

Camila Daminelli Schissi

**INATIVAÇÃO DE PATÓGENOS ENTÉRICOS EM DIGESTATO  
SUINÍCOLA UTILIZANDO ADENOVÍRUS HUMANO COMO  
MODELO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Célia Regina Monte Barardi e co-orientação da MSc. Gislaine Fongaro.

Florianópolis  
2015

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

Schissi, Camila Daminelli

Inativação de patógenos entéricos em digestato suinícola utilizando Adenovírus humano como modelo / Camila Daminelli Schissi; orientadora, Célia Regina Monte Barardi; coorientadora, Gislaine Fongaro. - Florianópolis, SC, 2015.

80 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Amônia não-ionizada. 3. Efluente e lodo suíno. 4. Estabilidade térmica viral. 5. Vírus entéricos. I. Monte Barardi, Célia Regina . II. Fongaro, Gislaine . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Camila Daminelli Schissi

**INATIVAÇÃO DE PATÓGENOS ENTÉRICOS EM DIGESTATO  
SUINÍCOLA UTILIZANDO ADENOVÍRUS HUMANO COMO  
MODELO**

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

Florianópolis, 15 de dezembro de 2015

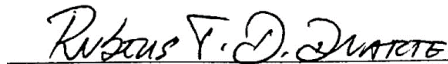
**Banca Examinadora:**



Prof.<sup>a</sup>, Dr.<sup>a</sup> Célia Regina Monte Barardi  
PRESIDENTE DA BANCA



Prof., Dr.<sup>a</sup> Thaís Cristine Marques Sincero  
MEMBRO TITULAR



Prof., Dr. Rubens Tadeu Delgado Duarte  
MEMBRO TITULAR

---

Prof., Dr. Admir José Giachini  
MEMBRO SUPLENTE



## Agradecimentos

Aos meus pais, Telmo e Alda, pelo incentivo e auxílio no caminho em que trilho hoje, compreensão e amor incondicional;

Ao meu irmão, Mauro, pelo apoio, amor e gratidão;

À minha querida orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Célia Regina Monte Barardi pela oportunidade em realizar este trabalho, orientação, incentivo e amizade;

À Gislaïne Fongaro pela co-orientação neste trabalho, dedicação, confiança, ensinamentos e principalmente à amizade;

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Elisa Magri pelos ensinamentos, amizade e parceria neste trabalho;

À Mariana de Almeida do Nascimento e Lucas Ariel Totaro Garcia pela paciência, ensinamentos e treinamento nos primeiros passos da minha Iniciação Científica;

Aos colegas do LVA pelas ótimas tardes de descontração, cafés, aprendizados e comemorações;

À Laurita Boff e Gabriela Janine da Luz pelo companheirismo, risadas e incrível amizade;

Aos meus amigos da graduação: Flávia, Francisco, Leonardo e Marcello, obrigada pelas risadas, viagens e carinho nestes quatro anos;

Ao Lucas pelo incentivo e carinho;

A todos os meus amigos por sempre acreditarem em mim;

A EMBRAPA Suínos e Aves pela parceria neste trabalho;

À banca examinadora, formada por: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Thaís Cristine Marques Sincero, Prof. Dr. Rubens Tadeu Delgado Duarte e Prof. Dr. Admir José Giachini;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica;

A todos que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho.



## RESUMO

A produção de suínos é uma importante atividade econômica no Brasil, havendo necessidade de desenvolver mecanismos sustentáveis que visem diminuir o impacto ambiental nessa cadeia produtiva. A biomassa derivada de dejetos suínos possui potencial para ser utilizada como fertilizante, no entanto, a aplicação de dejetos deve vir ao encontro da segurança sanitária, evitando a disseminação de patógenos animais e humanos. Neste estudo, Adenovírus Humano-2 (HAdV-2) foi utilizado como modelo de patógeno entérico, sendo possível avaliar: 1) sua estabilidade térmica em temperaturas naturais (16 e 22°C), mesofílicas (37°C) e termofílicas (55°C); 2) sua inativação por meio da ação biocida da amônia não-ionizada frente aos lodos e efluentes da suinocultura processados em biodigestor anaeróbio. Para a enumeração de HAdV-2, a técnica de inoculação em Cultura Celular (ICC) seguida por tratamento enzimático com DNaseI (et) e posterior transcrição reversa e qPCR (RT-qPCR) (ICC-et-RT-qPCR) foi utilizada. Quando as respectivas temperaturas foram aplicadas, os resultados mostraram que para o efluente em 16°C, HAdV-2 mostrou-se relativamente estável, tendo  $2,0\log_{10}$  de decaimento em 90 dias; nas temperaturas de 22 e 37°C houve decaimento superior a  $3,0\log_{10}$  a partir de 30 dias de estocagem; Quando em contato com o lodo, HAdV-2 mostrou-se menos estável, sendo que a 16°C houve decaimento viral de  $2,0\log_{10}$  após 60 dias; nas temperaturas de 22 e 37°C houve decaimento superior a  $2,5\log_{10}$  a partir de 30 e 20 dias, respectivamente; para 55°C foram necessárias 12 h para efluente e 24 h para o lodo para o decaimento de  $4,0\log_{10}$ . Para o estudo de inativação por amônia não-ionizada, ureia foi utilizada como aditivo alcalinizante, propiciando a conversão de íon amônio em amônia não-ionizada. Foram testadas três concentrações de amônia não-ionizada no efluente e lodo suinícola biodigerido: a) efluente: 171,7 mM (T1), 322,2 mM (T2) e 670,0 mM (T3); b) lodo: 370,5 mM (T1), 786,7 mM (T2) e 1609,4 mM (T3). Os resultados apontaram que no efluente, HAdV-2 foi inativado significativamente em 15 dias nos T1 e T2, com redução de 3,6 e  $4,0\log_{10}$ , sendo que no T3 foram necessários 9 dias de tratamento para obter-se uma redução de  $3,0\log_{10}$ . No lodo, HAdV-2 foi inativado significativamente em 9 dias nos T1 e T2, com reduções de 3,5 e  $4,0\log_{10}$ , respectivamente, sendo que no T3 foram necessários 3 dias de tratamento para a redução de  $3,0\log_{10}$ . A estabilidade de HAdV-2 em temperaturas naturais tanto em lodo quanto em efluente suíno biodigerido anaerobicamente, demonstrou que o pós-tratamento de tais matrizes é essencial para um reciclo agrícola seguro. Neste sentido o uso de amônia não-ionizada (condicionada pela adição de ureia) para a inativação de patógenos entéricos é promissor, uma vez que o emprego de temperaturas mesofílicas e termofílicas, mesmo que eficientes, demandam gasto energético, podendo ser economicamente inviáveis.

**Palavras-chave:** Amônia não-ionizada; Efluente e lodo suíno; Estabilidade térmica viral; Fertilizantes; Vírus entéricos.





## Abstract

The swine production is an important economic activity in Brazil and need to develop sustainable mechanism for such agro industrial activity. The biomass derived from swine manure has the potential to be used as fertilizer, however, application of waste shall ensure the health security, preventing propagation of animal and human pathogens. In this study, human adenovirus-2 (HAdV-2) was used as an enteric pathogen model, being possible to evaluate: 1) their thermal stability in natural temperatures (16 and 22°C), mesophilic (37°C) and thermophilic (55°C) conditions; 2) their inactivation based on the biocide action of uncharged ammonia added to the effluent and sludge from swine manure processed in anaerobic digester. To enumerate the HAdV-2, the technique of Integrated Cell Culture (ICC) followed by enzymatic treatment with DNase I (et) and subsequent reverse transcription and qPCR (RT-qPCR) (ICC-et-RT-qPCR) was used. When respective temperatures were applied, results showed that for the effluent at 16°C, HAdV-2 was stable, showing  $2.0\log_{10}$  decay at 90 days; in temperatures of 22 and 37°C it was observed a  $3.0\log_{10}$  decay after 30 days of storage. For sludge, HAdV-2 was less stable, and at 16°C the decay was  $2.0\log_{10}$  after 60 days; for temperatures of 22 and 37°C, it was observed a decay higher than  $2.5\log_{10}$  after 30 and 20 days, respectively. At temperature of 55°C it was necessary 12 h for effluent and 24 h for sludge to obtain a  $4.0\log_{10}$  decay (99.99%). For study of waste inactivation using uncharged ammonia, urea was used as additive for the conversion of ammonium ion to uncharged ammonia, and it was tested three uncharged ammonia concentrations in effluent and sludge: a) effluent: 171.7 mM (T1), 322.2 mM (T2) and 670 mM (T3); b) sludge: 370.5 mM (T1), 786.7 (T2) and 1609,4 mM (T3). Results showed that in effluent, HAdV-2 was significantly inactivated after 15 days in T1 and T2, with decrease of 3.6 and  $4.0\log_{10}$ , respectively. In T3, a  $3.0\log_{10}$  decay was reached in 9 days. For sludge, HAdV-2 was significantly inactivated after 9 days in the T1 and T2, with reductions of 3.5 and  $4.0\log_{10}$ , respectively. For T3 it was necessary 3 days to reach  $3.0\log_{10}$  decay. HAdV-2 stability at natural temperatures in both effluent and sludge from swine manure by anaerobic digestion showed that the post-treatment of such matrices is essential for safe recycle as biofertilizer for agricultural. In this regard, the use of uncharged ammonia (conditioned for urea addiction) for disinfection of enteric swine pathogens proved to be a promising alternative treatment, since the use of mesophilic and thermophilic temperatures are effectively, although require energy, which is not economically sound.

