



**Thierry Júnior Gomes** Desinfecção de águas residuais na mitigação do SARS-CoV-2 por Tratamento fotodinâmico antimicrobiano (aPDT)



Universidade de Aveiro  
2021

**Thierry Júnior Gomes    Desinfecção de águas residuais na mitigação do SARS-CoV-2 por Tratamento fotodinâmico antimicrobiano (aPDT)**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Teresa Peixoto de Campos Gomes, Investigadora Auxiliar do Centro de Investigação Interdisciplinar em Saúde da Universidade Católica Portuguesa e coorientação da Professora Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida, Professora Catedrática do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Este trabalho foi financiada pela FCT/MCT através do suporte financeiro das unidades de investigação LAQV-REQUIMTE (UIDB/50006/2020) e CESAM (UID/AMB/50017/2019 e UIDB/50017/2020 + UIDP/50017/2020), e pelos projetos da FCT (PREVINE-FCT-PTDC/ASP-PES/29576/2017) através de fundos nacionais (OE) e, co-financiada pelo *FEDER-Operational Thematic Program for Competitiveness and Internationalization - COMPETE 2020*, dentro do *PT2020 Partnership Agreement*, e pelo *Portuguese NMR Network*.

Dedico este trabalho à minha família

## **o júri**

Presidente

**Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves**  
Professora Associada, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

Arguente

**Ana Sofia Direito dos Santos Duarte**  
Professora Auxiliar, Universidade Católica Portuguesa

Orientadora

**Ana Teresa Peixoto de Campos Gomes,**  
Investigadora Auxiliar, Universidade Católica Portuguesa

## **agradecimentos**

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade de concretizar mais um objetivo.

Agradeço à Professora Doutora Adelaide Almeida pela oportunidade concedida em trabalhar no Laboratório de Microbiologia Aplicada mas também pela orientação, disponibilidade, preocupação e correções na minha dissertação.

Agradeço à Maria Bartolomeu por estar sempre presente desde o meu primeiro dia de trabalho, por ter sido paciente e incansável comigo, pelas sugestões, correções e incentivo ao longo desse ano.

Agradeço à Doutora Ana Gomes pela disponibilidade, pela ajuda no trabalho experimental e escrita e também pela motivação.

Agradeço à Professora Doutora Susana Loureiro e ao Fábio Campos pela oportunidade de trabalhar com as dáfnias para assim complementar a minha dissertação.

Agradeço aos colegas de Laboratório de Microbiologia Aplicada, pela ajuda, pelas sugestões e correções, convívios e momentos de descontração, e pelos bolos e doces.

Agradeço à minha família, em especial à minha mãe biológica por incentivar-me a fazer este Mestrado e pelo amor e apoio que nunca me faltou, à minha mãe adotiva por tornar-me aquilo que sou hoje, e ao meu pai adotivo por nunca ter desistido de mim.

Agradeço a todos os meus amigos, que sempre me apoiaram nos momentos mais difíceis e por terem acreditado em mim.

## palavras-chave

SARS-CoV-2; Terapia fotodinâmica antimicrobiana; azul de metileno; desinfecção de águas residuais.

## resumo

A pandemia de COVID-19, provocada pelo vírus SARS-CoV-2, teve um impacto severo na saúde pública, causando milhões de mortes a nível mundial. Alguns estudos referem a presença deste vírus em águas residuais, podendo permanecer viável por vários dias, o que pode levar a potenciais riscos para a saúde pública. As águas residuais quando sujeitas a tratamentos convencionais de descontaminação microbiana por aplicação de luz ultravioleta, de cloro e ozono, reduzem a concentração microbiana. No entanto, estes tratamentos, nomeadamente o cloro, levam à formação de subprodutos tóxicos, prejudiciais para o homem e o para o meio ambiente. Desta forma, é necessário o desenvolvimento de novas técnicas de desinfecção alternativas aos métodos convencionais. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), através do uso de fotossensibilizadores (PS), de uma fonte de luz e do oxigénio presente no meio, é uma abordagem promissora na inativação de vírus, sem contribuir para a geração de subprodutos tóxicos. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência da aPDT na inativação do bacteriófago phi6, selecionado como um modelo do vírus SARS-CoV-2 em águas residuais. Os ensaios de aPDT foram realizados numa solução tampão (PBS) e em água residual tratada secundariamente filtrada e não filtrada, na presença da azul de metileno (AM) como PS e a uma fonte de luz branca com uma irradiância de 50 mW cm<sup>-2</sup>. Os resultados obtidos indicam que a aplicação da aPDT com AM inativou o bacteriófago phi6 em PBS e na água residual de forma eficiente. Considerando que os efluentes tratados são libertados no meio ambiente, neste trabalho foi também avaliada a toxicidade da solução gerada (efluente após tratamento por aPDT) no organismo modelo *Daphnia magna*. Estes ensaios foram desenvolvidos de acordo com o protocolo da OCDE 2004, na qual as dáfnias foram expostas à água residual e a vários PSs à concentração de 10 µM por um período de 48 horas. Quando estes organismos foram expostos a aPDT usando o AM como PS foi possível observar uma taxa de sobrevivência de 20%. No entanto, quando este tratamento foi realizado com outros PSs, tais como uma porfirina tetracatiónica e uma ftalocianina, foi possível verificar que as taxas de sobrevivência das dáfnias foram mais baixas do que a obtida com o AM. Os resultados da inativação do vírus modelo phi6 sugerem que metodologia aPDT com o AM é capaz de fotoinativar eficientemente o modelo do SARS-CoV-2. Os resultados mostram ainda que a solução que resulta após a aplicação de aPDT provavelmente não apresentará toxicidade para os organismos presentes no meio recetor, dada a diluição a que este será sujeito aquando da sua descarga no meio ambiente

**keywords**

SARS-CoV-2; antimicrobial photodynamic therapy, methylene blue, wastewater disinfection

**abstract**

The COVID-19 pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus had promoted a severe impact on public health, causing millions of deaths worldwide. Several studies reported the presence of this virus in wastewater, which may be viable for several days, leading to potential public health risks. Wastewater, when treated with conventional methods for microbial decontamination by applying ultraviolet light, chlorine and ozone, reduce the microbial concentration. However, these treatments lead to the formation of toxic by-products, namely the chlorine, harmful to humans and to the environment. In this regard, it is necessary to develop alternative disinfection techniques to the conventional ones. Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT), through the use of photosensitizers (PS), a light source and oxygen present in the medium, is a promising approach to virus inactivation, without contributing to the generation of toxic by-products. Thus, the aim of the study was to evaluate the efficiency of aPDT in the inactivation of phi6 bacteriophage, selected as a model of the SARS-CoV-2 virus, in wastewater. The aPDT assays were carried out in a buffer solution (PBS) and in secondarily treated wastewater filtered and unfiltered, in the presence of methylene blue (AM) as PS and a white light source with an irradiance of 50 mW cm<sup>-2</sup>. The results showed that the use of aPDT with AM efficiently inactivated the phi6 bacteriophage in PBS and in wastewater. Considering that treated effluents are released into the environment, this work also evaluated the toxicity of the generated solution (effluent after treatment by aPDT) in the model organism *Daphnia magna*. This study was developed according to the 2004 OECD protocol, in which daphnia were exposed to wastewater and several PSs at a concentration of 10 µM during 48 hours. When these organisms were submitted to the aPDT protocol using AM as PS it was possible to observe a daphnia's survival rate of 20%. However, when this treatment was carried out with other PSs, such as a tetra-cationic porphyrin and a phthalocyanine, it was possible to verify that survival rates of daphnia were lower than the ones achieved with AM. The results of the aPDT inactivation of the phi6 model virus suggests that this methodology is capable to efficiently photoinactivate the SARS-CoV-2 model. Moreover, the solution that results of the application of aPDT probably will not present toxicity to the organisms present in the medium receptor, due to the dilution that it will be subjected to upon discharge in the environment.

## Índice

<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1) VÍRUS PATOGÉNICOS EM ÁGUAS RESIDUAIS .....	2
1.2) SARS-COV-2 NO MEIO AMBIENTE E EM ÁGUAS RESIDUAIS .....	4
1.3) MÉTODOS USADOS NO TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS .....	6
1.4) APDT COMO ALTERNATIVA NA DESINFECÇÃO DE ÁGUAS RESIDUAIS .....	11
1.4.1) PRINCÍPIOS E MECANISMOS DA APDT.....	11
1.4.2) FOTOSENSIBILIZADORES (PS) .....	15
1.4.3) FATORES QUE AFETAM A TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA .....	16
1.4.4) VANTAGENS E LIMITAÇÕES DA APDT .....	17
1.5) Uso de bacteriófagos como modelo de vírus de mamíferos para avaliar a eficácia da aPDT.....	18
<b>Capítulo II. “Desinfecção de água residual na mitigação do SARS-CoV-2 através da aPDT” .....</b>	<b>27</b>
<b>1) INTRODUÇÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
2.1) AMOSTRA DE ÁGUAS RESIDUAIS .....	33
2.2) ESTIRPE BACTERIANA E CONDIÇÕES DE CULTURA .....	33
2.3) PREPARAÇÃO DO BACTERÍOFAGO .....	34
2.4) ENSAIOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA .....	34
2.4.1) FOTOSENSIBILIZADOR .....	34
2.4.2) CONDIÇÕES DE IRRADIAÇÃO.....	35
2.4.3) CONTROLOS .....	35
2.4.4) Ensaios de fotoinativação em PBS .....	35
2.4.5) Ensaios de fotoinativação em água residual filtrada .....	36
2.4.6) Ensaios de fotoinativação em água residual não filtrada .....	37
2.4.7) QUANTIFICAÇÃO DOS BACTERÍOFAGOS.....	37
2.5) ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37



<b>RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
3.1) Ensaio aPDT em PBS .....	38
3.2) Ensaio aPDT em água residual filtrada.....	39
3.3) Ensaio aPDT em água residual não filtrada .....	40
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
<i>Capítulo III. “Avaliação do impacto da emissão de água tratada por aPDT nos organismos presentes nas águas recetoras”</i> .....	<b>50</b>
<b>1) INTRODUÇÃO</b> .....	<b>53</b>
1.1) ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS .....	53
<b>2) MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>55</b>
2.1) AMOSTRA DE ÁGUAS RESIDUAIS .....	55
2.2) FOTOSENSIBILIZADORES.....	56
2.3) CONDIÇÕES DE IRRADIAÇÃO .....	56
2.4) ENSAIOS DE TOXICIDADE.....	56
2.4.1) Ensaio de toxicidade aguda em água residual – teste de imobilização de <i>Daphnia magna</i> .....	56
2.4.2) Ensaio de toxicidade aguda com azul de metileno – teste de imobilização com <i>Daphnia magna</i> .....	57
<b>3) Resultados</b> .....	<b>58</b>
3.1) Ensaio de toxicidade aguda em água residual .....	58
3.2) Ensaio de toxicidade aguda com o azul de metileno .....	59
3.3) Ensaio de toxicidade aguda, para efeitos de comparação entre fotossensibilizadores	60
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>61</b>
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>65</b>
<b>PERSPETIVA FUTURAS</b> .....	<b>66</b>

## Lista de abreviaturas e acrónimos

aPDT	<i>Antimicrobial Photodynamic Therapy</i>
AM	Azul Metileno
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
ETAR	Estação de Tratamento de Água Residual
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline solution</i>
PS	<i>Photosensitizers</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavírus 2</i>
Tetra-Py(+)-Me	<i>5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin tetra-iodide</i>
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFP	Unidades Formadoras de Placas

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Ocorrência de alguns vírus patogênicos em águas residuais.....	<b>4</b>
<b>Figura 2.</b> Imagem ao microscópio eletrônico de transmissão.....	<b>5</b>
<b>Figura 4.</b> Desinfecção por tratamento químico e irradiação.....	<b>10</b>
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de tipo I e tipo II envolvidas na aPDT.....	<b>13</b>
<b>Figura 6.</b> Fotoinativação do bacteriófago phi6, incubado com azul de metileno (AM) a 5 µM e irradiado com luz branca artificial (50 mW cm <sup>-2</sup> ) por 30 minutos, em PBS. ....	<b>38</b>
<b>Figura 7.</b> Fotoinativação do bacteriófago phi6, em águas residuais filtradas (filtro de porosidade 0,22 µm), incubado com azul de metileno (AM) a 5 µM e irradiado com luz branca artificial (50 mW cm <sup>-2</sup> ) por 90 minutos. Os valores são expressos como a média de três ensaios independentes para cada amostra de água residual.....	<b>39</b>
<b>Figura 8.</b> Fotoinativação do bacteriófago phi6, incubado com azul de metileno (AM), em água residual não filtrada, sob irradiação com luz branca artificial (50 mW cm <sup>-2</sup> ) por 90 minutos. Os valores são expressos como média de três ensaios independentes.....	<b>40</b>
<b>Figura 9.</b> Sobrevivência de <i>Daphnia magna</i> exposta, durante 48h, a água residual tratada secundariamente.....	<b>58</b>
<b>Figura 10.</b> Sobrevivência de <i>Daphnia magna</i> exposta, durante 48 h, ao azul de metileno irradiado e não irradiado.....	<b>59</b>
<b>Figura 11.</b> sobrevivência de <i>Daphnia magna</i> exposta, durante 48 h, aos fotossensibilizadores azul de metileno, porfirina tetracatiônica e ftalocianina.....	<b>60</b>

## OBJETIVOS E ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Este trabalho teve como principal objetivo avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) na inativação do SARS-CoV-2 em águas residuais. Para este estudo utilizou-se o bacteriófago ( $\phi$ 6) como modelo do SARS-CoV-2. Os objetivos específicos foram: (1) o estudo de várias condições para estabelecimento de um protocolo de aPDT eficiente para a inativação do fago  $\phi$ 6 em águas residuais; e (2) avaliar o impacto da emissão de água tratada por aPDT num organismo-modelo *Daphnia magna*, representante dos organismos naturalmente presentes nas águas recetoras.

De acordo com os objetivos estabelecidos:

- O 1º capítulo desta dissertação compreende uma introdução geral às questões relacionadas com a descoberta do vírus SARS-CoV-2, a pandemia COVID-19, a contaminação das águas residuais pelo vírus, o risco de exposição a essas águas contaminadas, os métodos usados no tratamento de águas residuais e a terapia fotodinâmica antimicrobiana como uma alternativa na desinfecção das águas residuais.
- O 2º capítulo consiste no estudo da inativação do bacteriófago  $\phi$ 6 em água residual usando como metodologia a aPDT. É referido um enquadramento da problemática da contaminação das águas residuais por SARS-CoV-2 e de uma possível solução para a descontaminação (a terapia fotodinâmica antimicrobiana). Neste capítulo é descrito todo o trabalho realizado, desde a configuração experimental até à obtenção dos resultados e a discussão dos mesmos.
- O 3º capítulo consiste na avaliação da toxicidade do fotossensibilizador usado no estudo anterior, após este ser irradiado. Para tal, realizaram-se estudos de toxicidade com o microcrustáceo *Daphnia magna*.

## CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

Em 11 de Março de 2020 a OMS declarou a situação de Pandemia depois de 114 países detetarem a nova Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2), cujos primeiros casos de pessoas infetadas por este vírus foram detetados em Wuhan (China) em finais de 2019. Esta doença foi denominada de COVID-19 pela própria OMS<sup>1</sup>. Filogeneticamente o vírus SARS-CoV-2 pertence ao género *Betacoronavirus*, e à família dos *Coronaviridae*. Estes vírus podem infetar os humanos, e apresentarem tropismos por diversos tecidos, desencadeando doença que vai de moderada a severa, e em certos casos pode causar morte<sup>2,3</sup>.

Os sintomas mais frequentes desta doença são: tosse, febre, pneumonia grave e rinorreia. No entanto, os pacientes podem apresentar outros sintomas como dor de cabeça, manifestações neurológicas, dores musculares e sintomas gastrointestinais<sup>1,2</sup>. A diarreia é um sintoma frequente em pacientes com a COVID-19, havendo alguns estudos que mostram a presença do SARS-CoV-2 em amostras de fezes<sup>3-7</sup>. Outros estudos mostram que em pacientes infetados pelo vírus, mesmo sem sintomas gastrointestinais ou diarreia, apresentam RNA do vírus detetável nas fezes<sup>8</sup>.

Os impactos a nível económico e de saúde pública provocados pela pandemia foram sendo mais notórios à medida que as informações e evidências científicas começam a fluir. No entanto, os impactos ambientais permanecem como uma lacuna no conhecimento e carecem de mais investigação<sup>9,10</sup>. Apesar de vários estudos mencionarem impactos positivos em relação ao ambiente aquático, nomeadamente, a melhoria de parâmetros de qualidade da água em corpos de água nas áreas urbanas, como consequência da diminuição do fluxo de pessoas, outros estudos citam as consequências adversas, destacando o uso excessivo do cloro nas estações de tratamento de águas residuais (ETARs) para melhorar os processos de desinfecção e impossibilitar a libertação de vírus ativos nas águas recetoras<sup>10-14</sup>.

Com a descoberta de novos microrganismos emergentes, como é o caso do SARS-CoV-2, surgem preocupações relativamente às possíveis vias de transmissão e aos riscos que estão associados à propagação destes microrganismos no meio ambiente<sup>15</sup>. A principal via de transmissão do SARS-CoV-2 é através de gotículas respiratórias. Porém nota-se um

crecente interesse sobre a potencial disseminação do SARS-CoV-2 em águas ambientais, sobretudo em águas residuais, pois estas contêm excrementos humanos<sup>16-18</sup>

As águas residuais são toda a água procedente de residências e equipamentos públicos urbanos tais como hospitais, escolas, entre outros, bem como de determinadas indústrias (se não necessitar de tratamento específico). Essa água é direcionada, por meio da “rede de esgoto”, para estações de tratamento, onde é tratada e posteriormente lançada no meio ambiente ou reutilizada para diversos fins<sup>19</sup>.

Recentemente, investigadores em todo mundo têm estudado o comportamento do SARS-CoV-2 em diversas matrizes de águas residuais. Os primeiros estudos relataram a presença de RNA de SARS-CoV-2 em amostras de esgoto na Holanda através da detecção por qRT-PCR de 3 genes deste vírus: os genes da nucleocapside (N1-N3) e o gene do invólucro lipídico(E).<sup>19</sup>

Após epidemias recentes, há uma consciência crescente do risco de exposição a patógenos emergentes através de águas residuais. Os agentes patogénicos emergentes podem entrar nos sistemas de águas residuais a partir da descarga de agentes patogénicos através de dejetos humanos, da criação de animais e dos efluentes hospitalares. Apesar de não haver estudos que relacionem a exposição ao SARS-CoV-2 em amostras ambientais e o risco que esta apresenta para a saúde humana, é de extrema importância perceber que, se a transmissão fecal-oral deste vírus for encarada como uma possível via de transmissão, esse problema torna-se importante<sup>19,20,21</sup>.

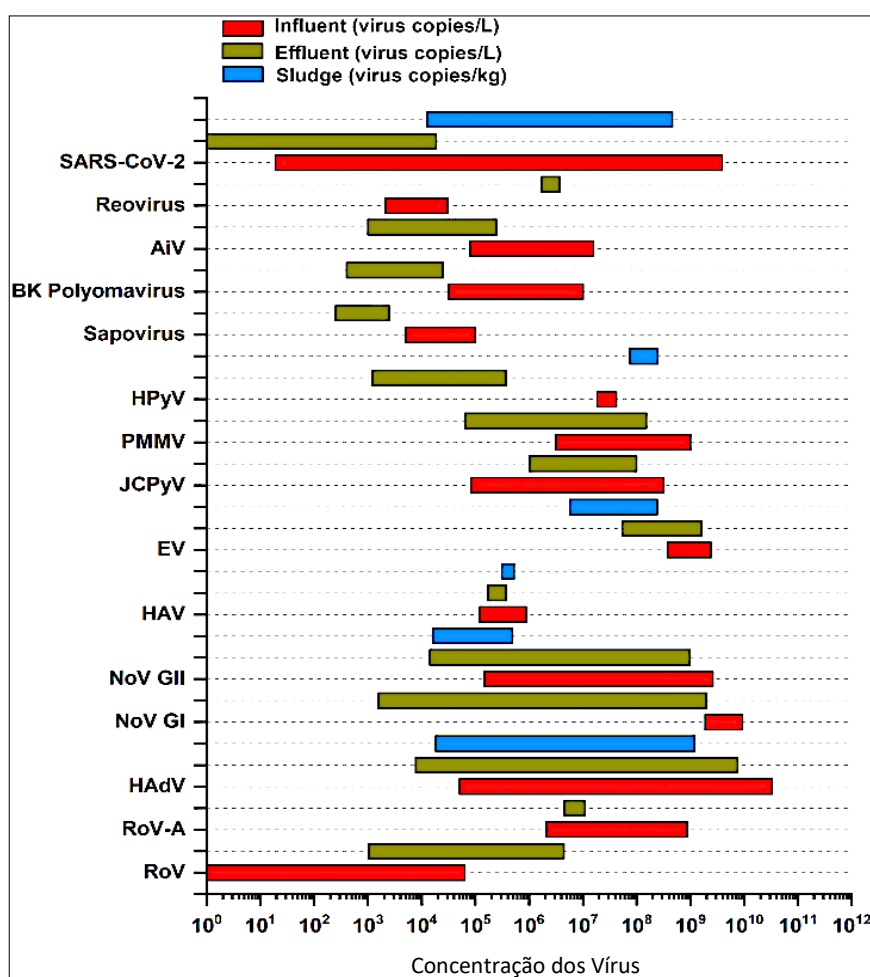
### **1.1) VÍRUS PATOGÉNICOS EM ÁGUAS RESIDUAIS**

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, constituídos por uma capsíde de proteína que pode conter um genoma linear, segmentado ou circular (de RNA ou DNA de cadeia simples ou dupla). Esta capsíde pode ou não estar envolvido por invólucro lipídico<sup>22,23</sup>. Os vírus entéricos são os mais detetados em águas residuais, em que, das mais de 100 espécies conhecidas que são excretadas pelo Homem, alguns são resistentes aos tratamentos a que estas águas residuais são submetidas<sup>22</sup>. Na maior parte dos casos, os vírus que são detetados nas fezes podem ser resultantes de: (1) resíduos de células

imunitárias que apresentam antigénios; (2) ingestão de secreções respiratórias do trato respiratório superior, podendo ser afetado pela acidez do estômago, no entanto, quando há uma certa capacidade de resistência do vírus a baixo pH ou quando combinado com alimentos podem ser capazes de chegar ao intestino; (3) replicação dos vírus em células intestinais. Estas partículas virais são posteriormente excretadas com as fezes, e, por conseguinte, chegam às estações de tratamento através dos sistemas de esgotos<sup>6,24</sup>.

