenovirus infection in children with acute lower respiratory tract infections in Beijing, China, 2007 to 2012. **BMC infectious diseases**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2015.

LOBARINHAS, Daniela et al. Determinação da interface água doce/água salgada no litoral de Viana do Castelo (NW de Portugal) com recurso ao método da resistividade eléctrica. 2011.

LYSÉN, Maria et al. Genetic diversity among food-borne and waterborne norovirus strains causing outbreaks in Sweden. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2411-2418, 2009.

MACHADO, Bianca Coelho. Avaliação da qualidade dos efluentes das lagoas de estabilização em série da estação de tratamento de esgoto de Samambaia-DF: para o cultivo de tilápia (*Oreochromis niloticus*). 2006.

MACKOWIAK, Martin et al. Distribution of *Escherichia coli*, coliphages and enteric viruses in water, epilithic biofilms and sediments of an urban river in Germany. **Science of the Total Environment**, v. 626, p. 650-659, 2018.

MALHERBE, H. H.; STRICKLAND-CHOLMLEY, M. Simian virus SA11 and the related 0 agent. **Archiv für die gesamte Virusforschung**, v. 22, n. 1, p. 235-245, 1967.

MARTELLA, V. et al. Zoonotic aspects of rotaviruses. **Veterinary microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 246-255, 2010.

MASSA, Kaio Henrique Correa; CHIAVEGATTO FILHO, Alexandre Dias Porto. Saneamento básico e saúde autoavaliada nas capitais brasileiras: uma análise multinível. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 23, p. e200050, 2020.

MASTERS, Paul S. The molecular biology of coronaviruses. *Advances in virus research*, v. 66, p. 193-292, 2006.

MATHENY, Samuel C.; KINGERY, Joe E. Hepatitis a. **American family physician**, v. 86, n. 11, p. 1027-1034, 2012.

MEBUS, Charles Albert et al. Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak. 1969.

MELNICK, Joseph L. The discovery of the enteroviruses and the classification of poliovirus among them. **Biologicals**, v. 21, n. 4, p. 305-309, 1993.

MENA, Kristina D.; GERBA, Charles P. Waterborne adenovirus. **Reviews of environmental contamination and toxicology**, p. 133-167, 2008.

MENNECHET, Franck JD et al. A review of 65 years of human adenovirus seroprevalence. **Expert review of vaccines**, v. 18, n. 6, p. 597-613, 2019.

METCALF, T. G.; MELNICK, J. L.; ESTES, M. K. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology-a trip of over 50 years. **Annual review of microbiology**, v. 49, p. 461-488, 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA, PREVENÇÃO E CONTROLE DAS INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS, DO HIV/AIDS E DAS HEPATITES VIRAIS. Manual técnico para o diagnóstico das hepatites virais. 2018.

MONPOEHO, S. et al. Best viral elution method available for quantification of enteroviruses in sludge by both cell culture and reverse transcription-PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2484-2488, 2001.

MORESCO, Vanessa et al. Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil. **Marine pollution bulletin**, v. 64, n. 1, p. 40-48, 2012.

MORILLO, Simone Guadagnucci; TLMENETSKY, Maria do Carmo Sampaio Tavares. Norovirus: an overview. **Revista Da Associação Médica Brasileira (English Edition)**, v. 57, n. 4, p. 453-458, 2011.

MUEHLENBACHS, Atis; BHATNAGAR, Julu; ZAKI, Sherif R. Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. **The Journal of pathology**, v. 235, n. 2, p. 217-228, 2015.

NAQVI, Ahmad Abu Turab et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 10, p. 165878, 2020.

NEWTON, Alice et al. An overview of ecological status, vulnerability and future perspectives of European large shallow, semi-enclosed coastal systems, lagoons and transitional waters. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 140, p. 95-122, 2014.

NGUYEN, Kelvin T.; HAN, Steven-Huy B.. Hepatitis A and Hepatitis E. **Handbook Of Liver Disease**, [S.L.], p. 34-50, 2018. Elsevier.

OKOH, Anthony I.; SIBANDA, Thulani; GUSHA, Siyabulela S. Inadequately treated wastewater as a source of human enteric viruses in the environment. **International journal of environmental research and public health**, v. 7, n. 6, p. 2620-2637, 2010.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020**. 2020a. Estados Unidos. Acesso em: 21 out. 2022.]

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard**. 2020b. Estados Unidos. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 21 out. 2022.

PALACIOS, G.; OBERSTE, M. S. Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. **Journal of neurovirology**, v. 11, n. 5, p. 424-433, 2005.

PALMENBERG, Ann C.; GERN, James E. Classification and evolution of human rhinoviruses. In: **Rhinoviruses**. Humana Press, New York, NY, 2015. p. 1-10.

PARANHOS, Ranulfo et al. Desvendando os mistérios do coeficiente de correlação de Pearson: o retorno. **Leviathan (São Paulo)**, n. 8, p. 66-95, 2014.