**Keywords:** Effluent and sludge swine; Enteric virus; Fertilizers; Uncharged ammonia; Viral thermal stability



## Sumário de Figuras

<b>Figura 1.</b> Agregação viral .....	26
<b>Figura 2.</b> (a) Eletromicrografia de Adenovírus Humano (b) Estrutura do adenovírus e suas principais proteínas mediadoras da internalização viral.....	27
<b>Figura 3.</b> Mapa do Estado de Santa Catarina, mostrando a localização do município de Itapiranga .....	33
<b>Figura 4.</b> Biodigestor de Lagoa Coberta (a) Imagem de biodigestor anaeróbio de fluxo semicontínuo em escala real e (b) Esquema de operação e representação esquemática do modo de operação de biodigestor anaeróbio de fluxo semicontínuo.....	34
<b>Figura 5.</b> Esquema do experimento de inativação térmica de efluente e lodo de biodigestor .....	35
<b>Figura 6.</b> Esquema do experimento de inativação por amônia não-ionizada de efluente e lodo de biodigestor anaeróbico.....	36
<b>Figura 7.</b> Estabilidade térmica de HAdV-2 em função da temperatura em (a) Efluente e (b) Lodo suinícola nas temperaturas 16, 22 e 37°C. ....	49
<b>Figura 8.</b> Estabilidade térmica do HAdV-2 em função do tempo em Efluente e Lodo suinícola sob temperatura de 55°C. ....	45
<b>Figura 9.</b> Tempo de retenção hidráulica necessário para inativação de $\geq 3,0\log_{10}$ de HAdV-2 em efluente e lodo suinícola, nas temperaturas de 16, 22, 37 e 55°C. ....	46
<b>Figura 10.</b> Perfil de desinfecção de efluente e lodo HAdV-2 frente aos tratamentos baseados na elevação de $\text{NH}_3$ . ....	49
<b>Figura 11.</b> Tempo necessário de exposição à amônia não-ionizada para a inativação de $\geq 3,0\log_{10}$ de HAdV-2 em efluente e lodo suinícola .....	50



## Sumário de Tabelas

**Tabela 1.** Resultados dos parâmetros físico-químicos das amostras de efluente e lodo. .... 42

**Tabela 2.** Média dos parâmetros físico-químico avaliados nas amostras de efluente e lodo suinícola, frente aos percentuais de ureia adicionada nas amostras e seus respectivos valores de temperatura, pH, amônia total,  $\text{NH}_3$  ao final de 120 dias de estocagem. .... 47



## Lista de Abreviaturas

$\mu\text{g}$  - Micrograma  
 $\mu\text{L}$  - Microlitro  
A549 – Células epiteliais de carcinoma de pulmão humano  
BD – Biodigestor anaeróbico  
CC - Ciclo completo  
CCL – Lista de candidatos a contaminantes  
CG – Cópias genômicas  
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente  
CT - Unidade de crescimento e terminação  
DMEM - Dulbecco's modified Eagle medium  
DNA – Ácido desoxirribose nucleico  
ECP – Efeito citopático  
et – Tratamento enzimático  
HAdV – Adenovírus humano  
HAdV-2 – Adenovírus humano sorotipo 2  
 $\text{HCO}_3^-$  - Íon carbonato  
ICC – Cultura celular integrado  
MEM – Minimum essential medium Eagle  
mL - Mililitro  
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro  
NAT - Nitrogênio amoniacal total  
 $\text{NH}_3$  – Amônia não-ionizada  
 $\text{NH}_4^+$  - Íon amônio  
PBS - Solução tampão fosfato-salina  
pH – Potencial hidrogeniônico  
pKa – Constante de dissociação  
qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativo  
RH – Retenção hidráulica  
RNA – Ácido ribonucleico  
RT – Transcrição reversa  
SFB – Soro fetal bovino  
ST - Sólidos totais  
TA - temperatura amostral  
U.V. – Ultravioleta  
UPL - Unidade de produção de leitões  
US EPA – United States Environmental Protection Agency





## Sumário

1 CONTEXTUALIZAÇÃO.....	19
1.1 Suinocultura no Brasil.....	19
1.2 Uso de biodigestores anaeróbios na suinocultura.....	21
1.3 Patógenos entéricos em dejetos suínos.....	23
1.3.1.1 Adenovírus como biomarcador.....	26
1.4 Higienização e desinfecção de dejetos suinícolas.....	29
1.4.1 Temperatura e estocagem.....	29
1.4.2 Amônia não-ionizada.....	29
2 OBJETIVOS.....	32
2.1 Objetivo geral.....	32
2.1.1 Objetivos específicos.....	32
3 METODOLOGIA.....	33
3.1 Amostras de efluente e lodo suinícola.....	33
3.2 Análises físico-químicas.....	34
3.3 Higienização e desinfecção de efluente e lodo suinícola.....	34
3.3.1 Higienização por emprego de temperatura.....	34
3.3.2 Desinfecção por amônia não-ionizada.....	35
3.4 Cultivo celular, produção de estoque viral e ensaios de citotoxicidade amostral.....	37
3.4.1 Cultivo de células animais.....	37
3.4.2 Produção de estoque viral de HAdV-2.....	38
3.4.3 Ensaio de citotoxicidade amostral.....	38
3.5 Enumeração de HAdV-2 infecciosos por meio de ICC-et-RT-qPCR ...	39
3.5.1 Extração dos ácidos nucleicos totais.....	40
3.5.2 Detecção de HAdV infecciosos por PCR em tempo real quantitativo (qPCR).....	41
3.6 Análises estatísticas.....	41
4 RESULTADOS.....	42
4.1 Higienização por temperatura.....	42
4.1.1 Análises físico-químicas.....	42
4.2 Desinfecção por meio de amônia não-ionizada.....	46
4.2.1 Análises físico-química.....	46
5 DISCUSSÃO.....	51
6 SUMÁRIO DE RESULTADOS.....	56
6.1 Quanto à estabilidade térmica viral:.....	56
6.2 Quanto à desinfecção por amônia não-ionizada.....	56
7 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICE.....	77



# 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

## 1.1 Suinocultura no Brasil

A suinocultura no Brasil é uma importante atividade econômica e o país figura como o quarto maior produtor mundial de suínos, permanecendo atrás apenas dos Estados Unidos, Canadá e China, respectivamente. O estado de Santa Catarina destaca-se como o principal produtor brasileiro de suínos com 25% do efetivo nacional, influenciando positivamente na economia estadual e nacional (IBGE, 2010; (SOUZA et al., 2013).

O sistema de produção de suínos brasileiros segue a linha industrial (tecnificada) e de subsistência (produtores familiares). A linha industrial vem crescendo ao longo dos últimos anos e como consequência, a linha de subsistência sofre queda e substituição pela linha tecnificada (SOUZA et al., 2013). Em relação à prática de criação dos suínos, as granjas podem ser de: Ciclo Completo (CC), a qual consiste em uma unidade de produção em que existem todas as fases do ciclo reprodutivo (nascimento à engorda), sendo atualmente pouco utilizada (essas são as menos comuns atualmente); Unidade de Produção de Leitões (UPL), a qual consiste na criação de suínos em fase reprodutiva, onde ocorre o nascimento dos leitões e fase inicial de crescimento; Unidade de Crescimento e Terminação para abate (CT), com suínos que possuem entre 25 a 100 Kg (HEIDEN, 2006; SOUZA et al., 2013).

Contudo, a atividade suinícola no Brasil é considerada potencialmente poluidora, pois se estima que seja necessário 6 m<sup>3</sup> de água potável para produzir 1 Kg de carne de suínos, sendo que o volume de dejetos produzidos irá variar conforme o número de animais, composição da alimentação, tipos de bebedouros, manejo dos dejetos e estado psicológico dos animais, podendo chegar entre 10 e 15 L, e por muitas vezes, estes dejetos são fonte de contaminação de águas e solos (BELLI-FILHO, 1995; PALHARES, 2011). A composição dos dejetos suinícolas está intimamente relacionada ao tipo de confinamento e alimentação de cada granja, sendo basicamente constituída por uma mistura de fezes e urina, resíduos de alimentos, água de escape dos bebedouros e água utilizada para a higienização das instalações, tendo como produto final um resíduo escuro e pastoso com tonalidades que variam entre marrom e preto como produto final (HENN, 2005).