Diversos estudos apontam que a concentração de partículas virais nos efluentes das ETARs pode aproximar-se a valores de  $10^9$  cópias/L de água, e neste tipo de ambiente os vírus sobrevivem por dias, semanas ou até meses<sup>25</sup>. Devido à falta de recursos hídricos, muitos países utilizam estas águas residuais tratadas para irrigação de terras agrícolas, ao mesmo tempo que o lodo destas águas é aproveitado como fertilizante. Os vírus presentes nessas águas vão, portanto, ser depositados nas áreas agrícolas, onde poderão sobreviver devido às suas capacidades de resistência, tornando-se, assim, um risco acrescido para a saúde pública, quer seja pela migração dos vírus nos solo e consequente contaminação dos leitos de água, ou mesmo pelo consumo de produtos agrícolas contaminados<sup>26</sup>.

A presença de uma grande diversidade de vírus, bem como as suas elevadas concentrações, destaca a importância do controlo e remoção de vírus no tratamento de águas residuais. Correspondentemente, a eficiência dos tratamentos aplicados na remoção de vírus devem ser determinadas com base na sua quantificação e identificação. Além disso, os vírus patogénicos presentes nas águas residuais não só representam um risco sanitário, como também permitem ter um indicador confiável da extensão da circulação dos vírus na população<sup>27</sup>. A Figura 1 ilustra alguns dos vírus patogénicos que se encontram presentes nas águas residuais.



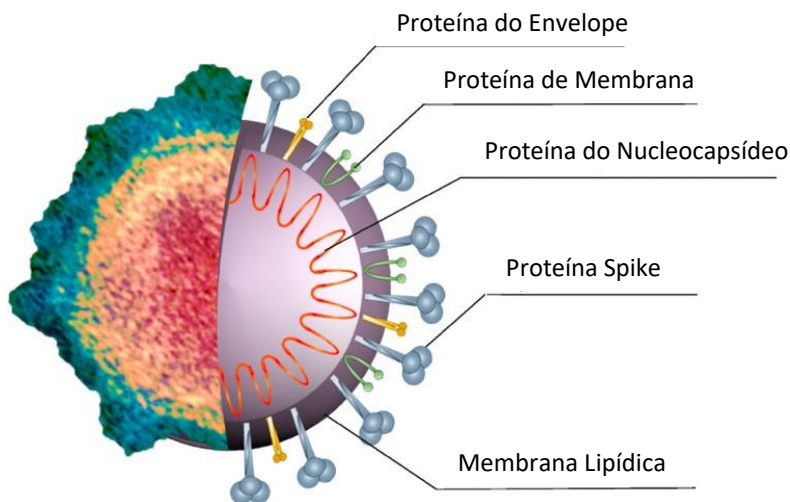
**Figura.1** – Ocorrência de alguns vírus patogênicos em águas residuais <sup>27</sup> (HPyV – Poliomavírus humano; PMMV – Vírus da mancha leve da pimenta; JCPyV – Poliomavirus humano JC; EV – Enterovírus; HAV – Vírus da hepatite A; NoV GI – Norovírus GI; NoV GII – Norovírus GII; HAdV – adenovírus humano; RoV-A – Rotavírus A; RoV – Rotavírus)<sup>25</sup>.

## 1.2) SARS-COV-2 NO MEIO AMBIENTE E EM ÁGUAS RESIDUAIS

O virião coronavírus (Fig. 2) assemelha-se a uma esfera, com um diâmetro entre 60 – 140 nm, envolvido por um invólucro viral externo coberto por projeções de 9 a 12 nm<sup>28</sup>. Estas projeções são organizadas em uma estrutura externa de característica semelhante a uma coroa (em latim *corona*) que confere o nome à família destes vírus à qual o SARS-CoV-2 pertence. O invólucro viral contém o RNA de cadeia simples positivo (ou seja, o seu RNA



genómico vai servir de RNA mensageiro) que está ligado à nucleoproteína com estrutura helicoidal<sup>29-31</sup>.



**Figura. 2** – Imagem ao microscópio eletrónico de transmissão (lado esquerdo) e representação esquemática estrutural (lado direito) do SARS-CoV-2<sup>32</sup>.

A persistência ambiental é o tempo que um organismo patogénico permanece viável fora de um hospedeiro – quanto maior é o tempo de este manter viável, maior será a possibilidade de provocar infeções<sup>33</sup>. Alguns estudos mostram que essa persistência pode ser afetada pelo tipo de ambiente (água, esgoto, superfícies) mas também pelas características químicas e físicas do ambiente (tipo de superfície, pH, exposição à luz solar, temperatura e humidade)<sup>34,35</sup>. Hoje em dia acredita-se que o vírus SARS-CoV-2 consiga sobreviver por alguns dias no meio ambiente, tempo este que pode ser suficiente para contactar com organismos hospedeiros<sup>36</sup>. Estes vírus, ao se espalharem no meio ambiente, podem sofrer mutações, como também proliferar em ambientes onde antes não eram encontrados<sup>36</sup>.

Um estudo realizado, no qual foi utilizada a técnica de sequenciação de última geração para análise de fezes, mostrou que, um paciente continuou a testar positivo para o SARS-CoV-2 nas fezes mesmo passados 38 dias após o teste de RT-PCR nasofaríngeo positivo. Este estudo sugere que este vírus pode permanecer por muito mais tempo no

trato gastrointestinal, com o paciente libertando constantemente o material genético através das fezes, aumentando a possibilidade de o vírus chegar às estações de tratamento de água residual. No entanto não se sabe se este vírus é viável e/ou transmissível através de material fecal e, em caso afirmativo, por quanto tempo pode ser contagioso<sup>37</sup>.

A concentração do material genético do SARS-CoV-2 em águas residuais não tratadas mostram que este varia de  $10^1$  a  $10^6$  cópias de genoma/L. Já as concentrações em efluentes tratados secundariamente varia entre  $10^3$  e  $10^5$  cópias de genoma/L<sup>38,39</sup>.

A deteção do SARS-CoV-2 no trato gastrointestinal, ligada ao facto de que este vírus pode invadir as células do sistema gastrointestinal e se replicar, mas também de ser capaz de se manter positivo nas fezes por algumas semanas e com isto ser libertado com as fezes, coloca em evidência um potencial risco de transmissão fecal-oral<sup>1,6,24,40-43</sup>.

### 1.3) MÉTODOS USADOS NO TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS

Quando as águas residuais são rececionadas nas ETARs, são submetidas a um conjunto de tratamentos de uma forma sequencial, como representado abaixo (Fig.3), constituído por fases e processos conceptualizados de acordo com a caracterização quantitativa e qualitativa no que diz respeito aos parâmetros químicos, físicos e microbiológicos<sup>44</sup>.



**Figura. 3** – Fases de tratamento em uma ETAR

- **Tratamento Preliminar**

Esta etapa tem por objetivo a redução e/ou eliminação de resíduos de grandes dimensões, gorduras e areias, de modo que, nos restantes procedimentos não haja quaisquer problemas mecânicos, mas também para diminuir a probabilidade de nos

circuitos hidráulicos haver entupimentos ou obstruções, para assim, melhorar a manutenção e o funcionamento das outras fases do tratamento<sup>45</sup>.

- **Tratamento Primário**

O tratamento primário tem como finalidade diminuir a quantidade dos sólidos facilmente sedimentáveis, como também gorduras, óleos, graxas, cascalho e areia, por meio de processos como a sedimentação, assentamento ou flotação. Este processo de flotação só é utilizado quando a sedimentação não é viável, como acontece com as partículas de dimensões reduzidas. Mesmo após a remoção inicial dos detritos de maiores dimensões, estas águas residuais ainda comportam partículas orgânicas e inorgânicas dissolvidos, como também sólidos suspensos, que podem ser removidos por filtração ou coagulação química<sup>44,46</sup>.

- **Tratamento Secundário**

Através do emprego de processos biológicos, esta etapa baseia-se no consumo de matéria orgânica por parte de microrganismos como as algas, protozoários e bactérias. Neste tratamento o objetivo é remover os resíduos de matéria orgânica biodegradável dissolvida, e sólidos em suspensão<sup>44,45,47,48</sup>.

O sistema de tratamento biológico em condições aeróbicas é o mais utilizado na degradação de matéria orgânica biodegradável, sendo utilizados microrganismos aeróbios (principalmente bactérias). De modo a assegurar o suprimento de oxigénio, o sistema é mantido em agitação, permitindo assim a conversão da matéria orgânica em produtos finais como dióxido de carbono, lodo (biomassa), compostos azotados e água<sup>23,49-51</sup>. Portanto, os operadores das ETARs tem como função monitorar estes microrganismos para que funcionem de forma económica e eficiente, por isso é necessário terem um conhecimento dos metabolismos destes organismos para assim controlar o processo de forma eficaz.

Os resíduos formados vão agregar-se em flocos biológicos dando origem a uma camada em torno das células<sup>23,45,52</sup>. Com o processo de decantação estes flocos biológicos

acabam por se depositarem no fundo do tanque, e por conseguinte, é feita a separação líquido-sólido<sup>23,48</sup>.

A partir desta etapa, se todos os parâmetros de águas residuais (que de acordo com a Diretiva nº 113/2012, os valores-limite de *Escherichia coli* de 1200 a 1800 CFU/100 mL e para *Enterococci* de 350 a 660 CFU/100 mL, para as águas balneares interiores ou águas balneares de transição e costeiras) estiverem abaixo desses limites, esses efluentes de água residual já são considerados suficientemente bons para serem libertados no ambiente<sup>49,50</sup>.

- **Tratamento Terciário ou avançado**

O tratamento terciário não é regularmente aplicado em todo mundo. No que se refere ao tratamento de águas residuais a Diretiva da Comissão Europeia (Diretiva 91/271/CEE) determina a aplicação obrigatória da recolha e tratamento secundário das águas residuais provenientes dos centros urbanos<sup>53-55</sup>. A utilização do tratamento terciário ou avançado é, entretanto, obrigatória quando a libertação das águas residuais é realizada em zonas sensíveis<sup>51</sup>.

Esta etapa é complementar aos tratamentos anteriormente citados, e tem como objetivo remover nutrientes e minerais de modo a proteger o meio recetor, mas também de remover/inativar microrganismos patogénicos (nomeadamente *Salmonella sp.*, vírus entéricos, coliformes fecais, entre outros)<sup>47</sup>. Um dos processos de tratamento avançados mais usados é a desinfecção. Este tipo de tratamento pode ser subdividido em três tipos principais: físico, químico e irradiação<sup>44</sup>.

Os tratamentos físicos abrangem um ou uma conjugação de tratamentos, nomeadamente adsorção de carbono, remoção de nutrientes adicionais ou filtração rápida em areia, este por sua vez, é aplicada antes da cloração para reduzir a quantidade de fosfatos, nitratos e matéria orgânica solúvel presentes, mas também remover quaisquer sólidos suspensos<sup>56</sup>. Já a desinfecção por irradiação e por produtos químicos também podem envolver um ou uma conjugação de tratamentos, tais como, exposição à luz ultravioleta, cloração ou ozonização, em que, a escolha do tratamento a ser usado vai depender da qualidade do efluente que é recebido, da manutenção e operação, do custo

e facilidade de instalação, mas também dos efeitos sobre a fauna, a flora bem como na utilização posterior da água tratada<sup>57</sup>.

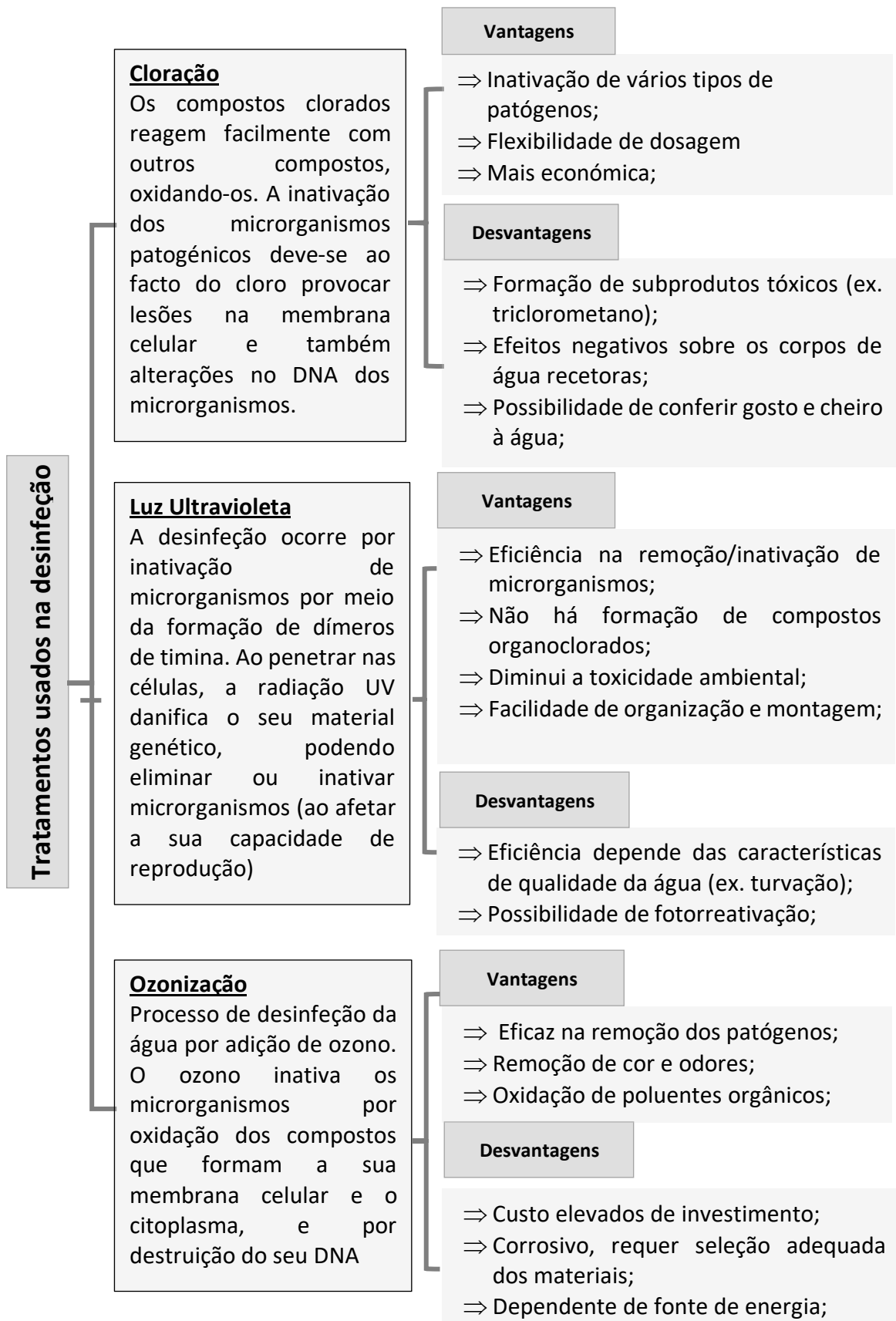
A cloração é o processo de desinfecção mais utilizado para garantir a segurança microbiológica em efluentes terciários. Para tal, adiciona-se cloro molecular ou compostos clorados, que por sua vez, interagem com os microrganismos permitindo a inativação dos mesmos<sup>58-60</sup>.

O uso massivo da cloração, contudo, possibilita a formação de subprodutos de desinfecção, causando efeitos negativos nas áreas onde estes efluentes são descarregados, mas também apresenta risco para a saúde<sup>58,60</sup>. Assim, foram desenvolvidos novos tratamentos, com o propósito de serem menos poluentes e mais eficientes na inativação/eliminação dos microrganismos.

Uma das alternativas é a utilização da luz ultravioleta (UV), no qual o alvo principal será o material genético dos microrganismos, ou seja, à medida que a radiação UV penetra na célula, esta causa danos fotoquímicos nos ácidos nucleicos, que por sua vez, vão provocar um rearranjo na informação genética e, conseqüentemente, interferir na reprodução da célula<sup>61</sup>.

Uma outra alternativa é o uso do ozono, que é um agente oxidante e com um grande impacto microbicida contra vírus, bactérias e protozoários. A sua atividade oxidativa é elevada, mas, apresenta desvantagens relacionadas com a necessidade de realizar contínuas dosagens de ozono, devido à sua instabilidade em meio líquido, permanecendo ativo por pouco tempo, isto porque, o ozono decompõe-se naturalmente na água por meio de mecanismos complexos que envolvem a formação de radicais hidroxila<sup>61,62</sup>.

Estes tratamentos apresentam algumas vantagens e desvantagens (como indicado na Figura 4).



**Figura. 4** – Desinfecção por tratamento químico e irradiação (Adaptado de Marecos do Monte, H. & Albuquerque. 2010; Naidoo et al. 2014)

Com todas as desvantagens apresentadas acima, é de se salientar também que, por vezes, os processos aplicados no tratamento de águas residuais não conseguem inativar completamente o SARS-CoV-2<sup>63</sup>. Assim a China, numa tentativa de evitar que o SARS-CoV-2 se espalhasse através das águas residuais, aumentaram o uso de cloro nas ETARs<sup>10</sup>.

Assim, há uma necessidade de aplicar novos tratamentos que sejam eficientes, de baixo custo e não prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente, com a Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT, do acrónimo em inglês: *Antimicrobial photodynamic therapy*) como um bom exemplo destes novos tratamentos para a desinfecção das águas residuais.

#### **1.4) APDT COMO ALTERNATIVA NA DESINFEÇÃO DE ÁGUAS RESIDUAIS**

A terapia fotodinâmica é um tipo de tratamento que tem sido explorado em diversas áreas da medicina, nomeadamente no tratamento contra algumas formas de cancro<sup>64</sup>. Ao longo do tempo, esta aplicação foi sendo ampliada e com isso novas terminologias foram criadas, como é o caso da terapia fotodinâmica antimicrobiana. A aPDT é apontada como uma alternativa ao uso da abordagem antibiótica comumente utilizada, isto porque, a resistência aos antibióticos por parte dos microrganismos aumentou significativamente nos últimos anos<sup>65-67</sup>.

Uma outra área em que a terapia fotodinâmica está a ser explorada é no tratamento de águas residuais, apresentando alguns resultados promissores nomeadamente: na degradação de contaminantes químicos<sup>49,68</sup>, na inativação de bactérias multirresistentes em águas residuais hospitalares<sup>69</sup> e na inativação de vírus<sup>70,71</sup>.

##### **1.4.1) PRINCÍPIOS E MECANISMOS DA APDT**

A luz, combinada com alguns compostos químicos vêm sendo usados desde há muito tempo para produzir efeitos terapêuticos. Contudo, os primeiros indícios experimentais de fotossensibilização foram reportados no final do século passado.

Observou-se que num estudo que baixas concentrações de laranja de acridina na presença da luz podia ser letal para alguns protozoários<sup>72</sup>.

Para aplicação da aPDT são necessários três componentes essenciais, e a sua eficácia depende diretamente da ação conjunta destes: 1) Fonte de luz – que pode ser artificial ou solar; 2) Fotossensibilizador – (PS, do acrónimo em inglês: *Photosensitizer*), que são compostos responsáveis pela fotossensibilização dos microrganismos; 3) oxigénio molecular – que se encontra dissolvido no meio de reação<sup>73–75</sup>. A ação destes três componentes vai permitir a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS, do acrónimo em inglês: *reactive oxygen species*) que são extremamente citotóxicas, pelo que, oxidam uma variedade de biomoléculas, induzindo assim danos nas estruturas microbianas e/ou a destruição das mesmas<sup>76,77</sup>.

O mecanismo de ação no processo fotodinâmico envolve a absorção de um fóton por parte de um PS, para que este possa ser excitado. A absorção do fóton faz com que a molécula do PS passe do seu estado fundamental para um estado de excitação eletrónica de curta duração, denominado estado singleto ( $^1\text{PS}^*$ ). Esta molécula excitada pode: decair para o seu estado fundamental com emissão de luz – fluorescência –, ou pode sofrer uma transição eletrónica e passar para um estado excitado de longa duração, denominado estado tripleto ( $^3\text{PS}^*$ ).