PATIL, P. N.; SAWANT, D. V.; DESHMUKH, R. N. Physico-chemical parameters for testing of water-a review. **International journal of environmental sciences**, v. 3, n. 3, p. 1194, 2012.

PEREIRA, Fausto EL; GONÇALVES, Carlos S. Hepatite A. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 387-400, 2003.

PERKINS, Tracy L. et al. Decay rates of faecal indicator bacteria from sewage and ovine faeces in brackish and freshwater microcosms with contrasting suspended particulate matter concentrations. **Science of the Total Environment**, v. 572, p. 1645-1652, 2016.

PIANETTI, Anna et al. Presence of enteroviruses and reoviruses in the waters of the Italian coast of the Adriatic Sea. **Epidemiology & Infection**, v. 125, n. 2, p. 455-462, 2000.

PINO, Francisco Alberto. A questão da não normalidade: Uma revisão. **Revista de economia agrícola**, v. 61, n. 2, p. 17-33, 2014.

RAO, V. Chalapati; METCALF, Theodore G.; MELNICK, Joseph L. Human viruses in sediments, sludges, and soils. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 64, n. 1, p. 1, 1986.

REMUZZI, Andrea; REMUZZI, Giuseppe. COVID-19 and Italy: what next?. **The lancet**, v. 395, n. 10231, p. 1225-1228, 2020.

RICHARDS, Gary P. et al. Resilience of norovirus GII. 4 to freezing and thawing: implications for virus infectivity. **Food and environmental virology**, v. 4, n. 4, p. 192-197, 2012.

RIGOTTO, C. et al. Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional-PCR, nested-PCR, and integrated cell culture PCR (ICC/PCR). **Water research**, v. 39, n. 2-3, p. 297-304, 2005.

RIGOTTO, Caroline et al. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianopolis, South Brazil. **Journal of applied microbiology**, v. 109, n. 6, p. 1979-1987, 2010.

RIGOTTO, C. et al. Survival of adenovirus types 2 and 41 in surface and ground waters measured by a plaque assay. **Environmental science & technology**, v. 45, n. 9, p. 4145-4150, 2011.

ROWE, Wallace P.; HARTLEY, Janet W.; HUEBNER, Robert J. Serotype composition of the adenovirus group. **Proceedings of the Society for experimental Biology and Medicine**, v. 97, n. 2, p. 465-470, 1958.

ROZEN, Yael; BELKIN, Shimshon. Survival of enteric bacteria in seawater: Molecular aspects. In: **Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment**. Springer, Boston, MA, 2005. p. 93-107.

RUIZ-PALACIOS, Guillermo M. et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 1, p. 11-22, 2006.

RZEŻUTKA, Artur; COOK, Nigel. Survival of human enteric viruses in the environment and food. **FEMS microbiology reviews**, v. 28, n. 4, p. 441-453, 2004.

SANO, Daisuke et al. Risk management of viral infectious diseases in wastewater reclamation and reuse. **Environment International**, v. 91, p. 220-229, 2016.

SANTOS, Vanessa dos, et al. Disposição de efluentes tratados em uma lagoa de evapoinfiltração. 2018.

SCHERNEWSKI, Gerald et al. Establishing new bathing sites at the Curonian Lagoon coast: An ecological-social-economic assessment. **Journal of coastal conservation**, v. 23, n. 5, p. 899-911, 2019.

SCHLINDWEIN, A. D. et al. Detection of enteric viruses in sewage sludge and treated wastewater effluent. **Water Science and Technology**, v. 61, n. 2, p. 537-544, 2010.

SCHRADER, C. et al. PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. **Journal of applied microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1014-1026, 2012.

SHI, Pei-Yong et al. High-throughput detection of West Nile virus RNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1264-1271, 2001.

SIDHU, J. P. S. et al. Comparative enteric viruses and coliphage removal during wastewater treatment processes in a sub-tropical environment. **Science of the Total Environment**, v. 616, p. 669-677, 2018.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES SOBRE SANEAMENTO (SNIS). Diagnóstico Anual de Água e Esgoto. 2018. Brasília, DF: Ministério do Desenvolvimento Regional. Acesso em: 05 de agosto de 2019.

SHERLOCK, Sheila. Landmarks in viral hepatitis. **JAMA**, v. 252, n. 3, p. 402-406, 1984.

SILVA, Ana Elisa Pereira et al. Influência da precipitação na qualidade da água do Rio Purus. **Acta amazônica**, v. 38, p. 733-742, 2008.

SILVA, Júlia Costa. Análise numérica da influência do rio João Gualberto sobre a hidrodinâmica residual da Lagoa da Conceição-Florianópolis, SC. 2009.

SILVA, Hugo D. et al. Molecular detection of adenoviruses in lakes and rivers of Goiânia, Goiás, Brazil. **Food and Environmental Virology**, v. 2, n. 1, p. 35-40, 2010.