Por muitos anos os dejetos de suínos foram lançados *in natura* em corpos d'água, como em rios, causando um grave problema ambiental. Porém, em 2011 o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) publicou a Resolução nº 430 que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementando e alterando a Resolução nº 357 (CONAMA, 2005), regulamentando a liberação de efluentes humano na água, entretanto, nada foi estabelecido sobre os parâmetros de segurança para a reutilização de águas residuais na produção animal (CONAMA, 2012).

Quanto ao reciclo dos dejetos de suínos, considerando a Região Sul do Brasil a principal produtora nacional, em Santa Catarina e no Brasil, conforme a Instrução Normativa nº 11 da Fundação do Meio Ambiente, o uso de fertilizantes orgânicos deve seguir as recomendações agrônomicas segundo o Manual de Adubação e de Calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (CQFS-RS/SC, 2004). Da mesma forma, deve-se avaliar as análises físico-químicas e nutricionais do solo, sendo tais análises realizadas em laboratório credenciado à Rede Oficial de Laboratório de Análise de Solo e de Tecido Vegetal dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (ROLAS), sendo que a aplicação dos fertilizantes orgânicos no solo deve considerar a minimização de perdas de nutrientes por percolação e lixiviação, e a dose de fertilizante aplicada por hectare de solo seja baseada na oferta de Fósforo (P).

Os dejetos suinícolas são amplamente utilizados na agricultura como fertilizantes naturais, uma vez que possuem alta concentração de matéria orgânica em sua composição. No entanto, as portarias e recomendações de reciclo desses dejetos, bem como a maioria dos estudos da área estão baseadas em condições físico-químicas dos dejetos. São raros os estudos que visam investigar e dispor acerca do risco biológico do reciclo de tal biomassa, tendo em vista que patógenos, principalmente os entéricos (como os vírus, bactérias, protozoários e helmintos) podem ser dispersos pela água, ar, solo e alimentos, podendo causar doenças em animais e humanos, evidenciando a necessidade de tratamento para desinfecção desta biomassa (GABUTTI et al., 2000; COSTANTINI et al., 2007; RECESA, 2008; KROG; LARSEN; SCHULTZ, 2014; HAACK et al., 2015).

## 1.2 Uso de biodigestores anaeróbios na suinocultura

Os biodigestores anaeróbios (BAs) figuram como uma alternativa ecológica utilizada na reciclagem de matéria orgânica, proveniente tanto de dejetos animais e humanos como restos de alimentos, promovendo a deterioração, estabilização e desodorização desta biomassa (ALBURQUERQUE et al., 2012; ASTALS; NOLLA-ARDEVOL; MATA-ALVAREZ, 2013). Além disso, a US Environmental Protection Agency (US EPA) recomenda a utilização deste sistema, uma vez que além da digestão da biomassa, destaca-se como um sistema eficiente na produção de biogás, podendo ser utilizado como fonte de energia renovável no próprio sistema (US EPA, 2015a).

Em 1970, aliando a necessidade de tratamento e gestão de dejetos animais com a crise energética mundial, iniciou-se a busca de produção de energia via recursos renováveis, sendo que a utilização de biodigestores anaeróbios (BAs) e a biomassa suinícola passou a ser uma opção adotada e incentivada no Brasil, já que no país há demanda tanto energética como por biofertilizantes (KUNZ; MIELE; STEINMETZ, 2009; MANYI-LOH et al., 2013; FONGARO et al., 2014). Assim, no Brasil, a biodigestão anaeróbia se destacou como uma alternativa ecológica, permitindo o armazenamento de efluentes e lodos para que sejam tratados e possam ser utilizados posteriormente como fertilizantes, os quais possuem potencial nutricional para fins agrícolas, além de ser possível produzir e recuperar o biogás produzido para a geração de energia (KUNZ; MIELE; STEINMETZ, 2009; MANYI-LOH et al., 2013; FONGARO et al., 2014).

Os BAs podem ser classificados conforme o modo de operação podendo ter um fluxo contínuo, semicontínuo ou descontínuo (batelada) quando relacionados à entrada de matéria orgânica nos tanques. O modelo de produção contínua, consiste na entrada de matéria orgânica, ao mesmo tempo em que o digestato, resultante da digestão anaeróbia, é retirado. Além disso, não se faz necessário a abertura do equipamento para inserir nova matéria orgânica e recomenda-se um tempo de retenção hidráulica entre 30 a 50 dias (CHOWDHURY; FULFORD, 1992; OLIVEIRA, 2004; CASTANHO, 2008). Para o modelo semicontínuo, o reator é preenchido periodicamente com a biomassa e neste tempo o biogás e o digestato são retirados (CHOWDHURY; FULFORD, 1992; CASTANHO, 2008; ROWSE, 2011). O sistema descontínuo (batelada) caracteriza-se pela entrada de matéria orgânica no início do processo, e

então a câmara é selada em condições anaeróbias e monitorada até que a biomassa seja degradada por completo e ocorra a produção do biogás. Posteriormente, o BA é limpo para ocorrer um novo ciclo (CHOWDHURY; FULFORD, 1992; CASTANHO, 2008).

A eficiência dos BAs dependerá basicamente do pH e temperatura de atuação, sendo que este último fator é o que mais pode sofrer alterações, uma vez que os BAs podem atuar em condições de temperaturas naturais, mesofílicas ou termofílicas, todavia, todos dependem diretamente da ação de microrganismos metanogênicos para a produção de biogás (ADU-GYAMFI; RAVELLA; HOBBS, 2012).

Quanto às temperaturas de atuação, são considerados basicamente três tipos de BAs: temperaturas naturais, mesofílicas e termofílicas (ADU-GYAMFI; RAVELLA; HOBBS, 2012). Os BAs em temperaturas naturais são aqueles que atuam em temperaturas menores que 25°C, sendo normalmente instalados em países de clima tropical. Estes BAs atuam em temperatura ambiente, variando a temperatura da biomassa tratada conforme as alterações das condições climáticas locais (geralmente em temperaturas entre 15-24°C), sendo os mais comuns os de Lagoa Coberta ou Canadense que são construídos de forma simples e formados basicamente por uma campânula (câmara de digestão recoberta por lona PVC) e por um gasômetro, sendo responsáveis pela digestão da biomassa e captação do biogás produzido (OLIVEIRA, 2004).

Os BAs mesofílicos operam a temperaturas entre 35-37°C, tendo uma maior eficiência na produção de biogás, uma vez que proporcionam condições ideais para a propagação de microrganismos metanogênicos. Esses reatores são os mais utilizados em países europeus, Estados Unidos e Canadá (MANSER; MIHELIC; ERGAS, 2015; WILKINS et al., 2015).

Os BAs termofílicos operam em temperaturas entre 50-55°C, produzindo uma quantidade média de biogás em um tempo menor quando comparado ao reator mesofílico e sendo considerados eficientes para desinfecção de *Salmonella* sp. e coliformes fecais. No entanto, a alta temperatura de funcionamento pode ocasionar a inativação de microrganismos metanogênicos, responsáveis pela produção de metano, bem como requer gasto energético para o aquecimento da biomassa (BROWN; SHI; LI, 2012; LABATUT; ANGENENT; SCOTT, 2014; MASSÉ; SAADY, 2015; SHEETS; GE; LI, 2015).

A biodigestão anaeróbia é conhecida por ser capaz de estabilizar o dejetos suíno favorecendo: o sinergismo entre o equilíbrio de macro e

m micronutrientes com a umidade, diluição de compostos inibidores e tóxicos, otimização da produção de metano e aumento da estabilidade do digestato (MATA-ALVAREZ; MACÉ; LLABRÉS, 2000; ASTALS et al., 2011; ALBURQUERQUE et al., 2012). Entretanto, poucos são os estudos dirigidos no Brasil e no mundo quanto à eficiência da redução das comunidades microbianas e desinfecção dos dejetos suínos durante a biodigestão anaeróbia (FONGARO et al., 2014; MANSER et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

### **1.3 Patógenos entéricos em dejetos suínos**

Suínos são considerados reservatórios biológicos de muitos patógenos entéricos, podendo excretar intermitentemente tais patógenos em suas fezes. Muitos patógenos entéricos excretados em fezes suínas são considerados de interesse veterinário e para a saúde humana (zoonóticos). Podem impactar na saúde humana e animal, bem como na economia relacionada à produção de suínos e outros animais em sua cadeia produtiva. Esses patógenos podem ser dispersados nas águas superficiais e subterrâneas, em solos e alimentos (BOUQUET et al., 2011; KROG; LARSEN; SCHULTZ, 2014; ERICKSON et al., 2015).

Patógenos, como as bactérias *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* são os mais prevalentes desta classe em dejetos suínos, ocasionando diversos surtos em humanos e prejuízos na cadeia produtiva de suínos (WHO/FAO, 2002; (BRUUN et al., 2009). No entanto, outras classes de microrganismos também se destacam neste aspecto, como os protozoários *Cryptosporidium* sp. e *Giardia* sp., sendo conhecidos os cistos e oocistos, respectivamente, como resistentes ao calor e a mudanças de pH (TENTER, 2009; BALDURSSON; KARANIS, 2011). No entanto, no setor de produção de suínos, os vírus entéricos têm ganhado destaque nos últimos 10 anos, já que podem ser facilmente disseminados por aerossóis, verticalmente, por via fecal-oral ou indiretamente por meio de alimento e água contaminados (SEGALES; ALLAN; DOMINGO, 2005; REUTER et al., 2010; OPRIESSNIG et al., 2011; GARCIA et al., 2012; LAZIĆ et al., 2015).