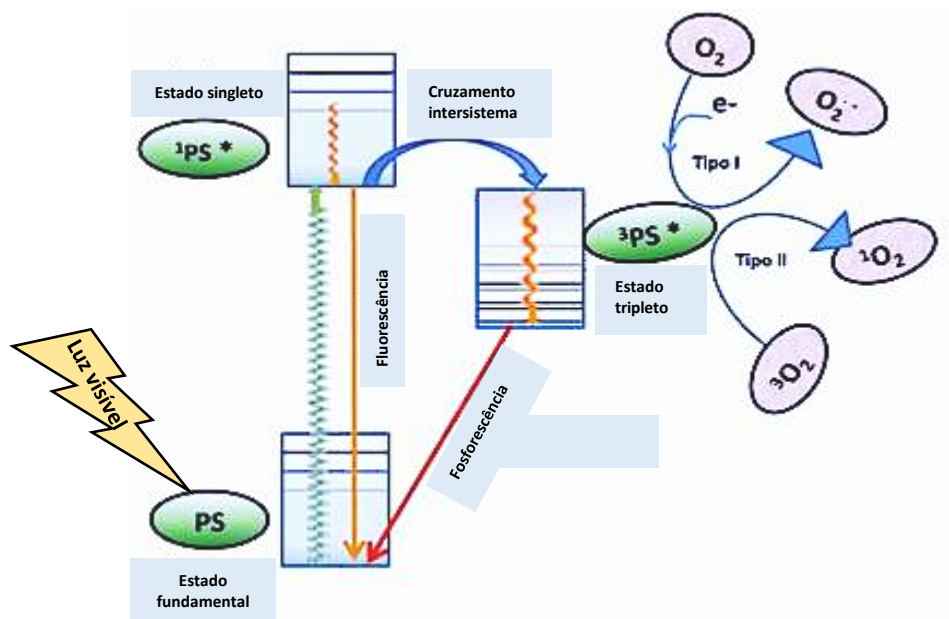
Quando a molécula do PS se encontra no estado de excitação tripleto, apresentando um tempo de vida útil mais prolongado, vai permitir que esta reaja com substratos orgânicos ou com o oxigénio molecular ( $^3\text{O}_2$ ) por duas vias fotoquímicas diferentes, chamadas de mecanismos Tipo I e Tipo II<sup>78,79</sup>.

- **Tipo I:** Por esta via, o PS no estado tripleto pode reagir diretamente com um substrato biológico, transferindo um próton ou um eletrão, a uma estrutura da célula ou a uma molécula, para então formar radicais livres. Os radicais livres formados podem reagir com o oxigénio molecular, e como resultado desta reação, origina espécies reativas de oxigénio, tais como, o peróxido de hidrogénio, ião superóxido e radicais hidroxilo<sup>80,81</sup>.



- **Tipo II:** Neste tipo de mecanismo, o PS no estado tripleto pode transferir a sua energia para o oxigénio molecular (que se encontra no estado fundamental tripleto) resultando na formação do oxigénio singleto ( $^1O_2$ ), que é uma espécie altamente reativa, e que possui um tempo de vida na ordem dos 40 nanossegundos, tempo este, que vai proporcionar um raio de ação muito curta do oxigénio singleto quando interagir com o meio envolvente, não se difundindo por mais de 150 nm do local onde é gerado<sup>82</sup>.

Na aPDT os mecanismos de tipo I e tipo II podem ocorrer de forma simultânea ou não, e a relação entre essas duas vias, ou seja, o tipo e a quantidade de ROS gerados, vai depender das concentrações do oxigénio molecular e substrato existente nesse ambiente, bem como da origem química do PS usado<sup>68,83</sup>. A competição pelo PS no estado excitado tripleto, entre o oxigénio molecular e os substratos orgânicos, é que vai determinar se o mecanismo de ação será do tipo I ou tipo II, no entanto, o mecanismo principal poderá ser alterado durante o tratamento<sup>68</sup>.



**Figura 5.** Mecanismo de tipo I e tipo II envolvidas na aPDT. Abreviaturas: **PS**, fotossensibilizador no estado fundamental;  **$^1PS^*$** , fotossensibilizador no estado excitado singleto;  **$^3PS^*$** , fotossensibilizador no estado excitado tripleto;  **$e^-$** , elétron;  **$O_2^{\bullet-}$** , ânion superóxido;  **$^3O_2$** , oxigénio molecular;  **$^1O_2$** , oxigénio singleto (adaptado de Kharkwal et al., 2011)<sup>84</sup>

De entre todos os ROS formados a partir do processo fotodinâmico, o oxigênio singlete é a principal espécie citotóxica envolvida na inativação microbiana, pois reage com muitas moléculas biológicas, como lípidos e proteínas, promovendo assim, a inativação dos alvos microbianos<sup>85</sup>.

É de salientar que atualmente não há ainda relatos na literatura sobre qualquer forma de resistência para o oxigênio singlete, por parte dos microrganismos<sup>82</sup>. Isto pode ser explicado pelo facto dos principais alvos da aPDT serem as estruturas externas da maioria dos microrganismos, sendo assim, não há uma necessidade de o PS invadir o compartimento intracelular<sup>86</sup>. Portanto, uma aderência específica e apropriada do PS (posteriormente ativada pela luz) às estruturas externas, faz com que essas se tornem inviáveis, e desta forma, são reduzidas as probabilidades de desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte dos microrganismos, nomeadamente, o aumento da desintoxicação metabólica ou pelo bloqueio da absorção<sup>87</sup>.

Todavia, apesar de ocorrer danos a nível dos ácidos nucleicos, estes não são o principal alvo da aPDT, o que vai de encontro com a ausência de efeitos mutagénicos<sup>88</sup>. Em geral, esses danos a nível dos ácidos nucleicos podem representar um evento posterior, quando as células já se tornaram inviáveis<sup>89</sup>.

Em alguns estudos realizados, nos quais se recorreu à técnica de microscopia de fluorescência para observar o comportamento do fotossensibilizador em diferentes tipos de microrganismos, notou-se que, de uma forma geral, o fotossensibilizador localizava-se ao nível da membrana plasmática antes da irradiação, e que gradativamente se difundia para o interior da célula, somente após exposição à luz, causando uma diminuição significativa da sua sobrevivência<sup>86,90</sup>. Portanto, como referido anteriormente, os alvos prioritários do processo fotodinâmico antimicrobiano são as suas estruturas externas, nomeadamente proteínas da cápside, invólucro lipídico, parede celular e membrana celular<sup>66,91</sup>.

### 1.4.2) FOTOSSENSIBILIZADORES (PS)

O PS é um elemento muito importante e crítico no processo da aPDT, pois é o elemento que tem a capacidade de absorver a energia do fóton e posteriormente usá-la para induzir alterações energéticas em moléculas não-absorventes<sup>92</sup>. Geralmente, os PS são moléculas aromáticas, e essas podem ser naturais ou sintéticas. Contudo para um êxito desta terapia é necessária uma escolha apropriada deste composto. Por isso, no desenvolvimento da aPDT é fundamental a compreensão de como é que os PS funcionam nos microrganismos, para que seja possível sintetizar moléculas de fotossensibilizadores mais adequados<sup>89</sup>.

De acordo com a literatura, num tratamento aPDT, os PS a serem usados devem ser aqueles que cumprem as seguintes condições<sup>71,93-95</sup>:

- Solubilidade – o PS não deve formar precipitados ou agregados em sistemas biológicos, pois a agregação reduz a possibilidade do PS se ligar à superfície do alvo, levando também a uma diminuição na produção de espécie reativas de oxigénio;
- A luz usada deve ter em atenção o espectro de absorção de PS;
- Não apresentar toxicidade no escuro, sendo citotóxico apenas na presença da luz;
- O PS deve ser anfifílico, para assim permitir a sua penetração e distribuição;
- Capacidade em fotoinativar vários tipos de microrganismos;
- Eficiente na geração de espécies reativas de oxigénio;
- Não conferir a mutagenicidade e genotoxicidade;
- Fotoestável – não se degradar sob a ação da luz;
- Baixo custo e de fácil preparação,
- Elevada pureza química;

#### **Azul de Metileno**

Um dos corantes mais conhecido e utilizado na PDT é o azul de metileno (AM). Desde que foi sintetizado em 1876, este já foi, e é usado até hoje em diversas áreas nomeadamente na quimioterapia do cancro, mas também na terapia antimicrobiana<sup>96</sup>. O azul de metileno já é usado como fotossensibilizador em aPDT para desinfetar sangue<sup>97</sup>, na inativação de bactérias<sup>98</sup>, vírus<sup>99</sup>, e parasitas<sup>100</sup>.

O azul de metileno absorve fortemente a luz na região do espectro entre 630 e 680 nm, com pouca absorção em outras regiões do espectro da luz visível. A molécula do azul de metileno é relativamente estável quando se encontra no seu estado de excitação eletrônica, e apresenta a particularidade de conseguir transferir a sua energia de luz absorvida de forma eficiente para as outras moléculas nas proximidades. Portanto essa transferência de energia excitacional do azul de metileno para as outras moléculas facilita a ação fotodinâmica<sup>96</sup>.

### **1.4.3) FATORES QUE AFETAM A TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA**

Ao longo dos anos, estudos realizados no âmbito da terapia fotodinâmica, mostraram que a aPDT é um tratamento promissor e eficaz, salientando sobretudo que, os danos a serem causados pelas espécies reativas de oxigênio, é independente do tipo de microrganismos conhecidos. No entanto, a variabilidade existente entre os diferentes tipos de microrganismos, ao nível da organização e estrutura, pode afetar o mecanismo de ação e a eficácia do tratamento, influenciando assim todo o processo da aPDT<sup>101-105</sup>.

No caso das bactérias, nem todas tem o mesmo nível de suscetibilidade, isto porque, ao nível da parede celular, estas podem ser classificadas como bactérias de Gram-positivo ou Gram-negativo, sendo essa diferença uma parte crucial para desenvolver um protocolo de aPDT. Quando comparadas, os estudos demonstram que, as bactérias Gram-negativas são menos suscetíveis ao tratamento fotodinâmico, pois, apresentam uma camada adicional extra de proteínas e lipopolissacarídeo que dificultam a penetração do fotossensibilizador através da membrana<sup>106,107</sup>. Na inativação das partículas virais, por existir vírus com invólucro e vírus sem invólucro, a suscetibilidade ao tratamento também é diferente, sendo os vírus com invólucro mais suscetíveis<sup>84,108</sup>.

Um fator importante na inativação fotodinâmica viral, é a localização e o sítio de ligação do PS, que por sua vez, vai depender da estrutura e da distribuição de carga intramolecular<sup>103,109</sup>. A carga molecular é uma condição relevante na determinação da atividade antimicrobiana, uma vez que, as moléculas de PS que têm carga positiva, em geral são mais eficientes do que as moléculas de PS aniônicas ou neutras. Foi demonstrado que os PS que possuem carga positiva podem atuar em concentrações mais baixas<sup>110</sup>. Isto pode

ser explicado pelo facto de as cargas positivas do PS estimularem uma forte interação eletrostática entre as moléculas do PS carregadas positivamente e as regiões na cápside e invólucro viral que são carregados negativamente, encaminhando o PS em direção a locais, que para um microrganismo em particular, são críticas para a sua estabilidade e metabolismo<sup>103,111</sup>.

#### **1.4.4) VANTAGENS E LIMITAÇÕES DA APDT**

Quando comparado com outros tratamentos usados na inativação microbiana, a aPDT apresenta vantagens, bem como limitações. No processo de inativação, é de extrema importância realçar que, a capacidade do PS em gerar radicais livres (via tipo I) ou gerar oxigénio singlete (via tipo II) está diretamente relacionado ao êxito da aPDT. Portanto, no processo da aPDT, um fator muito importante a ter em conta, é o tipo de PS que será usado<sup>89,112</sup>.

Algumas vantagens da aPDT merecem ser destacadas nomeadamente:

- Possui um espectro de ação muito abrangente, pois o fotossensibilizador consegue atuar sobre bactérias, vírus, fungos, leveduras e parasitas<sup>89,112</sup>;
- Pouca probabilidade de desenvolvimento de resistência, por parte dos alvos microrganismos<sup>89,112</sup>;
- É um tratamento cuja eficácia é independente do tipo de resistência aos antibióticos apresentado pela estirpe microbiana em questão<sup>89,112</sup>;
- Afeta os fatores de virulência, como enzimas bacterianas; <sup>113</sup>;
- Para a ativação do agente fotossensibilizante, pode ser aplicado fontes de luz de baixo custo;<sup>90</sup>
- Possibilidade de imobilizar o PS, conseguindo assim o reaproveitar o mesmo, e com isso, diminuir os custos associados a este tratamento, mas também, ao imobilizar o PS evita-se que este se difunda para o meio ambiente, diminuindo assim os riscos de contaminação ambiental<sup>114</sup>;

As limitações, efeitos secundários e a citotoxicidade estão particularmente relacionados com disponibilidade de oxigénio, intensidade da luz e a quantidade do PS. Para além disso, outra restrição é o facto de a aPDT ser um processo localizado, permitindo

tratar apenas áreas alcançadas pela luz. A inativação por aPDT é também afetada pela matéria orgânica existente no local de tratamento, contudo, o problema pode ser resolvido com o ajuste das concentrações de PS<sup>73,89,112</sup>.

### **1.5) Uso de bacteriófagos como modelo de vírus de mamíferos para avaliar a eficácia da aPDT**

O vírus SARS-CoV-2, assim como outros vírus que infetam os mamíferos, podem ser potencialmente letais para os humanos, requerendo tratamento/manuseamento em laboratórios com níveis de biossegurança 3 ou 4 (ou seja laboratórios onde são realizados estudos com agentes muito patogênicos, que podem causar doenças graves ou potencialmente letais através da inalação ou outro tipo de exposição). No entanto, o acesso a este tipo de laboratório é limitado e caro, apresentando também algum perigo de contaminação do operador. Como resultado, na maioria das vezes, são usados substitutos destes vírus, modelos virais, bacteriófagos (vírus que infetam bactérias)<sup>63,115</sup>. Por outro lado, as técnicas tradicionais de quantificação viral, como por exemplo as culturas virais *in vitro*, são demoradas e muito trabalhosas, o que reforça a opção do uso de bacteriófagos como vírus modelo de mamíferos. A sua utilização só é possível devido às muitas vantagens que estes apresentam em relação a um determinado vírus patogênico, nomeadamente<sup>116</sup>:

- Não apresentam patogenicidade para os humanos;
- Possibilidade de serem cultivados em títulos mais elevados, o que facilita a avaliação da eficácia de inativação por diferentes métodos;
- Apresentam resistência semelhante, aos outros vírus de mamíferos, a fatores ambientais e ao tratamento de água;
- A sua deteção é mais simples e barata, pelo que, não precisa de equipamentos e instalações sofisticados necessários para a propagação de patógenos humanos;

- Os resultados dos ensaios podem ser obtidos algumas horas após a incubação, ao invés de dias ou semanas como é o caso dos vírus patogénicos;

O bacteriófago Phi6 pertencente à família *Cystoviridae*, tendo sido o primeiro membro desta família a ser isolado e o mais bem caracterizado, e é um dos poucos bacteriófagos que possuem invólucro lipídico<sup>117</sup>.

Este fago está a ser usado como um modelo de vírus com invólucro, como o SARS-CoV-2, pois além das vantagens já descritas, apresenta invólucro lipídico e RNA como ácido nucleico, o que o torna um modelo adequado para vírus de RNA de mamíferos com invólucro. Por outro lado, a sua bactéria hospedeira, *Pseudomonas syringae*, não é patogénica para os humanos, e portanto requerem somente os cuidados básicos no momento de manuseamento<sup>115</sup>.

Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a eficácia da aPDT com o azul de metileno na desinfeção de águas residuais contaminadas pelo SARS-CoV-2, utilizando o modelo de vírus de RNA com invólucro, bacteriófago *phi6*.

## Referências

1. Guan, W. *et al.* Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1708–1720 (2020).
2. Pan, L. *et al.* Clinical characteristics of COVID-19 patients with digestive symptoms in Hubei, China: A descriptive, cross-sectional, multicenter study. *Am. J. Gastroenterol.* **115**, 766–773 (2020).
3. Wang, D. *et al.* Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **323**, 1061–1069 (2020).
4. Chen, N. *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* **395**, 507–513 (2020).
5. Holshue, M. L. *et al.* First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. *N. Engl. J. Med.* **382**, 929–936 (2020).
6. Xiao, F. *et al.* Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology* **158**, 1831-1833.e3 (2020).
7. Xu, Y. *et al.* Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding. *Nat. Med.* **26**, 502–505 (2020).
8. Foladori, P. *et al.* SARS-CoV-2 from faeces to wastewater treatment: What do we know? A review. *Sci. Total Environ.* **743**, 140444 (2020).
9. Pulido, C. M., Villarejo-Carballido, B., Redondo-Sama, G. & Gómez, A. COVID-19 infodemic: More retweets for science-based information on coronavirus than for false information. *Int. Sociol.* **35**, 377–392 (2020).
10. Zambrano-Monserrate, M. A., Ruano, M. A. & Sanchez-Alcalde, L. Indirect effects of COVID-19 on the environment. *Sci. Total Environ.* **728**, 138813 (2020).
11. Hallema, D. W., Robinne, F. N. & McNulty, S. G. Pandemic spotlight on urban water quality. *Ecological Processes* vol. 9 (2020).
12. Yunus, A. P., Masago, Y. & Hijioka, Y. COVID-19 and surface water quality: Improved lake water quality during the lockdown. *Sci. Total Environ.* **731**, 139012 (2020).
13. García-Ávila, F. *et al.* Considerations on water quality and the use of chlorine in times of SARS-CoV-2 (COVID-19) pandemic in the community. *Case Stud. Chem. Environ. Eng.* **2**, 100049 (2020).
14. Cahill, N. & Morris, D. Recreational waters – A potential transmission route for SARS-CoV-2 to humans? *Sci. Total Environ.* **740**, 140122 (2020).
15. Brainard, J., Pond, K. & Hunter, P. R. Censored Regression Modeling to Predict Virus Inactivation in Wastewaters. *Environ. Sci. Technol.* **51**, 1795–1801 (2017).
16. Bandala, E. R. *et al.* Impacts of COVID-19 pandemic on the wastewater pathway into surface water: A review. *Science of the Total Environment* vol. 774 145586 (2021).
17. Cuevas-Ferrando, E. *et al.* Recovering coronavirus from large volumes of water. *Sci. Total Environ.* **762**, 143101 (2021).
18. Hong, P.-Y. *et al.* Estimating the minimum number of SARS-CoV-2 infected cases needed to detect viral RNA in wastewater: To what extent of the outbreak can surveillance of wastewater tell us? (2021) doi:10.1016/j.envres.2021.110748.
19. Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R. & Brouwer, A. Presence of SARS-



- Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in the Netherlands. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **7**, 511–516 (2020).
20. Lodder, W. & de Roda Husman, A. M. SARS-CoV-2 in wastewater: potential health risk, but also data source. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology* vol. 5 533–534 (2020).
  21. Street, R., Malema, S., Mahlangeni, N. & Mathee, A. Wastewater surveillance for Covid-19: An African perspective. *Sci. Total Environ.* **743**, 140719 (2020).
  22. Verbyla, M. E. & Mihelcic, J. R. A review of virus removal in wastewater treatment pond systems. *Water Research* vol. 71 107–124 (2015).
  23. Tchobanoglous, G., Burton, F. L. & David Stensel, H. *Wastewater Engineering Treatment and Reuse (Fourth Edition)*.
  24. Gu, J., Han, B. & Wang, J. COVID-19: Gastrointestinal Manifestations and Potential Fecal–Oral Transmission. *Gastroenterology* vol. 158 1518–1519 (2020).
  25. Courault, D. *et al.* Assessment and risk modeling of airborne enteric viruses emitted from wastewater reused for irrigation. *Sci. Total Environ.* **592**, 512–526 (2017).
  26. Lahrich, S. *et al.* Review on the contamination of wastewater by COVID-19 virus: Impact and treatment. *Sci. Total Environ.* **751**, (2021).
  27. Corpuz, M. V. A. *et al.* Viruses in wastewater: occurrence, abundance and detection methods. *Sci. Total Environ.* **745**, 140910 (2020).
  28. Zhu, N. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **382**, 727–733 (2020).
  29. Chen, Y., Liu, Q. & Guo, D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology* vol. 92 418–423 (2020).
  30. Chan, J. F. W. *et al.* Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 221–236 (2020).
  31. La Rosa, G., Bonadonna, L., Lucentini, L., Kenmoe, S. & Suffredini, E. Coronavirus in water environments: Occurrence, persistence and concentration methods - A scoping review. *Water Research* vol. 179 115899 (2020).
  32. Race, M. *et al.* Current emerging SARS-CoV-2 pandemic: Potential direct/indirect negative impacts of virus persistence and related therapeutic drugs on the aquatic compartments. *Environ. Res.* **188**, 109808 (2020).
  33. Carducci, A., Federigi, I., Dasheng, L., Julian R, T. & Marco, V. Making waves: Coronavirus detection, presence and persistence in the water environment: State of the art and knowledge needs for public health. *Water Research* vol. 179 115907 (2020).
  34. Rzeszutka, A. & Cook, N. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiology Reviews* vol. 28 441–453 (2004).
  35. Thevenin, T., Lobert, P. E. & Hober, D. Inactivation of coxsackievirus B4, feline calicivirus and herpes simplex virus type 1: Unexpected virucidal effect of a disinfectant on a non-enveloped virus applied onto a surface. *Intervirology* **56**, 224–230 (2013).
  36. Kampf, G., Todt, D., Pfaender, S. & Steinmann, E. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *Journal of Hospital*