SILVA, Hugo D.; GARCÍA-ZAPATA, Marco TA; ANUNCIACÃO, Carlos E. Why the use of adenoviruses as water quality virologic marker?. **Food and Environmental Virology**, v. 3, n. 3, p. 138-140, 2011.

SILVA, Victor Eduardo Cury et al. Influência antrópica e da hidrodinâmica na qualidade da água e na distribuição de nutrientes e clorofila na Lagoa da Conceição-SC. **Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos (SBRH)**, v. 22, 2013.

SILVA, Alessandra Pereira da et al. Incidence of viral hepatitis in Brazil from 2009 to 2018: an epidemiological study of confirmed cases of viral hepatitis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, 2020.

SINCLAIR, R. G.; JONES, E. L.; GERBA, Charles P. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: A review. **Journal of applied microbiology**, v. 107, n. 6, p. 1769-1780, 2009.

SKRABER, Sylvain et al. Accumulation of enteric bacteriophage in fresh water sediments. **Journal of water and health**, v. 7, n. 3, p. 372-379, 2009.

SOUZA JÚNIOR, Silvio João de et al. Análise espaço-temporal recente da cobertura do solo na bacia da Lagoa da Conceição/Florianópolis aplicando índices de vegetação. 2021.

STEELE, Marina; ODUMERU, Joseph. Irrigation water as source of foodborne pathogens on fruit and vegetables. **Journal of food protection**, v. 67, n. 12, p. 2839-2849, 2004.

STRIKAS, Raymond A. et al. Active immunization. In: **Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases**. Elsevier, 2018. p. 43-71. e4.

TAYLOR, Louise H.; LATHAM, Sophia M.; WOOLHOUSE, Mark EJ. Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v. 356, n. 1411, p. 983-989, 2001.

THEBAULT, Anne et al. Infectivity of GI and GII noroviruses established from oyster related outbreaks. **Epidemics**, v. 5, n. 2, p. 98-110, 2013.

THOMPSON, Shawn S. et al. Detection of infectious human adenoviruses in tertiary-treated and ultraviolet-disinfected wastewater. **Water Environment Research**, v. 75, n. 2, p. 163-170, 2003.

THURSTON-ENRIQUEZ, Jeanette A. et al. Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 7, p. 3979-3985, 2003.

TRACY, Steven; CHAPMAN, Nora M.; MAHY, Brian WJ (Ed.). **The coxsackie B viruses**. Springer Science & Business Media, 2013.

TRIVEDI, Tarak K. et al. Clinical characteristics of norovirus-associated deaths: a systematic literature review. **American journal of infection control**, v. 41, n. 7, p. 654-657, 2013.

TROMBLEY HALL, Adrienne et al. Evaluation of inhibitor-resistant real-time PCR methods for diagnostics in clinical and environmental samples. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e73845, 2013.

TULCHINSKY, Theodore H. **Case Studies in Public Health**. Academic Press, 2018.

VAN ELSAS, Jan Dirk et al. Survival of Escherichia coli in the environment: fundamental and public health aspects. **The ISME journal**, v. 5, n. 2, p. 173-183, 2011.

VESIKARI, Timo et al. Safety and efficacy of a pentavalent human–bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 1, p. 23-33, 2006.

VINJÉ, Jan et al. ICTV virus taxonomy profile: Caliciviridae. **The Journal of General Virology**, v. 100, n. 11, p. 1469, 2019.

WADELL, Göran. Adenoviruses. **Principles and practice of clinical virology**, p. 307-327, 1999.

WEATHER SPARK (Florianópolis). Cedar Lake Ventures. **Histórico de condições meteorológicas em 2020 em Florianópolis**. 2021. Acesso em: 07 dez. 2022.

WHO. Fourth edition. Guidelines for drinking-water quality. **WHO chronicle**, v. 38, n. 4, p. 104-8, 2011.



WHO. Guidelines on recreational water quality. Volume 1: Coastal and fresh waters. 2021.

WONG, Mark et al. Evaluation of public health risks at recreational beaches in Lake Michigan via detection of enteric viruses and a human-specific bacteriological marker. **Water research**, v. 43, n. 4, p. 1137-1149, 2009.

WU, Di et al. The SARS-CoV-2 outbreak: what we know. **International journal of infectious diseases**, v. 94, p. 44-48, 2020.

ZAKI, Ali M. et al. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 19, p. 1814-1820, 2012.

ZANATTA, Lauro César; RAMAGE, Larissa. Avaliação da eficiência da infiltração de efluentes nas dunas do aquífero Campeche, Florianópolis, SC. **Águas Subterrâneas**, 2014.

ZELL, R. et al. ICTV virus taxonomy profile: Picornaviridae. **The Journal of general virology**, v. 98, n. 10, p. 2421, 2017.

ZENG, S.-Q. et al. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. **Journal of virological methods**, v. 153, n. 2, p. 238-240, 2008.

ZHU, Na et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. **New England journal of medicine**, 2020.

ZOU, Lirong et al. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. **New England journal of medicine**, v. 382, n. 12, p. 1177-1179, 2020.