A investigação e monitoramento de todos os patógenos entéricos em dejetos de suínos visando gestão dos riscos biológicos ou em outras matrizes são considerados laboriosos e tecnicamente impossível de serem praticados, tendo em vista a vasta diversidade de patógenos entéricos e limitações de técnicas para detectá-los. Alternativamente, os vírus

entéricos são amplamente utilizados como biomarcadores de contaminação fecal, capazes de indicar a qualidade sanitária das matrizes para tratamento ou após tratamento, ou ainda, servirem de modelos indicativos propiciando inferir o comportamento e eliminação de patógenos entéricos, sendo considerados modelos para inferir a eficiência de sistemas de tratamento (BOUDAUD et al., 2012) ; US EPA, 2015b).

#### **1.4 Vírus entéricos em dejetos de suínos e como biomarcadores**

Os vírus entéricos estão presentes no trato gastrointestinal humano e animal e podem ser eliminados em altas concentrações nas fezes, com cerca de  $10^5$  a  $10^{11}$  partículas virais por grama de fezes (BOSCH et al., 2008). São frequentemente encontrados em águas de recreação, superficiais e subterrâneas utilizadas para consumo, esgotos humanos não tratados ou com tratamento ineficaz, bem como em efluentes e lodos provenientes da suinocultura, os quais são utilizados diretamente na agricultura, significando um risco para saúde pública (FONG et al., 2010; DEBOOSERE et al., 2012; FONGARO et al., 2014).

A transmissão dos vírus entéricos pode ocorrer através da ingestão de alimentos e água contaminados ou por aerossolização (FIORE, 2004). As doenças causadas por esses vírus estão associadas principalmente a gastroenterites, mas também podem ocasionar infecções respiratórias, conjuntivites, hepatites e doenças com altas taxas de mortalidade como as meningites assépticas, encefalite e paralisias em imunocomprometidos e, eventualmente podem causar infecções assintomáticas, dependendo do patógeno viral e da imunidade do hospedeiro (GRIFFIN et al., 2003; FONG; LIPP, 2005; LA ROSA et al., 2012; TATE et al., 2012; SEVERI et al., 2015).

Na cadeia produtiva de suínos destacam-se entre os principais vírus entéricos espécie-específicos os Circovírus Porcino-2 (PCV2), genoma DNA simples fita circular e considerados de interesse econômico e veterinário, pois podem ocasionar a morte de diversos animais, afetando diretamente a produção de suínos, os Adenovírus Porcino (PAV), genoma DNA dupla fita que ocasionam problemas gastrointestinais suaves, podendo ser cofatores para desencadear a replicação de outros vírus, como o PCV2, prejudicando o crescimento dos animais jovens (HAMEL; LIN; NAYAR, 1998; HAMMOND; JOHNSON, 2005).

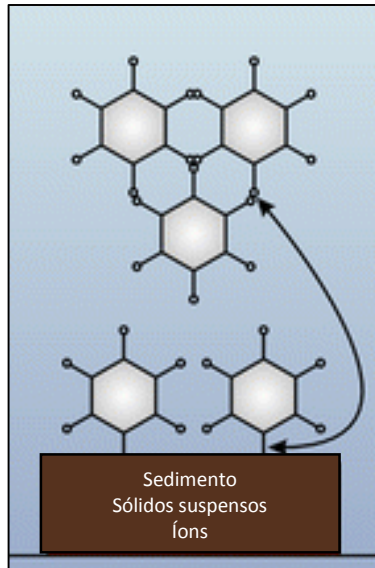
Quanto aos vírus entéricos, também presentes nesta classe de patógenos entéricos zoonóticos, destaca-se o Vírus da Hepatite E (HEV)



que possui genoma RNA simples fita senso positivo, sendo reportado por causar hepatites em humanos e animais, e considerados potencialmente transmissíveis por dejetos e carcaças suínas, sendo excretados intermitentemente por suínos, bovinos e humanos contaminados (BOUQUET et al., 2011; VAN DER POEL, 2014). Destacam-se também os Rotavírus A (RVA), que possuem genoma RNA dupla fita segmentado, reportado por serem os principais causadores de diarreias agudas e relacionados a altos índices de mortes de crianças e animais jovens, sendo excretados intermitentemente por suínos em todas as fases de produção (STEYER et al., 2007; COLLINS et al., 2010; MATTHIJNSSENS et al., 2011).

De maneira geral, os vírus entéricos são considerados biomarcadores de contaminação fecal no ambiente, sobrepondo-se aos parâmetros bacteriológicos, uma vez que a presença muitas vezes não está relacionada com a presença de bactérias. Vírus entéricos são resistentes às condições adversas do ambiente como alterações de pH, temperatura e luz U.V.. Tal característica deve-se principalmente à ausência de envelope lipoproteico, bem como da sua capacidade de agregação em íons e partículas sólidas, bem como entre si, ocasionando proteção contra os fatores de inativação (HERNROTH et al., 2002; WONG et al., 2012), de acordo com o apresentado na **Figura 1**.

**Figura 1.** Agregação viral.



Fonte: Adaptado de Wong et al. (2012)

### 1.3.1.1 Adenovírus como biomarcador

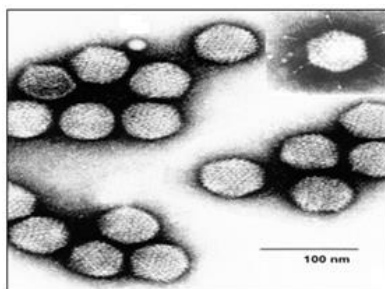
Dentre os vírus entéricos mais reportados como biomarcadores em estudos de desinfecção, os Adenovírus são reconhecidos como modelos resistentes às condições adversas do ambiente (pH, temperatura e radiação solar), sendo considerados mais resistentes que os vírus entéricos de genoma RNA, permanecendo viáveis no ambiente por 3 meses ou mais (GERBA; GRAMOS; NWACHUKU, 2002; FONG; LIPP, 2005; CARRATALÀ et al., 2013)

Os Adenovírus pertencem à Família Adenoviridae, dividida em quatro gêneros: *Atadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Mastadenovirus* e *Siadenovirus*. Os adenovírus responsáveis por infecções em humanos e mamíferos estão inclusos no gênero *Mastadenovirus*, sendo atualmente conhecidos 57 sorotipos divididos em sete espécies (A-G) de acordo com características imunológicas e bioquímicas da biologia do vírus (SANTOS et al., 2008; ICTV, 2012).

Eles possuem genoma composto por fita dupla de DNA linear não segmentado associado às proteínas, sendo constituído por aproximadamente 35.000 pares de bases. Os vírions são icosaédricos não envelopados e seu capsídeo compreende 240 proteínas hexons onde está situado o antígeno grupo-específico comum a todos os sorotipos, além de 12 pentâmeros que estão localizados em cada um dos vértices, os quais contêm fímbrias responsáveis pela adsorção e internalização do vírus à célula (VAN OOSTRUM; BURNETT, 1985; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008; WILLIAMS et al., 2010; GALL; SHISLER; MARINAS, 2015). Estas estruturas são as principais responsáveis pela ligação do vírus ao Receptor Cocksackie-Adenovírus (CAR) e internalização viral via endocitose (TROTMAN et al., 2001; SCHOGGINS; FALCK-PEDERSEN, 2006; GALL; SHISLER; MARINAS, 2015). Após a internalização no endossomo, o vírus é parcialmente desnudado e a proteína VI lisa o endossomo, sendo o genoma e a proteína VII injetados dentro do núcleo, iniciando a síntese da proteína early E1A após 2 h da infecção e então após 5-8 h ocorre a duplicação do genoma e o mRNA é traduzido em proteínas estruturais tardias como hexon, fímbrias e pentâmeros, as quais fazem parte da estrutura do capsídeo viral (GALL; SHISLER; MARINAS, 2015; LARSON et al., 2015). A **Figura 2** apresenta a estrutura do adenovírus e suas principais proteínas.

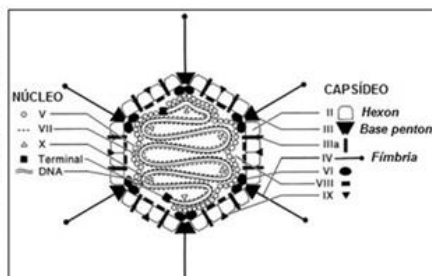
**Figura 2.** (a) Eletromicrografia de Adenovírus Humano (b) Estrutura do adenovírus e suas principais proteínas mediadoras da internalização viral.