- Infection* vol. 104 246–251 (2020).
37. Papoutsis, A. *et al.* Detection of SARS-CoV-2 from patient fecal samples by whole genome sequencing. *Gut Pathog.* **13**, 1–8 (2021).
  38. Randazzo, W. *et al.* SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Res.* **181**, 115942 (2020).
  39. Haramoto, E., Malla, B., Thakali, O. & Kitajima, M. First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan. *Sci. Total Environ.* **737**, 140405 (2020).
  40. Wang, W. *et al.* Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA - Journal of the American Medical Association* vol. 323 1843–1844 (2020).
  41. Yuen, K. S., Ye, Z. W., Fung, S. Y., Chan, C. P. & Jin, D. Y. SARS-CoV-2 and COVID-19: The most important research questions. *Cell Biosci.* **10**, (2020).
  42. Amirian, E. S. Potential fecal transmission of SARS-CoV-2: Current evidence and implications for public health. *International Journal of Infectious Diseases* vol. 95 363–370 (2020).
  43. Wu, Y. *et al.* Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology* vol. 5 434–435 (2020).
  44. Monte *et al.* *Treatment of Wastewater - Physical and Chemical Treatment Operations and Processes.* www.ersar.pt (2016).
  45. Simões, C., Rosmaninho, I. & Henriques, A. G. G. *Guide for the Environmental Impact Assessment of Wastewater Treatment Plants.* (2008).
  46. Sonune, A. & Ghate, R. Developments in wastewater treatment methods. *Desalination* **167**, 55–63 (2004).
  47. Environmental Protection Agency. *Wastewater treatment manuals—Primary, Secondary and Tertiary treatment.* (1997).
  48. Water & Wastewater Infrastructure: Energy Efficiency and Sustainability - Frank R. Spellman - Google Livros. [https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=2bgg-8vldpIC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Spellman,+F.+R.+Handbook+of+Water+and+Wastewater+Treatment+Plant+Operations.+\(CRC+Press,+2013\).&ots=lvjMEtU8Hp&sig=rD\\_m2oyqBC1w12\\_OAk\\_ddw8O8f8&redir\\_esc=y#v=onepage&q=Spellman%2C+F.+R.+Handbook+of+Water+and+Wastewater+Treatment+Plant+Operations.+\(CRC+Press%2C+2013\).&f=false](https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=2bgg-8vldpIC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Spellman,+F.+R.+Handbook+of+Water+and+Wastewater+Treatment+Plant+Operations.+(CRC+Press,+2013).&ots=lvjMEtU8Hp&sig=rD_m2oyqBC1w12_OAk_ddw8O8f8&redir_esc=y#v=onepage&q=Spellman%2C+F.+R.+Handbook+of+Water+and+Wastewater+Treatment+Plant+Operations.+(CRC+Press%2C+2013).&f=false)
  49. Bartolomeu, M. *et al.* Photodynamic action against wastewater microorganisms and chemical pollutants: An effective approach with low environmental impact. *Water (Switzerland)* **9**, 630 (2017).
  50. Cakir, F. Y. & Stenstrom, M. K. Greenhouse gas production: A comparison between aerobic and anaerobic wastewater treatment technology. *Water Res.* **39**, 4197–4203 (2005).
  51. Corcoran, E. *et al.* *Sick Water? The central role of wastewater management in sustainable development. A Rapid Response Assessment. United Nations Environment Programme.* (2010).
  52. Guender, B. *The Membrane-Coupled Activated Sludge Process in Municipal Wastewater Treatment. The Membrane-Coupled Activated Sludge Process in Municipal Wastewater Treatment* (CRC Press, 2000). doi:10.1201/9781482279030.
  53. Rosal, R. *et al.* Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their

- removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Res.* **44**, 578–588 (2010).
54. Wang, W. *et al.* Phosphate adsorption performance of a novel filter substrate made from drinking water treatment residuals. *J. Environ. Sci. (China)* **45**, 191–199 (2015).
  55. Bourgin, M. *et al.* Effect of operational and water quality parameters on conventional ozonation and the advanced oxidation process O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Kinetics of micropollutant abatement, transformation product and bromate formation in a surface water. *Water Res.* **122**, 234–245 (2017).
  56. Schölzel & Bower. *Small Scale Wastewater Treatment Plant Project REPORT ON PROJECT CRITERIA, GUIDELINES AND TECHNOLOGIES.* (1999).
  57. US EPA (1999) Wastewater Technology Fact Sheet Sequencing Batch Reactors. Agência de Proteção Ambiental dos EUA, EPA 832-F-99-073. [https://www.scirp.org/\(S\(lz5mqp453edsnp55rrgjct55\)\)/reference/ReferencesPaper.aspx?ReferenceID=2084379](https://www.scirp.org/(S(lz5mqp453edsnp55rrgjct55))/reference/ReferencesPaper.aspx?ReferenceID=2084379).
  58. Basu, S., Page, J. & Wei, I. W. *UV DISINFECTION OF TREATED WASTEWATER EFFLUENT: INFLUENCE OF COLOR, REACTIVATION AND REGROWTH OF COLIFORM BACTERIA.* <http://www.aeee.net> (2007).
  59. Marecos do Monte, H. & Albuquerque, A. *Wastewater reuse.* (2010).
  60. Gerba, C. P., Kitajima, M. & Iker, B. Viral presence in waste water and sewage and control methods. in *Viruses in Food and Water: Risks, Surveillance and Control* 293–315 (Elsevier Ltd., 2013). doi:10.1533/9780857098870.3.293.
  61. Rollemberg, S., Barros, A. N. de & Lima, J. P. M. de. Evaluation of coronavirus contamination, survival and removal in wastewater treatment systems. *Rev. Tecnol.* **41**, 1–15 (2020).
  62. Tizaoui, C. Ozone: A Potential Oxidant for COVID-19 Virus (SARS-CoV-2). *Ozone Sci. Eng.* **42**, 378–385 (2020).
  63. Lesimple, A., Jasim, S. Y., Johnson, D. J. & Hilal, N. The role of wastewater treatment plants as tools for SARS-CoV-2 early detection and removal. *J. Water Process Eng.* **38**, 101544 (2020).
  64. Pervaiz, S. & Olivo, M. Art and science of photodynamic therapy. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* vol. 33 551–556 (2006).
  65. Wainwright, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* vol. 42 13–28 (1998).
  66. Hamblin, M. R. & Hasan, T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem. Photobiol. Sci.* **3**, 436–450 (2004).
  67. Yoshikawa, T. T. Antimicrobial resistance and aging: Beginning of the end of the antibiotic era? in *Journal of the American Geriatrics Society* vol. 50 226–229 (Blackwell Publishing Inc., 2002).
  68. Bartolomeu, M., Neves, M. G. P. M. S., Faustino, M. A. F. & Almeida, A. Wastewater chemical contaminants: remediation by advanced oxidation processes. *Photochemical and Photobiological Sciences* vol. 17 1573–1598 (2018).
  69. Almeida, J. *et al.* Photodynamic inactivation of multidrug-resistant bacteria in hospital wastewaters: Influence of residual antibiotics. *Photochem. Photobiol. Sci.* **13**, 626–633 (2014).
  70. Costa, L. *et al.* Sewage bacteriophage photoinactivation by cationic porphyrins: A

- study of charge effect. *Photochem. Photobiol. Sci.* **7**, 415–422 (2008).
71. Costa, L. *et al.* Sewage bacteriophage inactivation by cationic porphyrins: Influence of light parameters. *Photochem. Photobiol. Sci.* **9**, 1126–1133 (2010).
  72. FITZPATRICK, T. B. & PATHAK, M. A. Historical aspects of methoxsalen and other furocoumarins. *J. Invest. Dermatol.* **32**, 229–231 (1959).
  73. Oniszczyk, A., Wojtunik-Kulesza, K. A., Oniszczyk, T. & Kasprzak, K. The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use. *Biomedicine and Pharmacotherapy* vol. 83 912–929 (2016).
  74. Spring, B. Q., Rizvi, I., Xu, N. & Hasan, T. The role of photodynamic therapy in overcoming cancer drug resistance. *Photochemical and Photobiological Sciences* vol. 14 1476–1491 (2015).
  75. Schneider, L. A., Hinrichs, R. & Scharffetter-Kochanek, K. Phototherapy and photochemotherapy. *Clin. Dermatol.* **26**, 464–476 (2008).
  76. Alves, E. *et al.* Photodynamic inactivation of recombinant bioluminescent *Escherichia coli* by cationic porphyrins under artificial and solar irradiation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 1447–1454 (2008).
  77. Bonnett, R. *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy. Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*, 123, 15, 3622–3622 (2000). doi:10.1201/9781482296952.
  78. *Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational, and Clinical - Michael R. Hamblin Artech House*, 1, 559. (2008).
  79. Broekgaarden, M., Weijer, R., van Gulik, T. M., Hamblin, M. R. & Heger, M. Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular basis for pharmacological inhibition strategies. *Cancer and Metastasis Reviews* vol. 34 643–690 (2015).
  80. Takasaki, A. A. *et al.* Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Eur. J. Med. Chem.* **51**, 109–140 (2009).
  81. Reiniers, M. J., Van Golen, R. F., Van Gulik, T. M. & Heger, M. Reactive oxygen and nitrogen species in steatotic hepatocytes: A molecular perspective on the pathophysiology of ischemia-reperfusion injury in the fatty liver. *Antioxidants and Redox Signaling* vol. 21 1119–1142 (2014).
  82. Sharman, W. M., Allen, C. M. & Van Lier, J. E. Photodynamic therapeutics: Basic principles and clinical applications. *Drug Discovery Today* vol. 4 507–517 (1999).
  83. Liu, Y., Qin, R., Zaat, S. A. J., Breukink, E. & Heger, M. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. *J. Clin. Transl. Res.* **1**, 140 (2015).
  84. F, K. & C, K. Photodynamic inactivation of enveloped viruses by buckminsterfullerene. *Antiviral Res.* **34**, 65–70 (1997).
  85. Yano, S. *et al.* Current states and future views in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **12**, 46–67 (2011).
  86. A, P. *et al.* Photoinactivation of *Escherichia coli* (SURE2) without intracellular uptake of the photosensitizer. *J. Appl. Microbiol.* **114**, 36–43 (2013).
  87. Winckler, K. D. Special section: Focus on anti-microbial photodynamic therapy (PDT). *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **86**, 43–44 (2007).
  88. Jori, G., Camerin, M., Soncin, M., Guidolin, L. & Coppelotti, O. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Basic Principles . in *Photodynamic Inactivation of Microbial*

- Pathogens: Medical and Environmental Applications* (ed. Michael R. Hamblin and Giulio Jori) ( Royal Society of Chemistry, 2011). doi:10.1039/9781849733083-00001.
89. Alves, E. *et al.* An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. *Future Med. Chem.* **6**, 141–164 (2014).
  90. Jori, G. *et al.* Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. *Lasers Surg. Med.* **38**, 468–481 (2006).
  91. Zupán, K. *et al.* Comparison of the efficiency and the specificity of DNA-bound and free cationic porphyrin in photodynamic virus inactivation. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **90**, 105–112 (2008).
  92. Sibata, C. H., Colussi, V. C., Oleinick, N. L. & Kinsella, T. J. Photodynamic therapy: A new concept in medical treatment. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **33**, 869–880 (2000).
  93. Pushpan, S. K. *et al.* Porphyrins in photodynamic therapy - A search for ideal photosensitizers. *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents* **2**, 187–207 (2002).
  94. MR, D., SL, G. & SJ, W. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J. Med. Chem.* **47**, 3897–3915 (2004).
  95. Bayona, A. M. D. P., Mroz, P., Thunshelle, C. & Hamblin, M. R. Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers. *Chem. Biol. Drug Des.* **89**, 192–206 (2017).
  96. Wainwright, M. & Crossley, K. B. Methylene Blue - A therapeutic dye for all seasons? *J. Chemother.* **14**, 431–443 (2002).
  97. Jin, C. *et al.* Methylene blue photochemical treatment as a reliable SARS-CoV-2 plasma virus inactivation method for blood safety and convalescent plasma therapy for COVID-19. *BMC Infect. Dis.* **21**, (2021).
  98. Vecchio, D. *et al.* Bacterial Photodynamic Inactivation Mediated by Methylene Blue and Red Light Is Enhanced by Synergistic Effect of Potassium Iodide. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 5203 (2015).
  99. Faddy, H. M. *et al.* Inactivation of yellow fever virus in plasma after treatment with methylene blue and visible light and in platelet concentrates following treatment with ultraviolet C light. *Transfusion* **59**, 2223–2227 (2019).
  100. Lu, G. *et al.* Efficacy and safety of methylene blue in the treatment of malaria: a systematic review. *BMC Med.* **16**, (2018).
  101. Zanin, I. C. J., Gonçalves, R. B., Junior, A. B., Hope, C. K. & Pratten, J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 324–330 (2005).
  102. H, K., H, A., R, K. & M, B. Photodynamic Inactivation of *E. coli* PTCC 1276 Using Light Emitting Diodes: Application of Rose Bengal and Methylene Blue as Two Simple Models. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **182**, 967–977 (2017).
  103. Costa, L., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. P. M. S., Cunha, Â. & Almeida, A. Photodynamic inactivation of mammalian viruses and bacteriophages. *Viruses* **4**, 1034–1074 (2012).
  104. Cormick, M. P., Alvarez, M. G., Rovera, M. & Durantini, E. N. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **44**, 1592–1599 (2009).
  105. Mito, T. *et al.* Effect of Photodynamic Therapy with Methylene Blue on *Acanthamoeba* In Vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **53**, 6305–6313 (2012).

106. Jori, G. & Brown, S. B. Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochem. Photobiol. Sci.* **3**, 403–405 (2004).
107. Malik, Z., Ladan, H. & Nitzan, Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: Problems and possible solutions. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **14**, 262–266 (1992).
108. S, R. *et al.* New phthalocyanines for photodynamic virus inactivation in red blood cell concentrates. *Photochem. Photobiol.* **60**, 165–170 (1994).
109. Minnock, A. *et al.* Mechanism of Uptake of a Cationic Water-Soluble Pyridinium Zinc Phthalocyanine across the Outer Membrane of Escherichia coli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 522 (2000).
110. Demidova, T. N. & Hamblin, M. R. Effect of Cell-Photosensitizer Binding and Cell Density on Microbial Photoinactivation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2329 (2005).
111. Merchat, M., Bertolini, G., Giacomini, P., Villanueva, A. & Jori, G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **32**, 153–157 (1996).
112. Almeida, A., Cunha, A., Faustino, M. A. F., Tomé, A. C. & Neves, M. G. P. M. S. Chapter 5 Porphyrins as Antimicrobial Photosensitizing Agents. in *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications* vol. 11 83–160 (The Royal Society of Chemistry, 2011).
113. Dai, T., Huang, Y.-Y. & Hamblin, M. R. Photodynamic therapy for localized infections – state of the art. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **6**, 170 (2009).
114. Almeida, A. *et al.* Phage Therapy and Photodynamic Therapy: Low Environmental Impact Approaches to Inactivate Microorganisms in Fish Farming Plants. *Mar. Drugs* **7**, 268 (2009).
115. Carvalho, N. A. de, Stachler, E. N., Cimabue, N. & Bibby, K. Evaluation of Phi6 Persistence and Suitability as an Enveloped Virus Surrogate. *Environ. Sci. Technol.* **51**, 8692–8700 (2017).
116. Leclerc, H., Edberg, S., Pierzo, V. & Delattre, J. M. Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 5–21 (2000).
117. AK, V., RK, K. & JL, V. E. Bacteriophage phi6: a Lipid-Containing Virus of Pseudomonas phaseolicola. *J. Virol.* **11**, 799–805 (1973).
118. Naidoo, S., Olaniran, A. O. (2014). Treated wastewater effluent as a source of microbial pollution of surface water resources. *International Journal of Environmental Research and Public Health*

**Capítulo II. “Desinfecção de água residual na mitigação do SARS-CoV-2 através da aPDT”**

## Resumo

A problemática dos vírus emergentes é um grande desafio para a comunidade científica. Após os primeiros estudos relatarem a presença do SARS-CoV-2 nas fezes de pacientes infectados, ficou evidente que as águas residuais poderiam ser contaminadas por este vírus, indicando assim a aplicação de novos métodos de desinfecção, mais eficazes e menos prejudiciais em alternativa aos métodos convencionais que geram subprodutos de elevada toxicidade. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) é uma alternativa para inativar microrganismos através do uso de fotossensibilizadores (PS) como o azul de metileno (AM), que é um PS com uma atividade virucida de amplo espectro. Neste sentido, o objetivo deste estudo é avaliar a eficácia da aPDT com o AM na inativação do vírus SARS-CoV-2 em água residual. Para este estudo, o bacteriófago phi6 foi usado como modelo do SARS-CoV-2 e a eficiência da aPDT foi testada em PBS e água residual filtrada e não filtrada, com uma concentração de 5  $\mu\text{M}$  de AM e irradiância com luz branca de 50  $\text{mW cm}^2$ .

Os resultados em PBS mostraram uma redução da concentração do bacteriófago de 9 log UFP  $\text{mL}^{-1}$ , após 5 minutos de tratamento. Em água residual filtrada e não filtrada, a inativação do bacteriófago phi6 até ao limite de deteção foi observada após 90 minutos de irradiação. Estes resultados sugerem que a aplicação da aPDT com o AM pode ser uma alternativa eficaz para inativar o vírus SARS-CoV-2 em águas residuais.

## Abstract

The problem of emerging viruses is a major challenge for the scientific community. After the first studies reported the presence of SARS-CoV-2 in the faeces of infected patients, it became evident that wastewater could be contaminated by this virus, thus requiring the application of new, more effective and less harmful disinfection methods as an alternative to conventional methods, which generate high toxicity by-products. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) is an alternative to inactivate microorganisms through the use of photosensitizers (PS) such as methylene blue (MB), which is a PS with a broad spectrum virucidal activity. In this regard, the aim of this study is to evaluate the effectiveness of aPDT with AM in inactivating the SARS-CoV-2 virus in wastewater. For this study, bacteriophage phi6 was used as surrogate of the virus SARS-CoV-2 and the efficiency of aPDT was tested in PBS and filtered and unfiltered wastewater, with a concentration of 5  $\mu\text{M}$  of the MB and at a white light irradiance of 50  $\text{mW cm}^2$ .

The results in PBS show a bacteriophage reduction of 9 log PFU  $\text{mL}^{-1}$ , after 5 minutes of treatment. In filtered and unfiltered wastewater this treatment was able to inactivate bacteriophage phi6 up to the detection limit after 90 minutes of irradiation. These results suggest that the application of aPDT with MB may be an effective alternative to inactivate the SARS-CoV-2 virus in wastewater.



## 1) INTRODUÇÃO

A pandemia COVID-19 é causada por um novo coronavírus, o SARS-CoV-2. Desde os primeiros relatos de casos em Wuhan - província de Hubei – China, a pandemia COVID-19 já foi confirmada em 222 países e territórios, com mais de 192 milhões de casos confirmados e mais 4 milhões de mortes confirmadas, dados oficiais obtidos no relatório semanal da OMS, em 20 de Julho de 2021<sup>3</sup>.

Os coronavírus (ordem: *Nidovirales*, família: *Coronaviridae*, subfamília: *Coronavirinae*) são vírus de RNA de cadeia simples, com tamanhos que variam de 60 a 220 nm<sup>4</sup>. A sua superfície possui projeções em forma de coroa, que são usadas para se ligarem às células alvo. Os coronavírus podem infectar uma gama variada de animais<sup>5</sup>, assim como os humanos<sup>6</sup>, provocando doenças de categoria leve a moderada, e em muitos casos causando a morte do indivíduo infectado<sup>7</sup>. Entre os coronavírus que infectam os humanos descritos na literatura científica até o momento, merecem destaque o MERS-CoV<sup>8</sup> e o SARS-CoV<sup>9</sup> por terem causado epidemias, e recentemente o SARS-CoV-2 por causar a pandemia COVID-19, com uma taxa de mortalidade menor, mas com uma transmissibilidade superior à do SARS-CoV e MERS-CoV<sup>10-12</sup>.

Com o avanço da pandemia COVID-19, o foco centrou-se nas variantes do SARS-CoV-2, a Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gama (P1 ) e Delta (B.1.617.2) por estas estarem associadas ao aumento da transmissibilidade a nível mundial<sup>13</sup>. A principal via de transmissão da COVID-19 dá-se pelo contato direto com a pessoa infectada ou por meio de gotículas respiratórias de um indivíduo infectado, gotículas essas, que podem ser libertadas através da tosse, espirro, respiração ou de outras formas de bioaerossóis<sup>14</sup>.

Inicialmente pensava-se que o vírus afetava apenas o sistema respiratório, mas logo ficou comprovado que o sistema gastrointestinal também é afetado. O SARS-CoV-2 liga-se à enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), localizada na superfície das células entéricas, replica-se e é eliminado nas fezes de forma semelhante aos vírus entéricos, sugerindo assim, uma outra via de transmissão do vírus SARS-CoV-2, através das fezes de

indivíduos com sintomas agudos, de indivíduos assintomáticos ou de pacientes curados que não apresentam qualquer sintoma<sup>15-19</sup>.

O ácido ribonucleico SARS-CoV-2, foi detetado em sistemas de esgotos, na Holanda em meados de março de 2020. Foi detetado nestas águas o RNA viral SARS-CoV-2, logo após uma semana de ser detetado o primeiro caso de COVID-19 na Holanda<sup>20</sup>. Posteriormente, a presença deste vírus foi relatada em amostras de esgoto de hospital<sup>21</sup>, em águas residuais não tratadas<sup>22,23</sup> e em águas residuais secundariamente tratadas<sup>22</sup>, havendo um relatório científico da OMS, que confirma a existência do RNA viral SARS-CoV-2 não infeccioso em águas residuais de regiões como a Múrcia; Milão; Paris; Brisbane; Massachusetts e Paquistão<sup>24</sup>.

Embora ainda não exista um consenso científico sobre o risco de transmissão do SARS-CoV-2 através da água residual, essa possibilidade não foi cientificamente descartada. Há estudos que indicam que a persistência do RNA SARS-CoV-2 nas águas residuais pode ser de vários dias<sup>25</sup>. Com a descoberta do RNA SARS-CoV-2 em efluentes tratados e não tratados, surgiu a questão do potencial risco acrescido de transmissão do vírus através deste meio e, por conseguinte, uma maior atenção com a exposição ocupacional dos indivíduos que trabalham nas estações de tratamentos de águas residuais (ETARs)<sup>26</sup>.