(a)



Fonte: [http://ictvdb.bio-mirror.cn/WIntkey/Images/em\\_adeno.gif](http://ictvdb.bio-mirror.cn/WIntkey/Images/em_adeno.gif)

(b)



Fonte: Adaptado de Rux e Burnett (2004).

Os adenovírus podem ser transmitidos via contato direto ou indireto, através de secreções oculares e respiratórias e por via fecal-oral através do consumo de alimentos e água. Estes vírus são causadores de uma variedade de enfermidades, como as infecções relacionadas às doenças respiratórias (pneumonia, doença respiratória aguda e febre faringoconjuntival), intestinais (gastroenterites), ligadas ao Sistema Nervoso Central (meningoencefalite) e as do globo ocular (conjuntivites), sendo específicas a cada sorotipo viral (JIANG, 2006; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008; MENA; GERBA, 2009).

Diversos estudos indicam que os adenovírus são altamente prevalentes no ambiente e de longa persistência em fezes, além de estarem presentes em diversas matrizes ambientais, como em águas de consumo humano, água do mar, em águas residuais, subterrâneas e rios, lodos de esgotos humanos e em dejetos de animais presentes na suinocultura (HARAMOTO et al., 2009; MORESCO et al., 2012; FONGARO et al., 2014; AHMED et al., 2015; GARCIA; NASCIMENTO; BARARDI, 2015; MAGRI et al., 2015; SILVA et al., 2015). Outros estudos evidenciam que o adenovírus é até 60 vezes mais resistente a altas temperaturas e radiação U.V. do que os vírus RNA, como os RVA, HEV e enterovírus (FONG; LIPP, 2005; SIRIKANCHANA; SHISLER; MARINÑAS, 2008).

Assim, os adenovírus possuem potencial de serem biomarcadores de contaminação ambiental segundo a US EPA (2015b), sendo citados como biomarcadores e indicadores da eficiência de processos de higienização e desinfecção de matrizes aquáticas, em lodo humano e em dejetos animais.

Dos sorotipos de adenovírus, o sorotipo 2 humano (respiratório e espécie C) é citado como modelo viral usual nos estudos de inativação de patógenos em águas, efluentes, lodos e em alimentos, uma vez que se replica em cultura celular e é passível de enumeração (GERBA; NWACHUKU; RILEY, 2003; EISCHEID; MEYER; LINDEN, 2009; RIGOTTO et al., 2011).

## **1.4 Higienização e desinfecção de dejetos suínolas**

### **1.4.1 Temperatura e estocagem**

O emprego de temperatura como um método de higienização é estudado há anos e usado na indústria alimentícia para pasteurização, fermentação, na higienização de carcaças, de lodos de esgoto, de águas e de biomassas como dejetos suínos (ETERPI; MCDONNELL; THOMAS, 2009; DEBOOSERE et al., 2010; BOZKURT; D'SOUZA; DAVIDSON, 2015).

Dos fatores conhecidos como potencialmente higienizadores, a temperatura é considerada o mais importante. Temperaturas mesofílicas e termofílicas ( $\geq 37^{\circ}\text{C}$ ) podem danificar proteínas e membranas dos patógenos, bem como degradar os ácidos nucleicos, levando à inativação (FONG; LIPP, 2005). Sabe-se que dos patógenos entéricos, os vírus, juntamente com os ovos de *Ascaris* spp. possuem elevada estabilidade térmica se comparados com bactérias, cistos e oocistos de protozoários (GASSILLOU; SCHWARTZBROD; GANTZER, 2003; DE RODA HUSMAN et al., 2009).

A estocagem em temperatura ambiente dos dejetos e efluentes de suínos em lagoas é uma prática comum na cadeia produtiva. Temperaturas ambiente, como a de países tropicais, variando entre 15 e 25°C (EPAGRI/CIRAM), podem atuar favorecendo a predação natural por competição entre os microrganismos, pela ação biocida de ácidos graxos e atuação de proteases e lipases naturalmente presentes na biomassa estocada, podendo, portanto ser uma alternativa economicamente viável, mas dependente do tempo de retenção hidráulica e as oscilações de temperaturas (FONGARO et al., 2014).

### **1.4.2 Amônia não-ionizada**

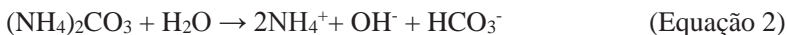
O uso da amônia não-ionizada ( $\text{NH}_3$ ) como agente biocida em dejetos animais tem apresentado potencial no aspecto de desinfecção sustentável de tais resíduos (NORDIN; NYBERG; VINNERAS, 2009).

A amônia total presente naturalmente nos dejetos animais está na sua forma inativa, íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), sendo necessário que haja um pH alcalino ( $\geq 8,5$ ) que favoreça a conversão de  $\text{NH}_4^+$  em  $\text{NH}_3$ , e esta por sua vez, possui ação biocida, penetrando as membranas facilmente, sendo

citotóxica à diversos tipos celulares (NORDIN; OTTOSON; VINNERAS, 2009).

Alguns produtos são utilizados com o propósito de aumentar e estabilizar o pH, realizando a conversão de  $\text{NH}_4^+$  em  $\text{NH}_3$ , a fim de promover a inativação de patógenos entéricos, como bactérias, vírus e ovos de *Ascaris lumbricoides* e *A. suum*. Dentre os alcalinizantes, as cinzas, fontes alternativas de carbonato de cálcio (como conchas de ostras) e ureia são relatados na literatura como promissores (ARTHURS; JARVIS; RUSSELL, 2001; NIWAGABA et al., 2009; MAGRI; PHILIPPI; VINNERAS, 2013).

A ureia [ $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ] destaca-se como alcalinizante, e é o fertilizante à base de nitrogênio mais utilizado na agricultura. Tem surgido como uma alternativa de aditivo em fezes humanas e dejetos animais para a estabilização do pH alcalino, aumentando o valor nutricional do fertilizante. A ureia em contato com ureases, presentes naturalmente na matéria orgânica, é hidrolisada em carbonato de amônio [ $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ] e em seguida é degradado em  $\text{NH}_4^+$  e carbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), sendo o  $\text{HCO}_3^-$ , também conhecido por sua ação biocida, um promotor da alcalinização juntamente com o processo de hidrólise (OTTOSON et al., 2008; NORDIN; OTTOSON; VINNERAS, 2009). A formação de  $\text{NH}_3$  e  $\text{HCO}_3^-$  a partir de excretas animais e mediada pela ação da urease está descrita nas Equações 1 e 2.



O equilíbrio de  $\text{HCO}_3^-$  é semelhante à do amoníaco, pois ambos dependem de pH e temperatura, sendo que o pH geralmente se estabiliza em torno de 9,0 quando a ureia se decompõe. Calcula-se a formação de 36% de amônia em forma de  $\text{NH}_3$  contra 4,5% de carbonatos totais na forma  $\text{CO}_3^{2-}$ , em pH de 9,0 a 25°C. Isso ocorre devido à diferença de pKa do ácido carbônico (6,35 e 10,33) e da amônia não-ionizada (9,25) (SNOEYNK et al., 1980; HELLSTRÖM; JOHANSSON; GRENNBERG, 1999).

A relação entre o  $\text{NH}_3$  (aq) e o  $\text{NH}_4^+$  é quantificada pela constante de dissociação, pKa. O pKa da amônia na faixa de temperatura entre 0-50°C, pode ser calculada pela Equação 3 (EMERSON et al., 1975), onde:

T é a temperatura em graus Kelvin, pKa é dependente da temperatura, sendo que o equilíbrio se dá em pH 9,9; 9,6; 9,3 e 9,0 para as temperaturas de 4, 14, 24 e 34°C, respectivamente. Assim, a concentração de NH<sub>3</sub> pode ser calculada pela Equação 4, de acordo com o pH e temperatura, sendo que as concentrações de NH<sub>3</sub> preditas variam em função dos mesmos.

$$pka = \frac{2729,92}{(T + 0,090181)} \quad (\text{Equação 3})$$

$$f(\text{NH}_3) = \frac{1}{(10^{pka - \text{pH}} + 1)} \quad (\text{Equação 4})$$

O uso de NH<sub>3</sub> para processos de higienização ainda é pouco utilizado no mundo, entretanto o potencial de aplicação é viável, visto que possui baixo custo e baixa capacidade operacional, sendo uma das maiores vantagens a elevação da concentração nutricional ao produto tratado, o qual poderá ser utilizado como fertilizante posteriormente (PECSON et al. 2007; NORDIN et al., 2009; MAGRI et al., 2013).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Determinar a estabilidade térmica e a inativação de patógenos entéricos em digestato suinícola (efluente e lodo), utilizando adenovírus humano-2 (HAdV-2) como biomarcador, visando o reciclo agrícola destas matrizes na fertilização.

#### **2.1.1 Objetivos específicos**

I - Implantar, operar e monitorar um experimento em escala laboratorial, para avaliação da estabilidade térmica de HAdV-2 em efluente e lodo acumulado proveniente de biodigestores anaeróbios suinícolas;

II - Implantar, operar e monitorar um experimento em escala laboratorial, para avaliar a inativação de HAdV-2 por meio da ação de amônia não-ionizada em efluente e lodo acumulado proveniente de biodigestores anaeróbios suinícolas.



### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Amostras de efluente e lodo suinícola

Um total de 20 L de efluentes e lodos suinícolas foram coletados a partir de um biodigestor anaeróbio situado em uma granja produtora de suínos, fase de engorda e terminação (300 animais), do município de Itapiranga, extremo Oeste do Estado de Santa Catarina – Brasil (latitude: 27° 10' 10" S – longitude: 53° 42' 44" O), **Figura 3**.

**Figura 3.** Mapa do Estado de Santa Catarina, mostrando a localização do município de Itapiranga.



**Fonte:** Adaptado de IBGE, 2007.

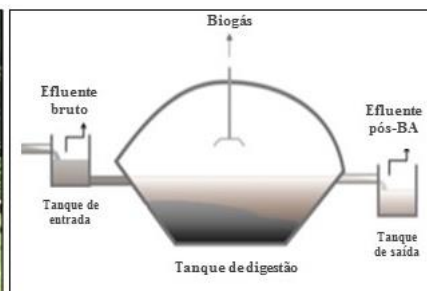
Trata-se de um biodigestor anaeróbio Canadense, atuando em temperatura ambiente e com capacidade para 135 m<sup>3</sup> de biomassa, operando continuamente com regime de alimentação diário de 3 m<sup>3</sup> e regime hidráulico de 40 dias, aproximadamente, **Figura 4**.

**Figura 4.** Biodigestor de Lagoa Coberta (a) Imagem de biodigestor anaeróbico de fluxo semicontínuo em escala real e (b) Esquema de operação e representação esquemática do modo de operação de biodigestor anaeróbico de fluxo semicontínuo.

(a)



(b)



Fonte: Adaptado de Fongaro et al. (2014)

## 3.2 Análises físico-químicas

As amostras de efluente e lodo suinícola foram avaliadas quanto à temperatura amostral (TA), nitrogênio amoniacal total (NAT), sólidos totais (ST) e pH, de acordo com APHA (2012), sendo as análises realizadas no Laboratório de Virologia Aplicada em parceria com o Grupo de Estudos em Saneamento Descentralizado.

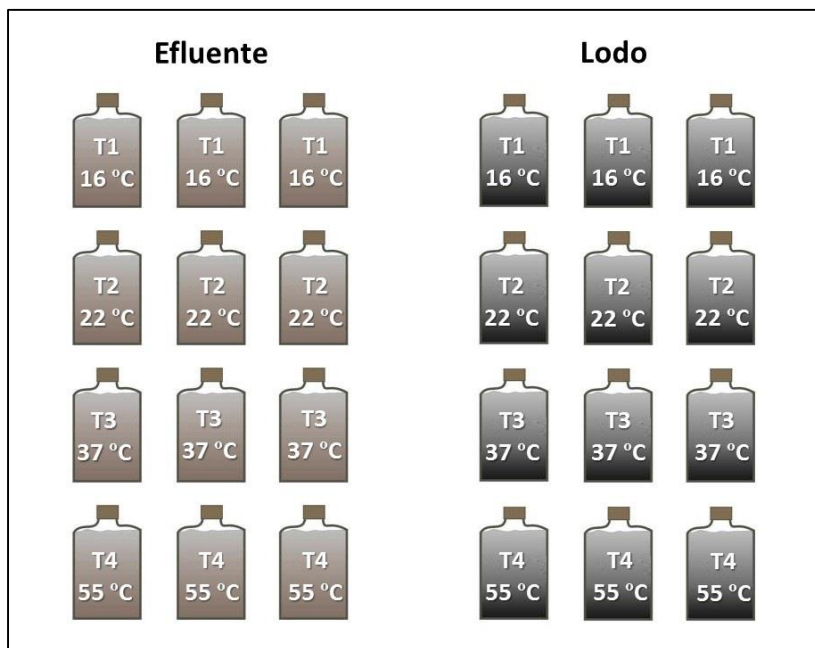
## 3.3 Higienização e desinfecção de efluente e lodo suinícola

### 3.3.1 Higienização por emprego de temperatura

A inativação de patógenos entéricos por emprego de temperatura foi avaliada utilizando como modelo o HAdV-2, inoculado em quantidade conhecida ( $8,0 \times 10^9$  CG/mL<sup>-1</sup>). HAdV-2 foi produzido e titulado de acordo com o **Item 3.4.2**.

Amostras de 250 mL de efluente e lodo foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar de volume de 350 mL, nas temperaturas de: 16 e 22°C, a fim de simular biodigestores que atuam em temperaturas naturais, no inverno e verão respectivamente; 37 e 55°C, mimetizando as temperaturas dos biodigestores mesofílicos e termofílicos, respectivamente. A **Figura 5** apresenta um esquema das condições experimentais.

**Figura 5.** Esquema do experimento de inativação térmica de efluente e lodo de biodigestor, onde *T* significa tratamento.



Semanalmente foi retirada uma alíquota de 2 mL de cada réplica dos tratamentos, sendo que a frequência amostral variou em função da temperatura, uma vez que a razão de inativação foi alterada em função da mesma.

### 3.3.2 Desinfecção por amônia não-ionizada

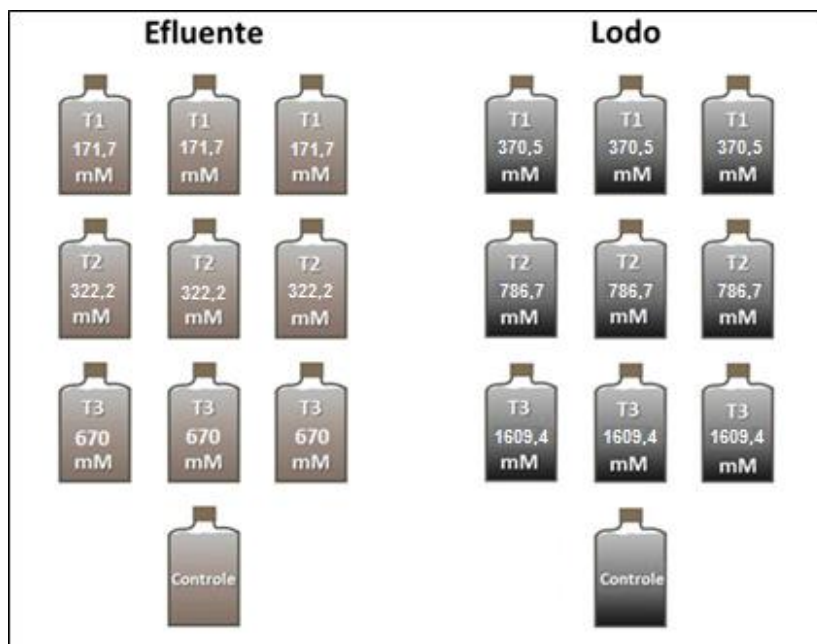
A inativação de patógenos entéricos em efluentes e lodos suínos por amônia não-ionizada foi avaliada utilizando como modelo o HAdV-2 artificialmente inoculado em quantidades conhecidas ( $8,71 \times 10^9$  CG/mL<sup>-1</sup>), HAdV-2 foi produzido e titulado de acordo com o **Item 3.4.2**.

O ensaio foi conduzido em triplicatas, avaliando-se três diferentes concentrações de amônia não-ionizada: a) Efluente: 171,7 mM, 322,2 mM e 670,0 mM; b) Lodo: 370,5 mM, 786,7 mM, 1609,4 mM) sob condições de temperatura controlada ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) (**Figura 6**).

A quantidade de ureia adicionada no efluente e lodo foi calculada e pré-testada para que o pH atingido fosse igual ou superior à 8,9, e posteriormente, as concentrações médias de  $\text{NH}_3$  alcançadas foram quantificadas por meio da equação:  $f\text{NH}_3 = 1 / (10^{\text{pKa}-\text{pH}} + 1)$ , segundo Emerson et al. (1975), e avaliada a inativação de HA $\Delta$ V-2.

Neste ensaio, foram monitorados semanalmente o pH e mensalmente a concentração de amônia não-ionizada, visto que a reação de hidrólise e conversão de ureia em  $\text{NH}_3$  depende diretamente da elevação do pH. Os controles experimentais foram constituídos por amostras de efluente e lodo sem adição de ureia.

**Figura 6.** Esquema do experimento de inativação por amônia não-ionizada de efluente e lodo de biodigestor anaeróbico, onde *T* significa tratamento.



As garrafas contendo ureia foram vedadas para que não ocorressem perdas de  $\text{NH}_3$  por volatilização. A partir das amostragens, foi retirada uma alíquota de 2 mL de cada réplica dos tratamentos.

A frequência amostral alterou-se em função da concentração de  $\text{NH}_3$ , pois a razão de inativação variou em função dessa concentração. Nos tratamentos T1 (Efluente 171,7 mM e Lodo 370,5 mM de  $\text{NH}_3$ ) a frequência amostral foi realizada semanalmente no primeiro mês, seguida por amostragens mensais até que a curva de decaimento pudesse ser estabelecida. Nos tratamentos T2 e T3 (Efluente: 322,2 mM e 670,0 mM; Lodo: 786,7 mM, 1609,4 mM, respectivamente) a amostragem foi realizada com intervalos de 48 h durante as duas primeiras semanas, seguida por amostragens semanais até que a curva de decaimento pudesse ser obtida. Os controles foram monitorados mensalmente frente aos mesmos parâmetros.

### **3.4 Cultivo celular, produção de estoque viral e ensaios de citotoxicidade amostral**

#### **3.4.1 Cultivo de células animais**

Foi utilizada a linhagem celular A549 (CCL-185), derivada de carcinoma de pulmão humano, permissivas à infecção pela maioria dos adenovírus humanos, obtida a partir da American Type Culture Collection (ATCC).

As células foram cultivadas em garrafas com área de crescimento de 75 cm<sup>2</sup>, utilizando Meio Mínimo Essencial Dulbecco (DMEM) com sais de Eagle's e com alta concentração de glicose (DMEM ↑glicose 1×) (Gibco®), suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de piruvato de sódio [100 mM].

### 3.4.2 Produção de estoque viral de HAdV-2

As células A549 foram cultivadas em garrafas, com filtros acoplados às tampas e área de crescimento de 75 cm<sup>2</sup>, em meio de crescimento/manutenção (DMEM 1×, suplementado com 5% de SFB e 1% de piruvato de piruvato de sódio [100 mM]) por 24 h até atingirem confluência e então foram lavadas duas vezes com solução tampão fosfato-salina (PBS 1×) e após, receberam 1 mL do inóculo de adenovírus humano sorotipo 2 (HAdV-2). Após uma hora de incubação para adsorção viral sob as condições padrão e com homogeneização em intervalos de 15 min, foi adicionado o meio de manutenção, previamente descrito.

As células foram observadas diariamente até apresentarem 80-100% de efeito citopático (ECP), caracterizado por células arredondadas e seu desprendimento da monocamada celular. Imediatamente, as células foram congeladas a -80°C e descongeladas a 25°C por três vezes, para que ocorresse o rompimento celular e os vírus que haviam permanecido na forma intracelular fossem liberados. A suspensão viral foi transferida para um tubo e centrifugada a 350 g por 5 min a 4°C para remoção das células rompidas. O sobrenadante foi utilizado para realizar novas infecções, com objetivo de elevar o título viral. Após algumas passagens, com a redução do período para o aparecimento do ECP caracterizando um aumento do título viral, o fluido viral foi titulado, alíquotado e estocado a -80°C.

Na determinação do título infeccioso viral do HAdV-2, foi utilizado o ensaio de cultura celular integrado (ICC) à RT-qPCR precedida por ensaio enzimático (et), segundo **Item 4.5**, para a titulação e viabilidade do vírus.

### 3.4.3 Ensaio de citotoxicidade amostral

Para determinar o grau de citotoxicidade das amostras, as células A549 foram cultivadas na densidade  $3,0 \times 10^5$  células/mL em placas de 24 poços, durante 24 h até atingirem confluência. No primeiro momento, foram realizadas diluições das amostras em MEM 1× (Minimum essential medium Eagle) nas seguintes proporções: 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e, em seguida a monocamada celular foi lavada com PBS 1×. Foram inoculados 150 µL das amostras nas respectivas diluições, em duplicata nas cavidades contento células cultivadas, permanecendo durante 60 min a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, com intervalos de 15 min para homogeneização

das amostras por agitação manual. O inóculo foi aspirado e o meio de manutenção (DMEM ↑glicose 1× suplementado com 2% de SFB, 2% de anfotericina B [0,025 µg/mL], 2% de antibióticos PSA [(penicilina G (100 U/mL), sulfato de estreptomicina (100 µg/mL)], 1% de piruvato de sódio [100 mM] e 5% de Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub> [25 mM]), foi adicionado.

Durante um período de sete dias, foram realizadas visualizações diárias em microscópio invertido a fim de verificar possíveis alterações morfológicas nas células. Após o período de incubação, o meio foi aspirado e o tapete celular fixado e corado com 150 µL do corante Cristal Violeta. Assim, foi possível determinar a diluição ideal das amostras para que o dano celular visualizado fosse decorrente da replicação viral e não devido à citotoxicidade das mesmas.

### **3.5 Enumeração de HAdV-2 infecciosos por meio de ICC-et-RT-qPCR**

Com objetivo de identificar e quantificar HAdV-2 infecciosos, tanto a partir da produção do estoque viral inicial, quanto HAdV-2 contidos nas amostras de dejetos de suínos avaliadas, o ensaio de cultura celular integrado (ICC) à RT-qPCR precedida por ensaio enzimático (et), sendo denominada de ICC-et-RT-qPCR foi utilizado, adaptado de Fongaro et al. (2013).

Resumidamente, células A549 foram cultivadas em placas de 24 cavidades na densidade de  $3,0 \times 10^5$  células/mL, com meio de manutenção (DMEM ↑glicose 1×, 5% SFB e 5% MgCl<sub>2</sub> [25 mM]). Após 24 h as células foram infectadas com as amostras de efluente e lodo tratados (ou por temperatura ou por amônia não-ionizada) em diluição não citotóxica (a partir de 1:64), com 2% de anfotericina B [250 µg/mL], 2% de antibióticos PSA [(penicilina G (100 U/mL), sulfato de estreptomicina (100 µg/mL) e anfotericina B (0,025µg/mL)].

As monocamadas celulares foram inoculadas com 150 µL de cada diluição amostral (amostras dos testes), bem como com os três controles de qualidade. Esses controles foram: 1) Controle celular: contendo apenas células e meio de manutenção, não-inoculadas com amostras, realizado para acompanhar a qualidade da monocamada celular e como um controle negativo do ensaio; 2) Controle negativo amostral: continha células inoculadas com amostras de efluente e lodo suinícola, igualmente diluídas (1:64), porém não inoculadas com HAdV-2, realizado como um controle

negativo amostral; 3) Controle positivo amostral: continha HAdV-2 inoculado no momento do teste, para inferir a capacidade de infecção de tais vírus na presença das matrizes testadas.

As placas foram incubadas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, durante 1 h e homogeneizadas a cada 15 min por rotação manual. Em seguida, o inóculo foi aspirado e 1 mL de meio de manutenção (DMEM ↑glicose 1×, 5% de MgCl<sub>2</sub> [25 mM], 5% SFB, 2% de anfotericina B [250 µg/mL], 2% de antibióticos PSA [(penicilina G (100 U/mL), sulfato de estreptomicina (100 µg/mL) e anfotericina B (0,025µg/mL)] (Cultilab) foi adicionado nas cavidades da placa, sendo esta re-incubada nas mesmas condições, durante 24 h (tempo estimado de 1 ciclo de replicação do HAdV-2).

Após o período de incubação, as células foram lavadas quatro vezes com PBS 1× e em seguida a suspensão celular foi removida com solução de tripsina. Após, o material genético foi tratado com 1 U de DNase I (Invitrogen), visando a degradação do DNA proveniente de vírus degradados e com genomas expostos. Posteriormente, a suspensão celular foi utilizada para a extração de ácido nucleico, utilizando o kit comercial RTP DNA/RNA Virus® Mini Kit II (Invitex), empregado segundo as instruções do fabricante. Posteriormente foi feita a reação de transcrição reversa seguida de qPCR (RT-qPCR) para quantificar os mRNA provenientes de vírus viáveis que estavam em processo de replicação intracelular, realizada de acordo com o **Item 3.5.2**.

### **3.5.1 Extração dos ácidos nucleicos totais**

O material genético foi extraído utilizando o kit comercial RTP DNA/RNA Virus® Mini Kit II Invitex, empregado segundo as instruções do fabricante. O método é baseado na retenção de DNA/RNA a uma matriz constituída de sílica que propicia a adsorção dos ácidos nucleicos.

Para a extração dos ácidos nucleicos, 200 µL da amostra foram utilizados, obtendo ao final o volume de 60 µL que continha o material genômico. Após a extração dos ácidos nucleicos as suspensões foram armazenadas à temperatura de -80° C.



### 3.5.2 Detecção de HAdV infecciosos por PCR em tempo real quantitativo (qPCR)

A reação de PCR quantitativa (qPCR) foi realizada utilizando o Kit Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), a fim de quantificar o genoma dos HAdV-2 presentes nas amostras. À Master Mix foram adicionados a sonda (ADP1 (5' – FAM – CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCCT – TAMRA)) e os iniciadores específicos para o vírus (ADF (5' CWTACATGCACATCKCSGG 3') e ADR (5' CRCGGGCRAAYTGCACCAG 3')), de acordo com Hernroth et al., (2002) . Todas as reações foram realizadas em duplicata na plataforma StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Para gerar a curva padrão foi utilizado o plasmídeo pBR322 contendo um fragmento do gene *hexon* do adenovírus humano-2. Como controle, foram introduzidos no mínimo 3 controles negativos e 1 controle positivo com quantidades conhecidas de genomas de HAdV.