Além do contato direto com o efluente, a respiração de gotículas/aerossóis contaminados com partículas virais infecciosas é tida como a principal fonte de transmissão de vírus nas ETARs<sup>27</sup>, com a aerossolização que ocorre durante os diferentes estágios de colheita e tratamento de águas residuais e manuseamento das lamas, apontados como um risco de infecção por vírus como o norovírus e o rotavírus, podendo causar efeitos adversos, incluindo doenças respiratórias e gastrointestinais entre os trabalhadores das ETARs<sup>28,29</sup>. A adsorção do SARS-CoV-2 a partículas ou poeira, pode possibilitar o seu transporte por longas distâncias<sup>30,31</sup>, como mostrado num estudo em que o SARS-CoV-2 se manteve estável em aerossóis, e com a infetividade das partículas virais permanecendo por até três

horas<sup>32</sup>. Portanto esta via de transmissão deve ser considerada, embora não haja informação suficiente até à data<sup>33</sup>.

Até ao momento, pouco se sabe sobre o comportamento do SARS-CoV-2 em águas residuais, bem como as concentrações deste vírus nas ETARs<sup>34</sup>. No entanto, mesmo sem um consenso do potencial risco de transmissão do vírus através de águas residuais, e se considerarmos que em menos de vinte anos, este é o terceiro novo coronavírus a causar doença muito grave em vários países, medidas e estratégias de prevenção devem ser tomadas para evitar a transmissão por esta via, com a remoção ou inativação de contaminantes virais das águas residuais, incluindo o SARS-CoV-2<sup>35</sup>.

A desinfecção de águas residuais é de extrema importância para inativar ou eliminar microrganismos patogénicos, podendo ser usadas para tal várias abordagens como a ozonização, cloração ou irradiação ultravioleta. As ETARs convencionais (as que usam o cloro para desinfecção) são eficientes para a remoção de vírus sem o invólucro lipídico, que são os vírus mais estáveis no ambiente, em comparação com os vírus que possuem um invólucro lipídico, logo são também eficientes para os vírus com invólucro como é o caso do SARS-CoV-2<sup>36</sup>.

Alguns estudos mostram, no entanto, que a dose recomendada de cloro, pode não ser suficiente para a inativação do SARS-CoV-2 em água residual<sup>37</sup>. Contudo, o aumento da dosagem de compostos à base de cloro aumenta formação de subprodutos de desinfecção que são nocivos para com os humanos e para o ambiente<sup>38-41</sup>. Ainda assim, o modo de ação dos desinfetantes à base de cloro no vírus SARS-CoV-2 em águas residuais não está bem compreendido, o que leva a adoção de medidas extremas, nomeadamente o aumento do uso da quantidade de cloro livre, muito acima do valor recomendado pela OMS<sup>42</sup>.

Uma das consequências da baixa eficiência da desinfecção é a posterior multiplicação dos microrganismos patogénicos (o chamado *regrowth*), quer pela recuperação de microrganismos apenas parcialmente afetados pelo agente desinfetante, quer por, alguns microrganismos, encontrarem condições favoráveis à sua multiplicação<sup>43</sup>.

Por isso, é importante adotar práticas de desinfecção de águas residuais com menos impactos possíveis no ecossistema como um todo.

A Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT, do acrónimo em inglês: *Antimicrobial photodynamic therapy*) mostrou já ser eficaz na desinfecção das águas residuais<sup>44-49</sup>, sendo uma técnica segura para os humanos, animais, plantas e para o ecossistema, sendo também uma abordagem pouco dispendiosa<sup>50</sup>. A aPDT baseia-se na utilização de um composto fotossensibilizador, que na presença de luz visível em um determinado comprimento de onda, é capaz de absorver a energia proveniente desta luz emitida, e transferi-la para o oxigénio molecular que se encontra difundido no ambiente, gerando assim, espécies reativas de oxigénio, como o oxigénio singleto, que são espécies altamente tóxicas para os microrganismos alvo. Estas espécies reativas de oxigénio são responsáveis pela oxidação de vários componentes vitais dos microrganismos, o que leva à sua inativação<sup>51-53</sup>. Numa fase inicial do processo, o fotossensibilizador vai aderir às estruturas externas dos microrganismos alvo e posteriormente, com a irradiação em curso, dá-se o início da inativação fotodinâmica, em que, os constituintes celulares como os lípidos e proteínas são sujeitos a reações oxidantes que modificarão a sua estrutura e, conseqüentemente, perturbarão o normal funcionamento destes componentes, afetando as suas funções biológicas<sup>53</sup>.

Esta técnica possui a vantagem de evitar o desenvolvimento de resistência por parte dos microrganismos mesmo depois da aplicação de ciclos repetidos de tratamento, visto que, as espécies reativas de oxigénio formadas vão agir simultaneamente em vários alvos da estrutura microbiana, e com isso, inativar irreversivelmente os microrganismos, mesmo que estes apresentem resistência aos antimicrobianos clássicos<sup>54-57</sup>.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

No estudo feito para avaliar a eficácia da aPDT contra o modelo do vírus SARS-CoV-2, o fago phi6<sup>58</sup>, foram usados três tipos de matrizes diferentes: 1- uma solução tampão fosfato-salino (PBS), usado como solução padrão, mas também muito importante para perceber o desempenho e a eficácia do fotossensibilizador num meio sem matéria orgânica; 2- Água residual filtrada e 3- Água residual não filtrada.

Os ensaios com as duas matrizes de água residual (filtrada e não filtrada) foram feitos com o propósito de chegar o mais próximo possível da realidade de uma ETAR, como também, avaliar o impacto da matéria orgânica particulada e dissolvida na água residual, na eficiência da aPDT. Para a filtração da água residual foram usados filtros de porosidade 0,22 µm, com o objetivo de diminuir a quantidade de matéria orgânica particulada, mas também de reduzir a quantidade dos microrganismos naturais existentes na água residual.

### **2.1) AMOSTRA DE ÁGUAS RESIDUAIS**

As amostras de água residual usadas neste estudo foram tratadas secundariamente e foram recolhidas numa estação de tratamento de águas residuais que atende a uma vasta área geográfica, onde estão inseridas casas, hospitais, escolas, indústrias e outros edifícios, portanto, o afluente que chega a esta ETAR é uma combinação de esgotos domésticos e industriais. Estas amostras foram colhidas de manhã, à mesma hora, nos dias (16, 18 e 20 de dezembro de 2020) e representavam um acúmulo de efluente num período de 24 h (amostras compostas). No transporte e no laboratório as amostras foram protegidas da luz e refrigeradas a 4 °C até ao seu uso.

### **2.2) ESTIRPE BACTERIANA E CONDIÇÕES DE CULTURA**

A estirpe bacteriana usada nestes estudos foi uma *Pseudomonas syringae*, bactéria hospedeira do fago phi6<sup>58</sup>. Um stock desta bactéria foi preparado, tendo sido distribuída em microtubos que continham glicerol, e posteriormente mantidos a -80 °C. Antes de cada ensaio, um microtubos foi retirado do -80 °C, deixado à temperatura ambiente, e de seguida a bactéria foi transferida assepticamente para um frasco contendo 30 mL do meio

de cultura *Trypic Soy Broth* (TSB) (Liofilchem, Itália) e cultivada sob agitação de 120 rpm a 25 °C durante 18 a 24 h.

### **2.3) PREPARAÇÃO DO BACTERÍO FAGO**

O fago phi6 utilizado neste estudo foi obtido de um stock de fago já existente no Laboratório de Microbiologia Aplicada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro. Foi preparado um stock a partir deste. Posteriormente, foi feita a titulação do fago, para se determinar a concentração do stock, que era de  $10^8$  unidades formadoras de placas por mililitro (UFPmL<sup>-1</sup>), o novo stock foi armazenado a 4 °C.

Todas as suspensões usadas nos ensaios foram preparadas com um volume final de 20 mL [18 mL correspondente da matriz usada (PBS / água residual tratada / água residual não tratada) e 2 mL do stock de fago].

### **2.4) ENSAIOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA**

#### **2.4.1) FOTOSSENSIBILIZADOR**

Uma solução stock de azul de metileno foi preparada a 500 µM em solução tampão fosfato (PBS) e posteriormente armazenada no escuro. Antes de cada ensaio a solução stock foi sonicada durante 30 min à temperatura ambiente (banho ultrassónico, Nahita 0,6 L, 40 kHz).

### **2.4.2) CONDIÇÕES DE IRRADIAÇÃO**

Para os ensaios de terapia fotodinâmica, após um período prévio de incubação do fotossensibilizador no escuro, as amostras foram irradiadas com luz branca artificial nomeadamente lâmpadas LED (EL<sup>®</sup>MARK, 20 W, ~230 V e ~50 Hz) com uma intensidade de 50 mW cm<sup>-2</sup> previamente medida com um potenciômetro (modelo FieldMaxII-Top, Coherent, Santa Clara CA, EUA) ligado a um sensor com sensibilidade, (modelo PS19Q, Coherent Santa Clara CA, EUA).

### **2.4.3) CONTROLOS**

Em todos os ensaios foram incluídos um controlo claro e um controlo escuro, afim de avaliar a eficiência do tratamento fotodinâmico, e a toxicidade do fotossensibilizador não irradiado. Os controlos claros consistiram na suspensão do bacteriófago sem a adição do fotossensibilizador e sujeita às mesmas condições de luz que as amostras. Os controlos escuros corresponderam a suspensão do bacteriófago com o fotossensibilizador (na mesma concentração que as amostras), estes foram protegidos da luz com folhas de alumínio.

### **2.4.4) Ensaios de fotoinativação em PBS**

A eficiência da fotoinativação do fago pelo azul de metileno, na concentração de 5,0 µM, foi avaliada através da quantificação de bacteriófagos. Suspensões de 20 mL de fago em PBS, foram distribuídas em placas de 6 poços esterilizados. Cada uma das condições (amostra, controlo claro e controlo escuro) com um volume final de 5 mL. A amostra e o controlo escuro com com 4,95 mL de suspensão e 0,005 mL de azul de metileno, o controlo claro com 5 mL de suspensão. De seguida as placas foram incubadas no escuro durante 10 min, sob agitação (100 rpm), com o objetivo de possibilitar a adsorção do fotossensibilizador às partículas virais. Após a incubação no escuro, a placa de 6 poços

contendo a amostra e o controlo claro, foram irradiados com luz branca a uma potência de  $50 \text{ mW cm}^{-2}$  e mantidas sob agitação. A placa com o controlo escuro esteve também sob agitação, tendo sido protegida da luz durante o período de irradiação. O tempo total de irradiação no ensaio em PBS foi de 60 min, em que nos tempos de exposição à luz correspondentes a 0, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 min foram colhidas alíquotas de  $100 \mu\text{L}$  da amostra e controlos, e de seguida sujeitas a diluições sucessivas de 1:10 em PBS. Posteriormente, alíquotas de  $10 \mu\text{L}$  foram plaqueadas, em duplicado, pelo método de gota em placas de Petri, contendo uma camada de *Tryptic Soy Agar* (TSA) e uma camada por cima de *TSA-soft* (meio que permite que o fago se desloque) contendo o hospedeiro do fago phi6. Após as gotas estarem secas, as placas de Petri foram incubadas a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 24 h. Foram realizados três ensaios independentes para cada uma das águas residuais colhida em dias diferentes.

#### **2.4.5) Ensaios de fotoinativação em água residual filtrada**

Para a filtração da água residual utilizaram-se membranas com poro de  $0,22 \mu\text{m}$ . Após a filtração, 20 mL uma suspensão (2 mL fago e 18 mL de água residual) foi preparada, e de seguida distribuídas em placas de 6 poços. O volume final para cada um dos poços foi de 5 mL, em que a amostra continha 4,95 mL de suspensão e 0,005 mL de azul de metileno e os controlos claro e escuro, que também foram realizados neste experimento, foram preparadas em condições similares aos controlos anteriormente descritos. Seguiu-se um período de incubação no escuro de 10 min, sob agitação. Posteriormente, com exceção ao controlo escuro, foram irradiadas a amostra e o controle claro com luz artificial, com uma potência de  $50 \text{ mW cm}^{-2}$ . O tempo total de irradiação foi de 90 min, com alíquotas de  $100 \mu\text{L}$  da amostra e controlos coletadas nos tempos 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 90 min, diluídas em PBS e plaqueadas (de acordo com a descrição anterior) pelo método gota. Seguiu-se a incubação das placas de Petri a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 h. Foram realizados três ensaios independentes para cada uma das águas residuais colhidas em dias diferentes.



#### **2.4.6) Ensaios de fotoinativação em água residual não filtrada**

Os ensaios em água residual não filtrada foram realizados com o objetivo de avaliar a eficiência da fotoinativação antimicrobiana em água residual inalterada. Estes estudos foram realizados nas mesmas condições dos ensaios descritos acima, com a diferença de que, em vez de ser utilizada água residual filtrada, foi usada água residual bruta. Foram realizados três ensaios independentes para cada uma das águas residuais colhidas em dias diferentes.

#### **2.4.7) QUANTIFICAÇÃO DOS BACTERIÓFAGOS**

Após o período de incubação de 24 horas as placas foram contadas e o teor das placas de lise foi determinado pela quantificação de unidades formadoras de placas (UFP). As placas de lise foram contadas na diluição mais adequada e a média da concentração de partículas viáveis foi estimada a partir do valor médio de UFP nas duas réplicas, retificadas com o fator de diluição e expressa em  $\text{Log}_{10}$  UFP  $\text{mL}^{-1}$ .

#### **2.5) ANÁLISE ESTATÍSTICA**

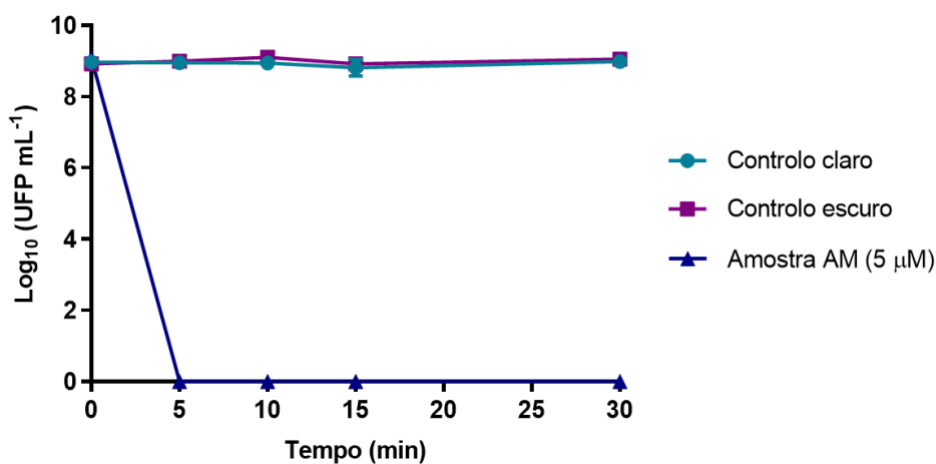
A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software Prisma GraphPad 9.0.0. A distribuição normal dos dados avaliada pelo mesmo software. O significado da concentração de partículas virais entre os tratamentos, e ao longo das experiências, foi avaliado através da análise de variância ANOVA e foi usado o teste de comparações múltiplas de Tukey. Para diferentes tratamentos, a significância das diferenças foi avaliada comparando os resultados obtidos nas amostras de teste entre si e com os resultados obtidos para as amostras de controle correspondentes, para os diferentes tempos. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Foram realizadas três experiências independentes em duplicado para cada ensaio.

## RESULTADOS

### 3.1) Ensaios aPDT em PBS

Os resultados obtidos nos ensaios em PBS, com o azul de metileno a uma concentração de 5  $\mu\text{M}$ , são apresentados na Figura 6. Observou-se uma diminuição (até o limite da detecção) em cerca de 9 log UFP  $\text{mL}^{-1}$  na concentração do bacteriófago após 5 min de tratamento, em comparação com o tempo inicial, antes da aplicação do tratamento ( $p < 0,05$ ).

Para todos os controlos, claro e escuro, a concentração de bacteriófago manteve-se constante no decorrer de todo o ensaio, o que mostra que as partículas virais quando são irradiadas com luz branca e sem a adição do PS (controlo claro), não são afetadas, mas também a inexistência de efeitos tóxicos do azul de metileno, quando este não é sujeito a irradiação (controlo escuro), sobre as partículas virais ( $p > 0,05$ ).

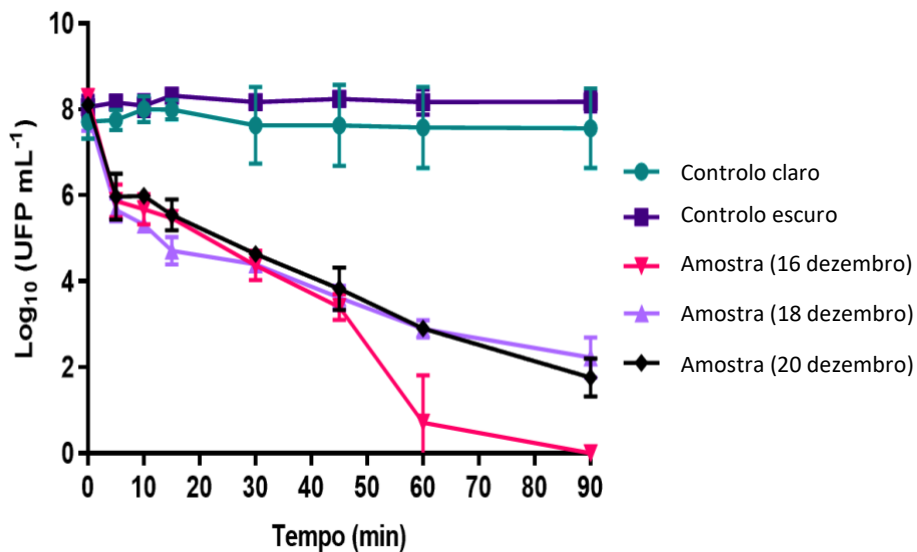


**Figura 6.** Fotoinativação do bacteriófago phi6, incubado com azul de metileno (AM) a 5  $\mu\text{M}$  e irradiado com luz branca artificial ( $50 \text{ mW cm}^{-2}$ ) por 30 minutos, em PBS. Os valores são expressos como a média de três ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão (DP) entre ensaios. Em alguns casos os símbolos sobrepõem-se às barras de DP.

### 3.2) Ensaios aPDT em água residual filtrada

Na Figura 7, estão apresentados os resultados obtidos nos ensaios com amostras de água residual colhidas em dias diferentes e posteriormente filtradas. Os resultados mostram que a luz branca ( $50 \text{ mW cm}^{-2}$ ), combinada com o azul de metileno (a uma concentração de  $5 \mu\text{M}$ ), causaram inativação de pelo menos 6 log no teor de bacteriófago, após 90 min de tratamento. Ao comparar os resultados das amostras de água residual, colhidas em dias diferentes, nota-se que a eficiência na inativação foi diferente entre amostras, sendo que, por exemplo, na água residual colhida no dia 16 de dezembro houve inativação maior, cerca de mais 2 log UFP  $\text{mL}^{-1}$  que nos outros dois dias, inativação até ao limite da detecção, aos 90 minutos ( $p < 0,05$ ).

Os resultados dos controlos mostram que não houve alterações significativas ( $p > 0,05$ ), no teor de bacteriófago, o que evidencia que a viabilidade do bacteriófago não foi diretamente afetada pela luz, ou pelo azul de metileno no escuro.

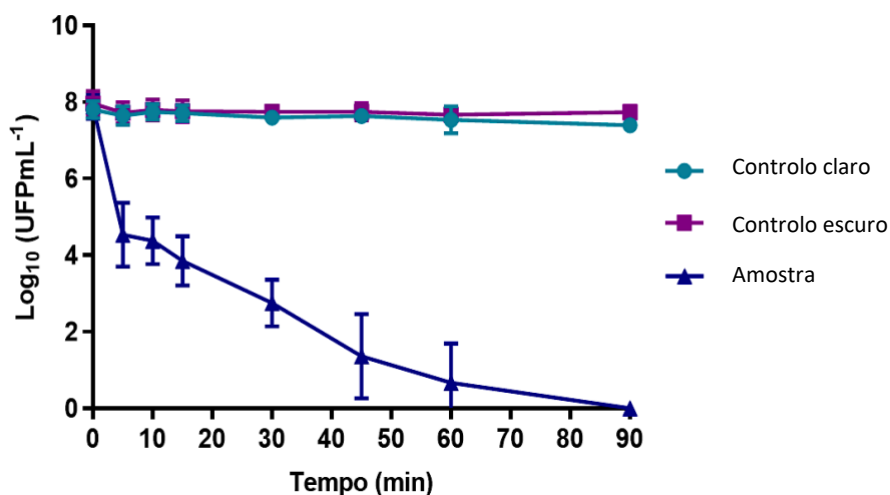


**Figura 7.** Fotoinativação do bacteriófago phi6, em águas residuais filtradas (filtro de porosidade  $0,22 \mu\text{m}$ ), incubado com azul de metileno (AM) a  $5 \mu\text{M}$  e irradiado com luz branca artificial ( $50 \text{ mW cm}^{-2}$ ) por 90 minutos. Os valores são expressos como a média de três ensaios independentes para cada amostra de água residual. As barras de erro representam o desvio padrão (DP) entre ensaios. Em alguns casos os símbolos sobrepõem-se às barras de DP.

### 3.3) Ensaios aPDT em água residual não filtrada

A Figura 8 representa os resultados obtidos nos ensaios de aPDT em água residual não filtrada. Estes resultados mostram que, após 90 min irradiação da amostra com luz branca (50 mW cm<sup>-2</sup>), e azul de metileno a 5 µM, houve uma redução do conteúdo do bacteriófago até ao limite de deteção do método, cerca de 8 log UFP mL<sup>-1</sup> (p<0,05).

No caso dos controlos, claro e escuro, não houve diminuição significativa do conteúdo do bacteriófago, confirmando assim, que a viabilidade do fago não foi diretamente afetada pela luz, mas também o azul de metileno (a 5 µM) por si só não é tóxico no escuro (p>0,05).



**Figura 8.** Fotoinativação do bacteriófago phi6, incubado com azul de metileno (AM), em água residual não filtrada, sob irradiação com luz branca artificial (50 mW cm<sup>-2</sup>) por 90 minutos. Os valores são expressos como média de três ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão (DP) entre ensaios. Nos controlos as barras estão sobrepostas pelos símbolos.

## DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência da aPDT na inativação do vírus SARS-CoV-2 em água residual. Para tal foi utilizado o azul de metileno como composto fotossensibilizador, e o bacteriófago phi6 como organismo modelo.

Embora a presença do vírus SARS-CoV-2 esteja confirmada em água residual por alguns estudos, o tempo de sobrevivência e a infecciosidade neste tipo de ambiente ainda carece de estudos, por isso, a prevenção é a melhor estratégia a ser adotada, a fim de diminuir os riscos de exposição e transmissibilidade por esta via<sup>60</sup>. Contudo, os processos de desinfecção atualmente utilizados, como a cloração, são capazes de inativar o vírus SARS-CoV-2 em água<sup>60</sup>. No entanto, a sobredosagem deste composto gera um elevado nível de subprodutos tóxicos causando riscos à saúde humana e ao meio ambiente<sup>37</sup>.

Recentemente, com a publicação dos resultados de dois estudos, houve a formulação da hipótese de que a aPDT poderia ser eficaz contra o SARS-CoV-2<sup>61,62</sup>. Na verdade a eficiência da aPDT viral já foi comprovada para diferentes tipos de vírus e bacteriófagos conhecidos, mas, sendo o SARS-CoV-2 um vírus emergente, poucos se sabe sobre o comportamento da aPDT com este vírus, sobretudo em águas residuais.

De acordo com a literatura, a terapia fotodinâmica tem demonstrado ser eficaz na inativação de microrganismos em águas residuais<sup>48,49,63,,64</sup>. *Costa et al*, mostraram que a aplicação da aPDT usando porfirinas catiónicas, foi capaz de inativar até ao limite de detecção, o bacteriófago *T4-like* (utilizado como modelo de vírus que infetam humanos) em água residual<sup>64</sup>, tal como *Bartolomeu et al. 2021*, mostraram que, uma formulação de porfirinas catiónicas, promoveu uma redução em cerca de 7 log do bacteriófago *T4-like* em água residual, sugerindo que é possível aplicar esta técnica na desinfecção destas águas<sup>49</sup>.

Estudos realizados com o PS azul de metileno, mostraram que este PS pode ser eficiente contra os vírus em diferentes matrizes, nomeadamente no sangue e nos seus componentes<sup>65,66,67</sup>. Os poucos estudos disponíveis na literatura, sobre a aplicação de aPDT em água residual com o azul de metileno, foram maioritariamente realizados em bactérias, sobretudo, bactérias fecais, com os resultados desses estudos mostrando a capacidade do azul de metileno em inativar estes microrganismos, neste tipo de ambiente<sup>68,69,70,71</sup>. Relativamente aos vírus, há uma maior escassez de estudos em relação

à inativação destes microrganismos em água residual por aPDT. Contudo, *Sobsey et al.* 1974, sugeriram que o azul de metileno poderia ser eficaz na inativação de vírus em água residual. Nesse estudo, os autores usaram o *Poliovirus* (como modelo de vírus entéricos). Apesar dos autores se limitarem a usar apenas o azul de metileno, sem recorrer a aPDT, os resultados mostraram redução em cerca de 4 log UFP ml<sup>-1</sup> do vírus durante cerca de 14 dias a concentrações de 30 e 100 mg/l de azul de metileno<sup>68</sup>.

O estudo de *Gerba et al.* 1977, de aPDT com o azul de metileno para inativar o *Poliovirus* em água residual tratada secundariamente, mostrou que este PS foi capaz de inativar o vírus naquele tipo de ambiente. No estudo usaram o azul de metileno à concentração de 13 µM e irradiação com luz branca de 20 W/m<sup>2</sup>. Estes autores testaram a eficiência da aPDT com este fotossensibilizador em tampão, e os resultados mostraram que, após 5 min de exposição do *Poliovirus* à luz e ao azul de metileno, houve uma redução do título do vírus em cerca de 99,9% em relação ao título inicial. Em água residual não tratada, utilizando a mesma concentração e a mesma irradiância, houve uma redução de mais de 90% do título do vírus, após cerca de 5 min de irradiação, no entanto, salienta-se que o tempo de incubação do azul de metileno, no escuro, foi de 24 h. Nos controles escuros, não houve diminuição significativa do conteúdo do vírus<sup>72</sup>.

Estes resultados estão de acordo com o presente estudo em relação à inativação de vírus em água residual por aPDT com o azul de metileno, no qual este PS mostrou ser eficiente na inativação do bacteriófago a uma concentração de 5 µM. Observou-se uma inativação de cerca de 8 log UFP mL<sup>-1</sup> do fago após 5 min de tratamento em tampão, e 8 log UFP mL<sup>-1</sup> após 90 minutos de tratamento em água residual tratada secundariamente. Contudo, no presente estudo a concentração do azul de metileno utilizado foi menor, 5 µM, o que diminui os riscos de toxicidade.

Em relação ao SARS-CoV-2, devido à sua recente descoberta, não há ainda relatos na literatura da aplicação de aPDT na desinfecção de água residual contaminada por este vírus, contudo, há alguns estudos realizados *in vitro*, na tentativa de inativar ou inibir o SARS-CoV-2, por a aplicação da aPDT com o azul de metileno<sup>73,74</sup>. *Svyatchenko et al.*, 2021 investigaram a possibilidade de usar aPDT para inativar SARS-CoV-2. Para isso utilizaram

células de rim de macaco como hospedeiras, luz laser com uma densidade de 40 J/cm<sup>2</sup>, e concentrações de 1,0 e 10,0 µg/ml de azul de metileno. Os resultados mostraram que após tratamento, houve uma inativação completa do vírus, e nos controlos claro e escuro não houve redução significativa do conteúdo viral, o que indica uma elevada eficácia da aPDT com o azul de metileno a baixas concentrações<sup>74</sup>.

Os resultados deste estudo estão pois em conformidade com os resultados descritos na literatura para o SARS-CoV-2. Apesar de se ter usado um vírus modelo do SARS-CoV-2, um hospedeiro e uma fonte de luz diferente, o conjunto de resultados mostra que o azul de metileno quando irradiado com luz visível, inativou significativamente o vírus modelo, nas várias condições experimentais testadas. Para tal, pode ter contribuído o facto destes dois vírus, bacteriófago phi6 e SARS-CoV-2, apresentarem RNA como ácido nucleico e possuírem invólucro lipídico.

De facto, está descrito em vários estudos que os vírus com invólucro lipídico são mais suscetíveis à aPDT do que os vírus sem invólucro, sugerindo que as estruturas externas, invólucro e cápside, são os principais alvos deste tratamento. O dano nestas estruturas externas promove o extravasamento de conteúdo viral<sup>75-78</sup>. *Korneev et al., 2019* demonstraram que a aPDT induziu a remoção de glicoproteínas de superfície do vírus *H5N8*, o qual pertence à mesma classe do SARS-Cov-2 (vírus de RNA com invólucro), tornando-o não infeccioso e inativando-o por completo<sup>79</sup>. *Ye et al., 2018* mostraram também em amostras ambientais que os vírus com invólucro são mais suscetíveis. Há no entanto, falta de estudos sobre os mecanismos de inativação de forma a perceber se as proteínas dos vírus com invólucro são geralmente mais suscetíveis a oxidantes do que as proteínas dos vírus sem invólucro, e se esta é a razão pela qual há uma tendência dos vírus com invólucro para serem mais suscetíveis à inativação por oxidantes químicos<sup>80</sup>.

*Costa et al., 2012* sugerem que tanto os radicais livres como o oxigénio singlete estão identificados como ROS importantes no processo de aPDT viral, sendo que o oxigénio singlete parece ser o ROS mais importante no efeito viricida em vírus de mamíferos e bacteriófagos. No entanto, indicam que a contribuição simultânea dos mecanismos tipo I e tipo II na aPDT carece de mais estudos<sup>81</sup>.

No presente estudo, após ensaios em tampão (PBS) para desenvolver o protocolo de aPDT, tentou-se reproduzir uma situação próxima à observada numa ETAR. Para isso realizou-se ensaios em água residual filtrada e não filtrada. Ao comparar os resultados nota-se que aos 90 minutos, houve a inativação do vírus até ao limite de deteção do método, em ambos os ensaios. No entanto, ao comparar os resultados obtidos em água residual e em PBS percebe-se que a aplicação da aPDT foi mais eficiente em PBS. *Alves et al.* 2014, sugerem que a difusão do oxigénio singlete ou outras espécies reativas de oxigénio depende do tipo de ambiente em que estes se encontram. Portanto a quantidade de matéria orgânica na água residual pode influenciar a taxa de difusão<sup>53</sup>. *Bartolomeu et al.*,2021 realçam que partículas de matéria orgânica podem facilmente extinguir e/ou eliminar as espécies reativas de oxigénio ou até mesmo adsorver o PS. Como consequência, a disponibilidade do PS para gerar espécies reativas de oxigénio vai diminuir, podendo então resultar numa inativação menos eficiente em água residual <sup>49</sup>.

A comparação dos resultados obtidos neste estudo com resultados obtidos em estudos anteriores não pode, no entanto, ser uma comparação direta, visto que nestes estudos não se usaram as mesmas condições na aPDT e também se usaram modelos de microrganismos diferentes. Contudo, em todos os estudos que avaliaram o efeito da fotoinativação em vírus de RNA com invólucro, a aPDT foi bem-sucedida, independentemente do PS ou da fonte de luz utilizada, direcionando fortemente para o entendimento de que esta abordagem pode ser eficaz na inativação do SARS-CoV-2 em água residual, e na mitigação da COVID-19.

Os resultados obtidos neste estudo vão acrescentar mais informação em relação à aplicação da aPDT com o azul de metileno em água residual.



## Referências

1. World Health Organization. (WHO). WHO-convened Global Study of Origins of SARS-CoV-2 : China Part (14 January-10 February 2021). *Jt. WHO-China Study Team Rep.* 120 (2021).
2. Gorbalenya A.E., Baker S.C., Baric R.S., de Groot R.J., Drosten C., Gulyaeva A.A., Haagmans B.L., Lauber C., Leontovich A.M., Neuman B.W., Penzar D., Perlman S., Poon L.L.M., Samborskiy D.V., Sidorov I.A., Sola I., Z. J. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* **5**, 536 (2020).
3. World Health Organization(WHO). Weekly Epidemiological Update Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), 20 July 2021. (2021).
4. Cui, J., Li, F. & Shi, Z.-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 2018 173 **17**, 181–192 (2018).
5. Fehr, A. R. & Perlman, S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Coronaviruses* **1282**, 1 (2015).
6. Zumla, A., Chan, J. F. W., Azhar, E. I., Hui, D. S. C. & Yuen, K.-Y. Coronaviruses — drug discovery and therapeutic options. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 327 (2016).
7. Gulati, A. *et al.* A Comprehensive Review of Manifestations of Novel Coronaviruses in the Context of Deadly COVID-19 Global Pandemic. *Am. J. Med. Sci.* **360**, 5 (2020).
8. Mostafa, A. *et al.* Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV): State of the Science. *Microorganisms* **8**, 1–27 (2020).
9. Raoult, D., Zumla, A., Locatelli, F., Ippolito, G. & Kroemer, G. Coronavirus infections: Epidemiological, clinical and immunological features and hypotheses. *Cell Stress* **4**, 66 (2020).
10. Petrosillo, N., Viceconte, G., Ergonul, O., Ippolito, G. & Petersen, E. COVID-19, SARS and MERS: are they closely related? *Clin. Microbiol. Infect.* **26**, 729 (2020).
11. Liu, Y., Gayle, A. A., Wilder-Smith, A. & Rocklöv, J. The reproductive number of COVID-19 is higher compared to SARS coronavirus. *J. Travel Med.* **27**, 1–4 (2020).
12. Yan, Y. *et al.* The First 75 Days of Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Outbreak: Recent Advances, Prevention, and Treatment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **17**, (2020).
13. World Health Organization(WHO). . COVID-19 weekly epidemiological update, edition 42, 1 June 2021. (2021).
14. World Health Organization(WHO). Water, sanitation, hygiene, and waste management for SARS-CoV-2, the virus that causes COVID-19. *Interim Guid.* 1–11 (2020).
15. Xiao, F. *et al.* Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology* **158**, 1831-1833.e3 (2020).
16. Papoutsis, A. *et al.* Detection of SARS-CoV-2 from patient fecal samples by whole genome sequencing. *Gut Pathog.* **13**, 1–8 (2021).
17. Pan, Y., Zhang, D., Yang, P., Poon, L. L. M. & Wang, Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet. Infect. Dis.* **20**, 411 (2020).
18. Tang, A. *et al.* Detection of Novel Coronavirus by RT-PCR in Stool Specimen from Asymptomatic Child, China. *Emerg. Infect. Dis.* **26**, 1337 (2020).
19. Dhama, K. *et al.* SARS-CoV-2 existence in sewage and wastewater: A global public

- health concern? *J. Environ. Manage.* **280**, 111825 (2021).
20. Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R. & Brouwer, A. Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in the Netherlands. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **7**, 511–516 (2020).
  21. Wang, J. *et al.* SARS-CoV-2 RNA detection of hospital isolation wards hygiene monitoring during the Coronavirus Disease 2019 outbreak in a Chinese hospital. *Int. J. Infect. Dis.* **94**, 103 (2020).
  22. Randazzo, W. *et al.* SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Res.* **181**, 115942 (2020).
  23. Ahmed, W. *et al.* First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Sci. Total Environ.* **728**, 138764 (2020).
  24. World Health Organization(WHO). Status of environmental surveillance for SARS-CoV-2 virus: Scientific brief. (2020) doi:10.1021/acs.estlett.0c00357.
  25. Ahmed, W. *et al.* Decay of SARS-CoV-2 and surrogate murine hepatitis virus RNA in untreated wastewater to inform application in wastewater-based epidemiology. *Environ. Res.* **191**, 110092 (2020).
  26. Venugopal, A. *et al.* Novel wastewater surveillance strategy for early detection of coronavirus disease 2019 hotspots. *Curr. Opin. Environ. Sci. Heal.* **17**, 8 (2020).
  27. Thakur, A. K. *et al.* Secondary transmission of SARS-CoV-2 through wastewater: Concerns and tactics for treatment to effectively control the pandemic. *J. Environ. Manage.* **290**, 112668 (2021).
  28. Uhrbrand, K., Schultz, A. C., Koivisto, A. J., Nielsen, U. & Madsen, A. M. Assessment of airborne bacteria and noroviruses in air emission from a new highly-advanced hospital wastewater treatment plant. *Water Res.* **112**, 110–119 (2017).
  29. Pasalari, H., Ataei-Pirkooh, A., Aminikhah, M., Jafari, A. J. & Farzadkia, M. Assessment of airborne enteric viruses emitted from wastewater treatment plant: Atmospheric dispersion model, quantitative microbial risk assessment, disease burden. *Environ. Pollut.* **253**, 464–473 (2019).
  30. Groulx, N., Urch, B., Duchaine, C., Mubareka, S. & Scott, J. A. The Pollution Particulate Concentrator (PoPCon): A platform to investigate the effects of particulate air pollutants on viral infectivity. *Sci. Total Environ.* **628–629**, 1101–1107 (2018).
  31. Coccia, M. Factors determining the diffusion of COVID-19 and suggested strategy to prevent future accelerated viral infectivity similar to COVID. *Sci. Total Environ.* **729**, 138474 (2020).
  32. Doremalen, N. van *et al.* Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1564–1567 (2020).
  33. Mohapatra, S. *et al.* The novel SARS-CoV-2 pandemic: Possible environmental transmission, detection, persistence and fate during wastewater and water treatment. *Sci. Total Environ.* **765**, 142746 (2021).
  34. Langone, M. *et al.* SARS-CoV-2 in water services: Presence and impacts. *Environ. Pollut.* **268**, 115806 (2021).
  35. Lesimple, A., Jasim, S. Y., Johnson, D. J. & Hilal, N. The role of wastewater treatment plants as tools for SARS-CoV-2 early detection and removal. *J. Water Process Eng.*

- 38**, 101544 (2020).
36. Wang, H. *et al.* Differential removal of human pathogenic viruses from sewage by conventional and ozone treatments. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **221**, 479 (2018).
  37. Zhang, D. *et al.* Potential spreading risks and disinfection challenges of medical wastewater by the presence of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) viral RNA in septic tanks of Fangcang Hospital. *Sci. Total Environ.* **741**, 140445 (2020).
  38. Richardson, S. D., Plewa, M. J., Wagner, E. D., Schoeny, R. & DeMarini, D. M. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **636**, 178–242 (2007).
  39. Bull, R. J. *et al.* Potential carcinogenic hazards of non-regulated disinfection by-products: Haloquinones, halo-cyclopentene and cyclohexene derivatives, N-halamines, halonitriles, and heterocyclic amines. *Toxicology* **286**, 1–19 (2011).
  40. Wang, W. *et al.* Analytical and Toxicity Characterization of Halo-hydroxylbenzoquinones as Stable Halobenzoquinone Disinfection Byproducts in Treated Water. *Anal. Chem.* **86**, 4982–4988 (2014).
  41. Kozari, A., Paloglou, A. & Voutsas, D. Formation potential of emerging disinfection by-products during ozonation and chlorination of sewage effluents. *Sci. Total Environ.* **700**, 134449 (2020).
  42. Zambrano-Monserrate, M. A., Ruano, M. A. & Sanchez-Alcalde, L. Indirect effects of COVID-19 on the environment. *Sci. Total Environ.* **728**, 138813 (2020).
  43. Marecos do Monte, H. & Albuquerque, A. *Wastewater reuse*. (2010).
  44. Z. Alouini & M. Jemli. Destruction of helminth eggs by photosensitized porphyrin. *J. Environ. Monit.* **3**, 548–551 (2001).
  45. Jemli, M., Alouini, Z., Sabbahi, S. & Gueddari, M. Destruction of fecal bacteria in wastewater by three photosensitizers. *J. Environ. Monit.* **4**, 511–516 (2002).
  46. Bonnett, R., Krysteva, M. A., Lalov, I. G. & Artarsky, S. V. Water disinfection using photosensitizers immobilized on chitosan. *Water Res.* **40**, 1269–1275 (2006).
  47. Carvalho, C. M. B. *et al.* Photoinactivation of bacteria in wastewater by porphyrins: Bacterial  $\beta$ -galactosidase activity and leucine-uptake as methods to monitor the process. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **88**, 112–118 (2007).
  48. Bartolomeu, M. *et al.* Photodynamic action against wastewater microorganisms and chemical pollutants: An effective approach with low environmental impact. *Water (Switzerland)* **9**, 630 (2017).
  49. Bartolomeu, M. *et al.* Antimicrobial Photodynamic Approach in the Inactivation of Viruses in Wastewater : Influence of Alternative Adjuvants. (2021).
  50. Almeida, A. *et al.* Phage Therapy and Photodynamic Therapy: Low Environmental Impact Approaches to Inactivate Microorganisms in Fish Farming Plants. *Mar. Drugs* **7**, 268 (2009).
  51. Jori, G. *et al.* Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. *Lasers Surg. Med.* **38**, 468–481 (2006).
  52. Jori, G., Camerin, M., Soncin, M., Guidolin, L. & Coppelotti, O. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Basic Principles . in *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications* (ed. Michael R. Hamblin and

- Giulio Jori) (Royal Society of Chemistry, 2011). doi:10.1039/9781849733083-00001.
53. Alves, E. *et al.* An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. *Future Med. Chem.* **6**, 141–164 (2014).
  54. Tavares, A. *et al.* Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment. *Mar. Drugs* **8**, 91 (2010).
  55. Costa, L. *et al.* Evaluation of resistance development and viability recovery by a non-enveloped virus after repeated cycles of aPDT. *Antiviral Res.* **91**, 278–282 (2011).
  56. Maisch, T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.* **14**, (2015).
  57. Al-Mutairi, R., Tovmasyan, A., Batinic-Haberle, I. & Benov, L. Sublethal Photodynamic Treatment Does Not Lead to Development of Resistance. *Front. Microbiol.* **0**, 1699 (2018).
  58. Carvalho, N. A. de, Stachler, E. N., Cimabue, N. & Bibby, K. Evaluation of Phi6 Persistence and Suitability as an Enveloped Virus Surrogate. *Environ. Sci. Technol.* **51**, 8692–8700 (2017).
  60. Tran, H. N. *et al.* SARS-CoV-2 coronavirus in water and wastewater: A critical review about presence and concern. *Environ. Res.* **193**, 110265 (2021).
  61. Dias, L. D., Blanco, K. C. & Bagnato, V. S. COVID-19: Beyond the virus. The use of photodynamic therapy for the treatment of infections in the respiratory tract. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **31**, 101804 (2020).
  62. Almeida, A., Faustino, M. A. F. & Neves, M. G. P. M. S. Antimicrobial Photodynamic Therapy in the Control of COVID-19. *Antibiot. 2020, Vol. 9, Page 320* **9**, 320 (2020)
  63. Costa, L. *et al.* Sewage bacteriophage photoinactivation by cationic porphyrins: A study of charge effect. *Photochem. Photobiol. Sci.* **7**, 415–422 (2008).
  64. Costa, L. *et al.* Sewage bacteriophage inactivation by cationic porphyrins: Influence of light parameters. *Photochem. Photobiol. Sci.* **9**, 1126–1133 (2010)
  65. RA, F., JE, S. & DP, D. Methylene blue photoinactivation of RNA viruses. *Antiviral Res.* **61**, 141–151 (2004).
  66. Wainwright, M. & McLean, A. Rational design of phenothiazinium derivatives and photoantimicrobial drug discovery. *Dye. Pigment.* **136**, 590–600 (2017).
  67. Faddy, H. M. *et al.* Inactivation of yellow fever virus in plasma after treatment with methylene blue and visible light and in platelet concentrates following treatment with ultraviolet C light. *Transfusion* **59**, 2223–2227 (2019)
  68. Sobsey, M. D., Wallis, C. & Melnick, J. L. Chemical Disinfection of Holding-Tank Sewage. *Appl. Microbiol.* **28**, 861 (1974).
  69. Cooper, A. T. & Goswami, D. Y. Evaluation of Methylene Blue and Rose Bengal for Dye Sensitized Solar Water Treatment. (2002) doi:10.1115/1.1498850.
  70. Ergaieg, K. & Seux, R. A comparative study of the photoinactivation of bacteria by meso-substituted cationic porphyrin, rose Bengal and methylene blue. *Desalination* **246**, 353–362 (2009).
  71. Sabbahi, S., Alouini, Z., Ayed, L. Ben & Jemli, M. Inactivation of faecal bacteria in wastewater by methylene blue and visible light. *New pub Balaban* **20**, 209–219 (2012)
  72. Gerba, C. P., Wallis, C. & Melnick, J. L. APPLICATION OF PHOTODYNAMIC OXIDATION

- TO THE DISINFECTION OF TAPWATER, SEAWATER, AND SEWAGE CONTAMINATED WITH POLIOVIRUS. **26**, 499–504 (1977).
73. Gendrot, M. *et al.* Methylene blue inhibits replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Int. J. Antimicrob. Agents* **56**, 106202 (2020).
  74. Svyatchenko, V. A., Nikonov, S. D., Mayorov, A. P., Gelfond, M. L. & Loktev, V. B. Antiviral photodynamic therapy: Inactivation and inhibition of SARS-CoV-2 in vitro using methylene blue and Radachlorin. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **33**, 102112 (2021)
  75. Ayala, F. *et al.* 5-Aminolaevulinic acid and photodynamic therapy reduce HSV-1 replication in HaCat cells through an apoptosis-independent mechanism. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **24**, 237–243 (2008).
  76. Costa, L. *et al.* Evaluation of resistance development and viability recovery by a non-enveloped virus after repeated cycles of aPDT. *Antiviral Res.* **91**, 278–282 (2011).
  77. Ke, M.-R. *et al.* Oligolysine-Conjugated Zinc(II) Phthalocyanines as Efficient Photosensitizers for Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Chem. – An Asian J.* **9**, 1868–1875 (2014).
  78. Wu, J. *et al.* Virucidal efficacy of treatment with photodynamically activated curcumin on murine norovirus bio-accumulated in oysters. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **12**, 385–392 (2015).
  79. Korneev, D., Kurskaya, O., Sharshov, K., Eastwood, J. & Strakhovskaya, M. Ultrastructural Aspects of Photodynamic Inactivation of Highly Pathogenic Avian H5N8 Influenza Virus. *Viruses 2019, Vol. 11, Page 955* **11**, 955 (2019).
  80. Ye, Y., Chang, P. H., Hartert, J. & Wigginton, K. R. Reactivity of Enveloped Virus Genome, Proteins, and Lipids with Free Chlorine and UV254. *Environ. Sci. Technol.* **52**, 7698–7708 (2018).
  81. Costa, L., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. P. M. S., Cunha, Â. & Almeida, A. Photodynamic inactivation of mammalian viruses and bacteriophages. *Viruses* **4**, 1034–1074 (2012).

**Capítulo III. *“Avaliação do impacto da emissão de água tratada por aPDT nos organismos presentes nas águas recetoras”***

## Resumo

Avaliar a toxicidade gerada por um composto ou por um tipo de tratamento de desinfecção de águas residuais é de extrema importância, pois a maioria destes compostos ou resultados desses tratamentos acabam por chegar ao meio ambiente podendo provocar danos irreversíveis. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da solução gerada após o tratamento fotodinâmico com o azul de metileno (AM). Para estes ensaios utilizou-se o microcrustáceo *Daphnia magna* e a metodologia aplicada foi o protocolo da OCDE 202 para ensaios de toxicidade aguda, onde dafnídeos foram expostos, por um período de 48 horas, à água residual e ao AM a uma concentração de 10 µM (previamente irradiado). Paralelamente foram realizados ensaios a fim de comparar a toxicidade do AM com outros fotossensibilizadores (PS), porfirina tetracatiónica e ftalocianina.

Os resultados mostraram que em água residual a taxa de sobrevivência das dáfrias foi de 100%, não apresentando toxicidade ao fim de 48 horas de exposição. Em relação aos testes com o AM irradiado, a taxa de sobrevivência foi de 20% após 48 horas de exposição. No entanto, quando comparado com os outros PS, o AM apresentou menor toxicidade, com a taxa de sobrevivência das dáfrias a situar-se nos 0% quando expostas à porfirina tetracatiónica e à ftalocianina. Sem a irradiação, ambos os PS foram tóxicos.

Os resultados obtidos nos PS irradiados indicaram uma toxicidade do AM, mas essa toxicidade foi mais evidente com os outros PS usados. No entanto estes testes foram realizados não tendo em conta o fator diluição ao qual a água residual tratada é sujeita no momento em que é libertada para o meio ambiente, sugerindo que a toxicidade pode ser mais baixa com o AM quando este for diluído. No entanto, mais estudos serão necessários de forma a se encontrar um método de tratamento de desinfecção mais amigável ao ambiente.

## Abstract

Evaluating the toxicity generated by a compound or by a type of disinfection treatment is extremely important because most of these compounds or results of these treatments eventually reach the environment and may cause irreversible damage. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of the solution generated, after the photodynamic treatment with the methylene blue (MB). In these assays, we used the microcrustacean *Daphnia magna* and the methodology applied was described in the OECD 202 protocol for acute toxicity assays, where daphnids were exposed, for a period of 48 hours, to wastewater and to MB at a concentration of 10 µM (previously irradiated). In parallel, assays were carried out to compare the toxicity of MB with other photosensitizers (PS), tetracationic porphyrin and phthalocyanine.

The results show that in wastewater the *Daphnia* survival rate was 100%, showing no toxicity after 48 hours of exposure. Concerning the irradiated MB tests, the survival rate was 20% after 48 hours of exposure. However, when compared with the other PS, the MB showed less toxicity, with the *Daphnia* survival rate being 0% when exposed to tetracationic porphyrin and phthalocyanine. Without irradiation, both PS were toxic.

The results obtained from the irradiated PS indicated toxicity of the MB, but this toxicity was more evident with the other PS used. However, these tests were performed without taking into account the dilution factor occurring when the treated wastewater is released into the environment, suggesting that toxicity may be lower for MB when it is diluted.

However, further studies will be necessary to find a more environmentally friendly disinfection treatment method.



## **1) INTRODUÇÃO**

A grande maioria das águas residuais produzidas não são reaproveitadas, com o seu retorno ao meio natural tido como a solução mais prática. Este retorno pode ser feito através da infiltração no solo ou através da sua descarga em águas superficiais, rios e oceanos<sup>1</sup>.

Quando o efluente tratado é descarregado num meio sensível, é de elevada importância garantir que este efluente tratado tenha um impacto mínimo no ecossistema onde este é libertado. No caso do uso do tratamento fotodinâmico antimicrobiano como alternativa para desinfetar águas residuais, é necessário assegurar que o fotossensibilizador usado não afeta os organismos do meio recetor.

A fim de evitar a libertação do fotossensibilizador para o ambiente, bem como reaproveitá-lo, este pode ser imobilizado<sup>3</sup>. No entanto, é necessário avaliar se o fotossensibilizador ou produtos resultantes da sua degradação, mesmo quando suportados, não sejam libertados para o meio recetor. Para tal, é importante avaliar o impacto do efluente tratado nos organismos existentes no meio recetor.

### **1.1) ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS**

A ecotoxicidade refere-se ao potencial de uma substância em causar efeitos nocivos aos organismos e depende das propriedades químicas da substância, da sua concentração e do tempo de exposição ao agente tóxico<sup>4</sup>.

A fim de detetar possíveis efeitos provocados por uma determinada substância, são realizados testes de toxicidade sob condições controladas em laboratório e, para isso, são usados organismos que possuem uma baixa tolerância a diversos compostos químicos. Estes organismos quando expostos a diferentes concentrações dos compostos sofrem alterações ao nível morfológico, fisiológico e comportamental, que podem ser observadas e quantificadas<sup>4,5</sup>.

Os testes de toxicidade podem ser agudos ou crónicos. Os testes de toxicidade aguda são os que avaliam respostas rápidas, letais, com exposições a concentrações consideradas

elevadas. Nestes testes, os compostos tóxicos produzem efeitos a curto prazo, nomeadamente num intervalo de tempo de 0 a 96 horas<sup>5</sup>. O objetivo do teste é determinar a concentração de um composto tóxico com capacidade de produzir um efeito específico no organismo utilizado, geralmente letalidade, mas em alguns casos, a imobilidade que é uma manifestação que antecede a essa letalidade<sup>6</sup>. Através dos testes de toxicidade aguda pode-se calcular (por métodos estatísticos) a concentração efetiva - EC<sub>50</sub>, ou seja, a concentração na qual o composto tóxico é capaz de causar imobilização/mortalidade a 50% dos organismos, após um determinado tempo de exposição<sup>4,6</sup>

Já os testes de toxicidade crónica são usados para avaliar as respostas dos organismos, a nível de funções biológicas, nomeadamente, o desenvolvimento, o crescimento, a maturação e a reprodução. Para estes testes, o tempo de exposição é maior, podendo atingir todo o ciclo de vida do organismo, e são usadas concentrações subletais do composto a ser testado<sup>4,5</sup>

Em ecotoxicologia aquática, *Daphnia magna* é um dos organismos-modelo mais utilizados e recomendados para este tipo de ensaio<sup>7,8</sup>. O género *Daphnia* pertencente à Ordem Cladocera, um grupo de organismos comumente encontrados em ecossistemas (lagos e albufeiras), têm dimensões reduzidas (com os adultos a variarem entre 1 a 5 mm), e a sua alimentação é por filtração não seletiva, com uma dieta diversificada, com captura do alimento que se encontra suspenso na coluna de água (como microalgas e bactérias)<sup>9</sup>.

*Daphnia magna* apresenta características favoráveis para a realização de bioensaios ecotoxicológicos, nomeadamente:

- Possui uma elevada taxa de fecundidade, um ciclo de vida curto e suas dimensões reduzidas permitem o manuseamento e manutenção de culturas laboratoriais<sup>10</sup>;
- Elevada sensibilidade a diversos fatores de stress e às substâncias tóxicas<sup>10</sup>;
- Reprodução por partenogénese, o que resulta em ninhadas geneticamente idênticas à progenitora, denominados (clones). Esta característica possibilita a comparação de estudos feitos entre laboratórios<sup>10</sup>, bem como a diminuição da variabilidade entre os ensaios, o que aumenta a reprodutibilidade e a robustez dos resultados obtidos<sup>11</sup>.

O presente estudo tem como objetivo avaliar a possibilidade de efeitos ecotoxicológicos provocados pelo efluente, após a sua desinfecção por tratamento fotodinâmico. Para tal foram realizados ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia magna*. Para os ensaios cumpriram-se normas estabelecidas pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE), nomeadamente a norma 202, onde é avaliada a imobilização dos organismos expostos durante 48 h. A primeira abordagem consistiu em testar a toxicidade da água residual nas dáfnias. De seguida fizeram-se ensaios de toxicidade do azul de metileno a uma concentração de 10 µM, que apesar de superior à concentração usada nos ensaios de inativação fotodinâmica, foi a opção tomada por uma questão de robustez de resultados.

## **2) MATERIAL E MÉTODOS**

Neste estudo foram utilizadas *Daphnia magna* (clone K6) provenientes de culturas saudáveis, mantidas em condições laboratoriais apropriadas (meio, luz, alimento, temperatura, número de animais por cultura)<sup>8</sup> no Laboratório de Ecologia Aplicada e Ecotoxicologia (applEE), no Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM). As dáfnias foram cultivadas em meio ASTM, enriquecido com vitaminas e aditivo orgânico, essenciais na manutenção das culturas, e foram também mantidas a uma temperatura controlada de 20 ± 2 °C, e fotoperíodo de 16 horas à luz e 8 horas escuro<sup>8</sup>. O meio foi trocado três vezes por semana, e a cada 2 dias os dafnídeos em cultura foram alimentados com a alga verde *Raphidocelis subcapitata* na concentração de 3 × 10<sup>5</sup> células/mL. Para a realização dos testes utilizaram-se neonatos da terceira à quinta ninhada.

### **2.1) AMOSTRA DE ÁGUAS RESIDUAIS**

As amostras de águas residuais secundariamente tratada, utilizadas neste estudo foram recolhidas numa estação de tratamento de águas residuais do Distrito de Aveiro. Esta amostras foram colhidas de manhã, no dia 16 de dezembro de 2020 e representavam

um acúmulo de efluente de um período de 24 h (amostras compostas). No transporte das amostras e no laboratório estas foram protegidas da luz e refrigeradas a 4 °C até ao seu posterior uso.

## **2.2) FOTOSSENSIBILIZADORES**

Uma solução stock, do fotossensibilizador azul de metileno foi preparada a 500 µM em solução tampão fosfato (PBS) e posteriormente armazenada no escuro. A a porfirina e a ftalocianina, cujas soluções stock foram preparadas à mesma concentração (500 µM), mas em DMSO. Todas estas soluções foram sempre sonicadas por 30 minutos à temperatura ambiente (banho ultrassónico, Nahita 0,6 L, 40 kHz).

## **2.3) CONDIÇÕES DE IRRADIAÇÃO**

As amostras de fotossensibilizadores preparadas à concentração de 5 µM em meio de cultura das dáfnias, foram sujeitas a irradiação solar durante 3 h (intervalo horário das 13h31 e as 16h30, do dia 6 de junho de 2021). Durante este período a irradiância solar e o índice UV foram acompanhados através da página web Current Weather in Aveiro, do Grupo de Meteorologia e Climatologia da Universidade de Aveiro, tendo a irradiância solar variado entre 75,0 e 95,0 mW cm<sup>-2</sup>, e o índice de UV variado entre 3,5 e 6.

## **2.4) ENSAIOS DE TOXICIDADE**

### **2.4.1) Ensaios de toxicidade aguda em água residual – teste de imobilização de *Daphnia magna***

Os ensaios de toxicidade aguda foram realizados conforme descrito no protocolo padronizado de OECD 202 (OCDE 2004)<sup>12</sup>, onde neonatos com menos de 24 horas de idade foram expostos à água residual, tratada secundariamente, recolhida numa ETAR em Aveiro, Portugal. Nos ensaios foram usadas 4 réplicas por tratamento (amostra e controlo negativo), com 5 neonatos por réplica, expostos a 10 mL de água residual, em tubos de

ensaio com capacidade volumétrica de 50 mL. O controlo negativo correspondia ao mesmo número de neonatos no mesmo volume de ASTM (10 mL).

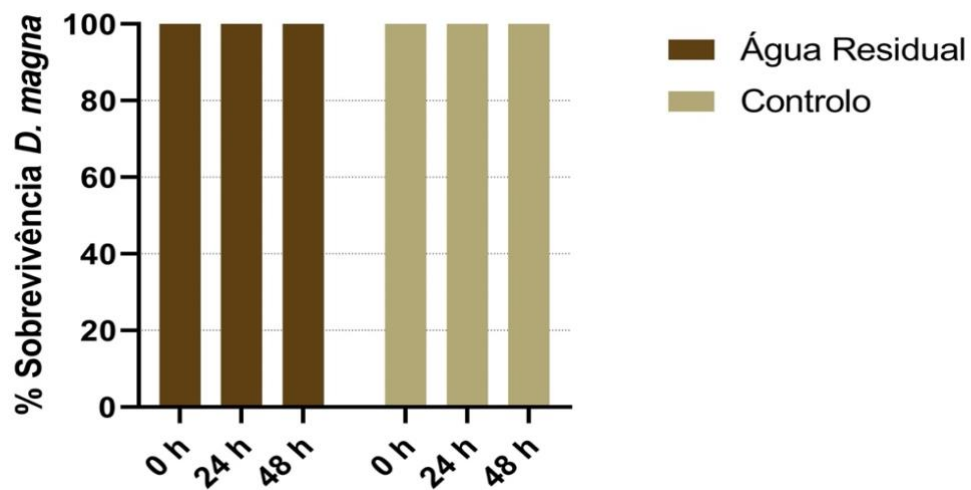
#### **2.4.2) Ensaios de toxicidade aguda com azul de metileno – teste de imobilização com *Daphnia magna***

Os ensaios de toxicidade aguda – imobilização foram realizados conforme descrito no protocolo padronizado de OCDE 202 (OCDE 2004), em que neonatos com idade inferior a 24 h foram expostos ao azul de metileno (irradiado e não irradiado) à concentração de 10  $\mu$ M. O ensaio foi realizado em tubos de ensaio com um volume total de amostra de 10 mL, tendo sido realizadas três réplicas, com cinco neonatos por réplica, para cada tratamento e controlos. Após 24 e 48 h de exposição foi contabilizado o número de dafniídeos imobilizados. Para isso fez-se uma ligeira agitação dos tubos de ensaios utilizados no teste e observou-se se os organismos apresentavam movimentos de natação. Para efeito de comparação de toxicidade aguda, entre os diferentes tipos de fotossensibilizadores utilizados nos protocolos de terapia fotodinâmica, foram feitos ensaios em conjunto com o azul de metileno, seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente. Os fotossensibilizadores (irradiados e não irradiados) usados foram, a Porfirina tetra catiónica - Tetra-Py(+)-Me e a Ftalocianina - ZnPcF8(Pyr-N4)8(Me)8.I-. Neste desenho experimental utilizaram-se dois controlos: um controlo negativo, com o mesmo número de neonatos no mesmo volume de ASTM (10 mL) mencionadas nos ensaios anteriores e o segundo correspondia ao controlo solvente com DMSO a 2% (% de DMSO nas amostras em que a toxicidade da porfirina e da ftalocianina foram testadas) em 10 mL de ASTM, com o mesmo número de neonatos.

### 3) Resultados

#### 3.1) Ensaio de toxicidade aguda em água residual

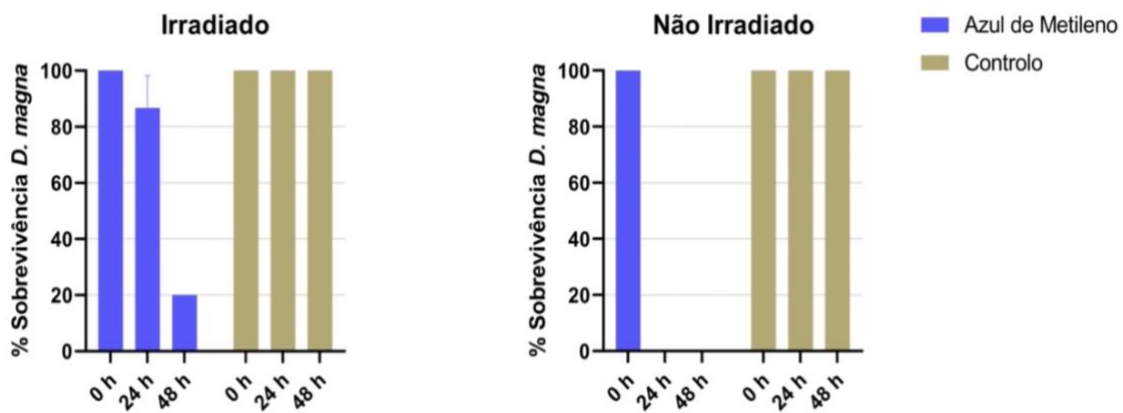
Os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade em água residual estão apresentados na Figura 9. Estes resultados mostram que, após 48 horas de exposição dos neonatos à água residual não houve registro de imobilização dos organismos, permanecendo a sobrevivência de 100%, o que indica que a água residual por si só não foi tóxica para os neonatos.



**Figura 9.** Sobrevivência de *Daphnia magna* exposta, durante 48h, a água residual tratada secundariamente. Os dados são apresentados em percentagem total.

### 3.2) Ensaio de toxicidade aguda com o azul de metileno

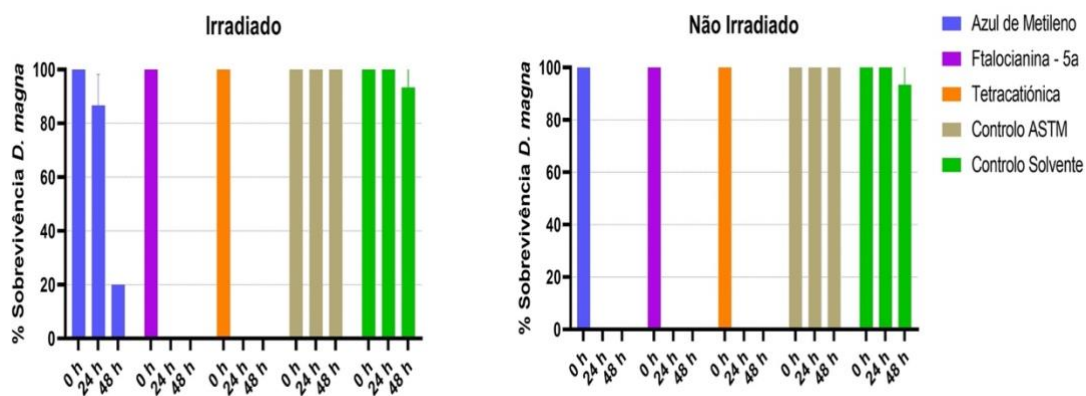
Na Figura 10 são apresentados os resultados obtidos no ensaio de toxicidade aguda usando o azul de metileno irradiado e não irradiado. Os resultados mostram que a percentagem de neonatos sobreviventes foi cerca de 87%, após 24 h de exposição ao azul de metileno irradiado, e cerca de 20% após 48 h de exposição. Já os resultados com o azul de metileno não irradiado mostram que não houve sobreviventes logo às 24 h de exposição. Ao comparar os resultados, nota-se que o azul de metileno quando irradiado é menos tóxico para as dáfias, do que o mesmo não irradiado.



**Figura 10.** Sobrevivência de *Daphnia magna* exposta, durante 48 h, ao azul de metileno irradiado e não irradiado. Os dados são apresentados em percentagem média.

### 3.3) Ensaio de toxicidade aguda, para efeitos de comparação entre fotossensibilizadores

A Figura 11 mostra os resultados dos ensaios com os outros dois fotossensibilizadores usados no tratamento por terapia fotodinâmica. Os resultados mostram que o PS tetra catiónico e a ftalocianina foram tóxicos para as dáfrias, com uma percentagem de mortalidade de 100%, independentemente da sua irradiação ser efetuada. Quando comparados, nota-se que o azul de metileno é menos tóxico do que os outros fotossensibilizadores para as dáfrias.



**Figura 11:** Sobrevivência de *Daphnia magna* exposta, durante 48 h, aos fotossensibilizadores azul de metileno, porfirina tetracatiónica e ftalocianina.



## DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliada a toxicidade da água residual e do azul de metileno numa espécie aquática, *Daphnia magna*, reconhecida como espécie modelo em avaliações ecotoxicológicas.

Os testes de toxicidade aguda envolvem uma avaliação dos efeitos tóxicos de uma única dose de um produto químico ou, em alguns casos, os efeitos de doses múltiplas administradas em 24 e/ou 48 h<sup>13</sup>, nos quais avaliações comportamentais como a mobilidade das dáfrias contribuem para a compreensão da toxicidade de um determinado composto<sup>14</sup>. Muitas substâncias podem afetar a mobilidade de *Daphnia*, levando à sua morte, e por isso este importante parâmetro deve ser tido em conta nos ensaios ecotoxicológicos<sup>15</sup>. Na literatura, há vários estudos que descrevem alterações na mobilidade das dáfrias após estas serem expostas a concentrações subletais de metais<sup>16</sup>, fármacos<sup>17</sup>, inseticidas organofosforados<sup>15</sup>, nanopartículas de óxido zinco<sup>17</sup>, corantes usados na indústria têxtil<sup>19,20</sup>, entre outros.

Os ensaios de toxicidade aguda deste estudo revelaram resultados satisfatórios. A toxicidade em efluentes tratados secundariamente foi testada, mostrando uma taxa de sobrevivência de 100% após 24 h. Ao comparar os resultados de 24 h com as 48 h, não houve registo de organismos imóveis na amostra e nos controlos, com a sobrevivência mantendo-se nos 100%, permanecendo o teste válido, o que indica que a água residual não é tóxica para as dáfrias. Nos controlos também houve uma taxa de sobrevivência de 100%, não excedendo a 10% da mortalidade e imobilidade, mantendo-se válido o teste de toxicidade, de acordo com o estabelecido pelo protocolo normativo OCDE 202.

Os resultados do presente estudo estão de acordo com um outro estudo, realizado por Serra (*Serra 2019*), onde foi avaliado o potencial do crustáceo *Daphnia magna* como bioindicador de toxicidade para águas residuais domésticas desinfetadas com ácido peracético. Nesse estudo, foram realizados ensaios de toxicidade da água residual tratada secundariamente. Os resultados mostraram que a exposição dos organismos ao efluente secundário sem desinfecção não resultou em mortalidade ou imobilidade nos organismos testados, mostrando, aparentemente, ausência de toxicidade do efluente para a *D. magna*.

Nesse estudo a toxicidade foi avaliada de acordo com o procedimento padrão 6341 (ISO 6341:2012)<sup>21</sup>, na qual utilizaram kit *Daphkit*<sup>®</sup>, desenvolvido por um laboratório na Bélgica. Contudo, apesar de terem usado um método, e um efluente secundário diferente do presente estudo, os resultados mostraram também uma taxa de sobrevivência das dáfrias de 100% em água residual<sup>22</sup>.

Relativamente à toxicidade do azul de metileno Kurşun *et al.*, (Kurşun, G. *et al.* 2019), avaliaram a toxicidade aguda da água residual tingida com azul de metileno usando *Daphnia magna*. A metodologia usada foi o protocolo da OCDE 202, na qual a imobilidade da *Daphnia magna* foi calculada para determinar a EC<sub>50</sub>. A fonte de luz foi uma lâmpada de xénon e a intensidade da luz pode ser ajustada de 250 a 765 W/m<sup>2</sup>. Os resultados mostraram que o azul de metileno foi tóxico para as dáfrias a uma concentração de 10 µM. A taxa de imobilidade foi de 100% em concentrações acima dos 10 µM azul de metileno. Por sua vez, os autores usaram fotocatalisadores para degradar o azul de metileno, e os resultados revelaram uma diminuição da taxa de imobilidade, em 50%, nas concentrações mais elevadas de azul de metileno<sup>23</sup>. Estes resultados estão de acordo com o presente estudo, no qual o azul de metileno a uma concentração de 10 µM também mostrou ser tóxico para *Daphnia magna*, mesmo tendo sido usadas diferentes fontes e intensidades de luz.

No entanto, alguns fatores podem diminuir a toxicidade do azul de metileno, um bom exemplo é o uso de catalisadores, como mostrado no estudo de (Kurşun, G. *et al.* 2019) no qual usaram um revestimento à base de titanato de potássio e lantânio para degradar azul de metileno, e com isso notou-se uma diminuição da toxicidade nas dáfrias<sup>23</sup>.

Çifçi D.I. (2016) avaliou a degradação do azul de metileno através do método ISO 6341 (1996)<sup>21</sup>, usando catalisadores à base de titânio e prata, sob radiação UV, e testou a toxicidade do azul de metileno degradado em *Daphnia magna*. Verificou que não houve toxicidade do azul de metileno quando degradado, com a taxa de imobilidade das dáfrias não sendo significativa<sup>20</sup>.

No presente estudo foram realizados testes de toxicidade aguda em *Daphnia magna*, para efeito de comparação, entre o azul de metileno e as diferentes classes de

fotossensibilizadores utilizados na terapia fotodinâmica, como as ftalocianinas (*Ftc*), e as porfirinas. Os nossos resultados mostraram que quando irradiados, e após 24 h de exposição nas dáfias, a *Ftc 5a*, e a uma porfirina tetracatiónica, exibiram uma maior toxicidade em relação ao azul de metileno, com uma taxa de sobrevivência nos 0% para a *Ftc* e porfirina, e uma taxa em cerca de 87% para o azul de metileno. Já os testes de toxicidade no escuro resultaram uma taxa de mortalidade de 100% nas dáfias em ambos os fotossensibilizadores. Nos controlos não houve registro de imobilização das dáfias, permanecendo a sobrevivência nos 100%, o que valida o teste de acordo com a OCDE, 202.

*Jančula et. al. (2008)* testaram a toxicidade de vários tipos de *Ftc* em *Daphnia Magna* usando o método ISO 6341 (1996)<sup>21</sup>. As concentrações de *Ftc* aplicadas no teste foram, 50, 10, 1, 0,1, e 0,01 mg/L, com quatro réplicas para cada concentração e controlo, a intensidade da luz usada foi de  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (1200 lux). Os resultados dos testes revelaram diferentes níveis de toxicidade entre as *Ftc*, com alguns destes composto exibindo efeito tóxicos mesmo em concentrações baixas, com os autores sugerindo que a intensidade de luz influenciava a toxicidade. No entanto, ao testarem com uma menor intensidade de luz, estas *Ftc* continuaram a exibir toxicidade, sugerindo que a toxicidade era causada pelas próprias moléculas de *Ftc* ou pela diferença de ligação das *Ftc* às membranas celulares<sup>24</sup>.

Outros estudos anteriormente publicados, como o de *Merchat et al., 1996*, sugerem que, a diferença existente na absorção ou ligação da molécula à célula, tem um papel mais importante na eficiência de diferentes tipos de *Ftc*, em vez da diferença na produção de oxigénio singleto<sup>25</sup>. *Dra'bkova'et al. (2006)*, mostraram que a taxa de produção de oxigénio singleto não estava correlacionado com o nível de toxicidade das *Ftc* em diferentes tipos de microrganismos altamente sensíveis a estes compostos químicos<sup>26</sup>.

Em resumo os autores concluíram que, o oxigénio singleto produzido pelas *Ftc*, iluminadas por uma luz adequada, é suposto ser o principal agente que causa a mortalidade, mas, por possuir um tempo de vida curto, este não pode ser transportado por longa distância. Portanto, apenas uma ligação eficiente das moléculas de *Ftc* às células poderia proporcionar danos efetivos. Os autores observaram que algumas *Ftc* com substituintes heterocíclicos apresentava uma toxicidade mais elevada, sugerindo que esta

poderia ser causado por uma ligação mais forte das moléculas às células, devido à presença de um heterociclo carregado positivamente. No entanto, são necessários estudos para provar esta teoria. É de salientar que nestes mesmo estudos os autores relatam que em alguns testes notaram uma mortalidade significativa dos dafnídeos expostos a Ftc no escuro<sup>24</sup>.

Em relação às porfirinas, *Fabris et. al. 2011* testaram, através do protocolo *Daphkit*<sup>®</sup>, a toxicidade aguda de uma porfirina tetracatiónica em dáfrias. Os resultados mostraram que, após 1 hora de incubação no escuro com a porfirina, as dáfrias apresentaram uma elevada taxa de imobilização às 48h, em concentrações que variaram entre 1 a 10  $\mu\text{M}$ . Os autores avaliaram também a fototoxicidade da porfirina e observaram que, após 1 h de irradiação com luz visível, a porfirina tetracatiónica a uma concentração de 0,3  $\mu\text{M}$  foi suficiente para causar imobilização em 50% das dáfrias, após 48 h de exposição<sup>27</sup>.

*D'Ambrosio et. al. 2020*, testaram com base em protocolos padronizados<sup>28,29</sup> a toxicidade de pigmentos semelhantes a porfirina diluídos a 10, 50 e 100%, em dáfrias. Os resultados mostraram que, após o tratamento inicial de 1 hora de exposição ao pigmentos na luz e no escuro, as taxas de imobilização aumentavam à medida que a concentração e o tempo total de exposição aumentavam. Após 24 e 48 horas de exposição os autores notaram uma redução nos efeitos fotodinâmicos das porfirinas e sugeriram que, as causas para esta redução se devem ao curto tempo de vida do oxigénio singleto e à degradação das porfirinas. No entanto a toxicidade no escuro foi quase sempre mais expressiva em concentrações mais elevadas dos compostos seja em 24 ou 48 h. Apesar da toxicidade no escuro para compostos porfirínicos não estar bem compreendida, os resultados sugerem efeitos significativos em dáfrias<sup>30</sup>

Todos os resultados mencionados anteriormente sobre a toxicidade dos fotossensibilizadores, estão em acordo com o presente estudo. Contudo, não se pode desvalorizar o uso da terapia fotodinâmica e dos respetivos fotossensibilizadores na desinfeção de águas residuais, visto que já está provada a eficácia deste tratamento para a inativação de diferentes microrganismos. No entanto, para diminuir a toxicidade dos

compostos, pode-se ajustar as concentrações dos fotossensibilizadores, como também usar fotocatalisadores, como mencionado em alguns estudos. Embora tenha sido observada toxicidade aguda nas dáfias com o azul de metileno a 10  $\mu\text{M}$  (irradiado), quando as águas residuais são descarregadas no ambiente aquático, nomeadamente no oceano, sofrem uma diluição elevada, o que reduz o impacto da descarga. São necessários mais estudos de toxicidade usando o efluente diluído para avaliar a segurança do tratamento fotodinâmico no tratamento de águas residuais.

## CONCLUSÃO

Os ensaios de toxicidade aguda realizados com *D. magna* e o efluente secundário desinfetado com azul de metileno permitiu obter as seguintes conclusões:

- O efluente secundário da ETAR antes da desinfecção, não exibiu efeitos tóxicos na *D. magna*, sugerindo que não havia substâncias químicas em concentrações que provocassem toxicidade nas dáfias;
- A concentração de 10  $\mu\text{M}$  do azul de metileno avaliada no presente estudo foi tóxica para *D. magna*. Este resultado é corroborado por estudos de toxicidade em *D. magna* relatados na literatura.
- Quando comparadas, a toxicidade das diferentes classes de fotossensibilizadores, nota-se que o azul de metileno foi menos tóxico ao longo das 48 h de ensaio. No entanto, a toxicodinâmica dos fotossensibilizadores é complexa e não é muito bem compreendida. Apesar disso, os resultados do presente estudo e dos estudos anteriormente publicados, sugerem que: a toxicidade depende do fotossensibilizador a ser utilizado e conseqüentemente da sua estrutura molecular; da concentração do fotossensibilizar; a presença ou ausência da luz são fatores significativos, isto porque a maior taxa de imobilização das dáfias foi no escuro,

para todos os fotossensibilizadores. Estes resultados são relevantes para futuras pesquisas no âmbito do tratamento de água residual por aPDT, uma vez que a toxicidade ao escuro pode causar efeitos significativos durante o tratamento, após o esgotamento da capacidade fotodinâmica efetiva dos fotossensibilizadores.

Salienta-se que há poucos estudos que abordam o tema da toxicidade – águas residuais – fotossensibilizadores – em dáfnias ou outros organismos.

### **PERSPETIVA FUTURAS**

Após termos bons resultados em relação ao azul de metileno, seria relevante:

- Avaliar, a toxicidade aguda nas dáfnias a azul de metileno a 10  $\mu\text{M}$ , mas desta vez tendo em conta o fator diluição, 1:10; 1:100 e 1:1000 da solução, uma vez que, o efluente ao ser descarregado no oceano é diluído, e o fator de diluição é relativamente maior do que as diluições a serem testadas;
- Avaliar, em concentrações mais baixas (1 e 5  $\mu\text{M}$ ), a toxicidade do azul de metileno em dáfnias;
- Avaliar a toxicidade do azul de metileno em outros organismos, quer do meio dulçiquícola quer do meio marinho, bem como avaliar a toxicidade do efluente tratado por aPDT com o azul de metileno nesses organismos.

## Referências

- 1 Marecos do Monte, H. & Albuquerque, A. *Wastewater reuse*. (2010).
- 2 Águas do Centro Litoral: Sistema Multimunicipal de Abastecimento de Água e de Saneamento do Centro Litoral de Portugal, <https://www.aguasdocentrolitoral.pt/ilhavo/?cn-reloaded=1> ,
- 3 Almeida, A. *et al.* Phage Therapy and Photodynamic Therapy: Low Environmental Impact Approaches to Inactivate Microorganisms in Fish Farming Plants. *Mar. Drugs* **7**, 268 (2009).
- 4 Magalhães, D.D.P. & Ferrão, S., 2008. A Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Australis*, **12**(3), pp.355–381.
- 5 Costa, C.R. *et al.*, 2008. A Toxicidade em Ambientes Aquáticos: Discussão e Métodos de Avaliação. *Quimica Nova*, **31**(7), pp.1820–1830.
- 6 ASTM, 2007. Standard guide for conducting acute toxicity tests on test materials with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. ASTM International, Designation (Reapproved), pp.1–22.
- 7 ASTM. *Standard guide for conducting Daphnia magna life-cycle toxicity tests*. In *Report E 1193–97 (Philadelphia: American Society for Testing and Materials)*. (2012).
- 8 OECD. Test Guideline No. 211 Daphnia magna reproduction test Section 2 Effects on Biotic Systems OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. (2012).
- 9 Ebert, D. *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia [Internet]*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books>. (2005).
- 10 Lampert, W. Daphnia: Model herbivore, predator and prey. *Polish J. Ecol.* **54**, 607–620 (2006).
- 11 Barata, C., Baird, D. J., Miñarro, A. & Soares, A. M. V. . Do genotype responses always converge from lethal to nonlethal toxicant exposure levels? Hypothesis tested using clones of *Daphnia magna* straus. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**, 2314–2322 (2000).
- 12 Organisation for Economic Co-operation and Development. 2004. Test No. 202: *Daphnia sp.*, acute immobilization test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris, France.
- 13 Seibert, H., Balls, M., Fentem, J.H., Bianchi, V., Clothier, R.H., Dierickx, P.J., Ekwall, B., Garle, M.J., Gomez-Lechon, M.J., Gribaldo, L., Gülden, M., Liebsch, M., Rasmusen, E., Roguet, R., Shrivastava, R., Walum, E.: Acute toxicity testing in vitro and the classification and labelling of chemicals. *ATLA*. **24**, 499–510 (1996)
- 14 Ziarek, J.J. *et al.*, 2011. Seasonal adaptations of *Daphnia pulex* swimming behaviour: the effect of water temperature. *Hydrobiologia*, **661**(1), pp.317–327.
- 15 Duquesne, S. & Küster, E., 2010. Biochemical, metabolic, and behavioural responses and recovery of *Daphnia magna* after exposure to an organophosphate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **73**(3), pp.353–359.

- 16 Wolf, G., Scheunders, P. & Selens, M., 1998. Evaluation of the swimming activity of *Daphnia magna* by image analysis after administration of sublethal Cadmium concentrations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 120(1), pp.99–105.
- 17 Goto, T. & Hiromi, J., 2003. Toxicity of 17  $\alpha$ -ethynylestradiol and norethindrone, constituents of an oral contraceptive pill to the swimming and reproduction of cladoceran *Daphnia magna*, with special reference to their synergetic effect. *Marine Pollution Bulletin*, 47(1–6), pp.139–142.
- 18 Azevedo, S.L., Ribeiro, F., Jurkschat, K., Soares, A.M. and Loureiro, S. (2016), Co-exposure of ZnO nanoparticles and UV radiation to *Daphnia magna* and *Danio rerio*: Combined effects rather than protection. *Environ Toxicol Chem*, 35: 458-467. <https://doi.org/10.1002/etc.3208>
- 19 Immich, A.P.S., Souza, A.A.U., Souza, S.M.A.G.U.: (2009) Removal of Remazol blue RR dye from aqueous solutions with neem leaves and evaluation of their acute toxicity with *Daphnia magna*. *J. Hazard. Mater.* 164, 1580–1585
- 20 Çifçi D.I. (2016), Decolorization of methylene blue and methyl orange with Ag doped TiO<sub>2</sub> under UV-A and UV-Visible conditions: process optimization by response surface method and toxicity evaluation, *Global NEST Journal*, 18(2), 371-380.
- 21 ISO 6341 Method (1996) International Organization for Standardization, Water Quality: Determination of the Inhibition of the Mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute Toxicity
- 22 Serra, (2019). Assessment of *Daphnia magna* as a toxicity bioindicator for wastewaters. *Dissertação de Mestrado*, consultado em Setembro de 2021. <http://hdl.handle.net/10362/91159>
- 23 Kurşun, G., Pala, A., Canpolat, Ö. et al. (2019). Evaluation of K<sub>2</sub>La<sub>2</sub>Ti<sub>3</sub>O<sub>10</sub>-based coatings for *Daphnia magna* acute toxicity test of methylene blue degradation in water. *J Aust Ceram Soc* 55, 289–296 <https://doi.org/10.1007/s41779-018-0234-z>
- 24 Jančula, D., Drábková, M., Černý, J., Karásková, M., Kořínková, R., Rakušan, J. e Maršálek, B. (2008), Algicidal activity of fthalocyanines — Screening of 31 components. *Environ. Toxicol.*, 23: 218-223. <https://doi.org/10.1002/tox.20324>
- 25 Merchat M, Bertolini G, Giacomini P, Villanueva A, Jori G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. *J Photochem Photobiol B.* 1996 Feb;32(3):153-7. doi: 10.1016/1011-1344(95)07147-4
- 26 Drábková, M., Maršálek, B. e Admiraal, W. (2007), Photodynamic therapy against cyanobacteria. *Environ. Toxicol.*, 22: 112-115. <https://doi.org/10.1002/tox.20240>.
- 27 Fabris C, Soncin M, Jori G, Habluetzel A, Lucantoni L, Sawadogo S, Guidolin L, Coppellotti O. Effects of a new photoactivatable cationic porphyrin on ciliated protozoa and branchiopod crustaceans, potential components of freshwater ecosystems polluted by pathogenic agents and their vectors. *Photochem Photobiol Sci.* 2012 Feb;11(2):294-301. doi: 10.1039/c1pp05154g.



- 28 Adema, D.M.M. *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. *Hydrobiologia* **1978**, *59*, 125–134
- 29 USEPA. Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.1010: Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids; U.S. Environmental Protection Agency: Washington, DC, USA, 2016.
- 30 D’Ambrosio, M.; Santos, A.C.; Alejo-Armijo, A.; Parola, A.J.; Costa, P.M. Light-Mediated Toxicity of Porphyrin-Like Pigments from a Marine Polychaeta. *Mar. Drugs* 2020, *18*, 302. <https://doi.org/10.3390/md18060302>