### 3.6 Análises estatísticas

A análise não paramétrica de variância (Kruskal–Wallis - Statistic 7.0) foi utilizada para avaliar diferenças significativas entre as amostragens quanto aos parâmetros físico-químicos.

Os coeficientes de inativação dos patógenos avaliados foram determinados para todas as temperaturas em regressão linear – escala log-linear, sempre a partir do término da fase lag. (sem observação de inativação significativa), de acordo com um decaimento de primeira ordem (*software* utilizado foi o Excel).

Teste de correlação de *Pearson*, teste de regressão linear, ANOVA e Student's t-test foram realizados, quando necessário usando GraphPad Prism 5.0 (USA).

As análises foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p \leq 0.05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Higienização por temperatura

#### 4.1.1 Análises físico-químicas

A **Tabela 1** resume os resultados quanto aos parâmetros físico-químicos das amostras de efluente e lodo submetidas às diferentes temperaturas, durante os 120 dias de experimento. As análises estatísticas dos dados não apontaram diferenças significativas nas médias gerais dos diferentes tratamentos, quanto aos parâmetros avaliados ( $p > 0,05$ ).

Foram realizadas três amostragens para avaliação ( $n=3$ ), sendo uma no início, no meio e no final do experimento, onde pode-se afirmar que não houve variação ao longo do experimento.

Observou-se para as quatro temperaturas testadas a estabilidade do pH para ambas matrizes testadas, entretanto, uma alta concentração de nitrogênio amoniacal total (NAT) e sólidos totais (ST) foi observada para o lodo.

**Tabela 1.** Resultados dos parâmetros físico-químicos das amostras de efluente e lodo.

Parâmetro avaliado	16°C		22°C		37°C		55°C	
	Média ± DP		Média ± DP		Média ± DP		Média ± DP	
	Efluente	Lodo	Efluente	Lodo	Efluente	Lodo	Efluente	Lodo
pH	7,3 ± 0,3	7,1 ± 0,2	7,3 ± 0,3	7,1 ± 0,2	7,3 ± 0,9	7,1 ± 0,7	7,6 ± 0,4	7,4 ± 0,2
TA (°C)	16,8 ± 1,2	16,3 ± 1,8	23,3 ± 1,4	23,1 ± 1,1	37,5 ± 0,8	37,5 ± 1,3	55,3 ± 1,8	55,6 ± 1,2
NAT (mg.L <sup>-1</sup> )	1973 ± 244	3104 ± 12085	1732 ± 284	3221 ± 925	1480 ± 421	3630 ± 1713	1180 ± 121	2156 ± 713
ST (mg.L <sup>-1</sup> )	5419 ± 5,2	32210 ± 1776	5221 ± 534	31600 ± 11976	5760 ± 457	30190 ± 1736	5760 ± 540	31210 ± 1328

TA: Temperatura da amostra; NAT: Nitrogênio amoniacal total; ST: Sólidos totais

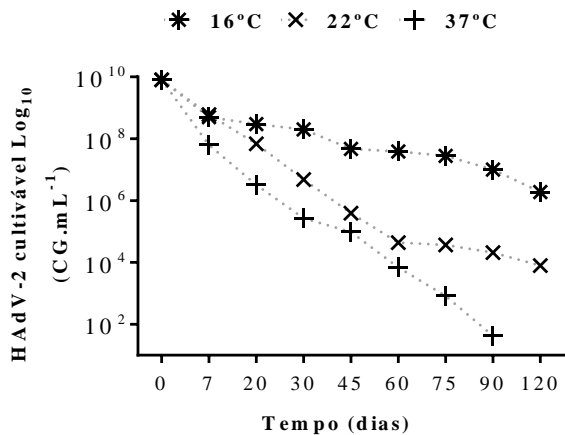
O HAdV-2 no efluente mostrou-se estável na temperatura 16°C por até 90 dias, havendo 2,0log<sub>10</sub> de decaimento, sendo este significativo nos tempos 90 e 120 dias, com tendência linear de decaimento ( $r^2 = 0,82$ ); nas temperaturas 22 e 37°C houve decaimento a partir de 30 dias de estocagem, com tendência linear ( $r^2 = 0,85$ ) e decaimento superior a 3,0log<sub>10</sub> (**Figura 7-a**).

Nas amostras de lodo, o HAdV-2 mostrou-se menos estável que no efluente. Quando sujeito à temperatura de 16°C, HAdV-2 mostrou-se estável até 60 dias, havendo 2,0log<sub>10</sub> de decaimento, sendo este

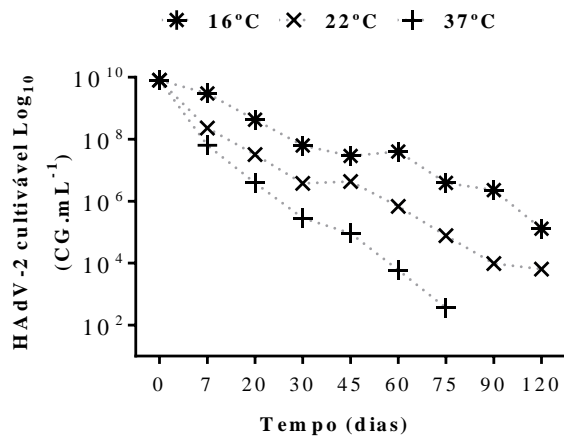
significativo com tendência linear ( $r^2 = 0,91$ ); nas temperaturas de 22 e 37°C houve decaimento significativo a partir de 30 e 20 dias, respectivamente, sendo este decaimento superior a  $2,5\log_{10}$  e também com tendência linear ( $r^2 = 0,89$ ) (**Figura 7-b**).

**Figura 7.** Estabilidade térmica de HAdV-2 em função da temperatura em (a) Efluente e (b) Lodo suinícola nas temperaturas 16, 22 e 37°C.

**(a) Efluente**

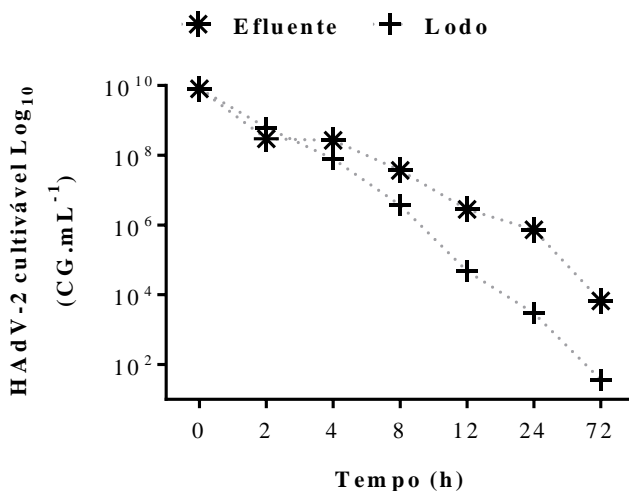


**(b) Lodo**



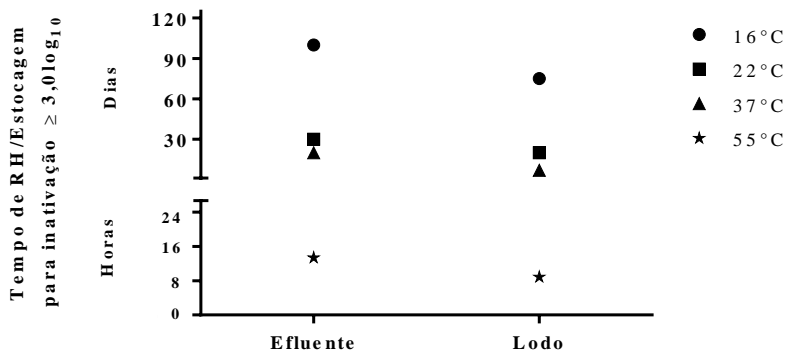
O HAdV-2, quando submetido à temperatura de 55°C, foi inativado, sendo considerado, no modelo linear ( $r^2 = 0,92$ ), que 12 h foi o tempo necessário para reduzir  $4,0\log_{10}$  virais (99,99%) no lodo, e 24 h para promover a inativação de  $4,0\log_{10}$  no efluente suíno, como mostrado na **Figura 8**.

**Figura 8.** Estabilidade térmica do HAdV-2 em função do tempo em Efluente e Lodo suínico sob temperatura de 55°C.



O tempo para a inativação de  $3,0\log_{10}$  de HAdV-2 em efluente e lodo suíno quando submetidos à temperatura de 16°C foram 100 e 70 dias, respectivamente; para a temperatura de 22°C foram necessários 30 e 20 dias para efluente e lodo, respectivamente; a 37°C foram necessários 20 e 7 dias, para efluente e lodo; para 55°C foram necessárias 12 h para efluente e 24 h o lodo, como mostrado na **Figura 9**.

**Figura 9.** Tempo de retenção hidráulica necessário para inativação de  $\geq 3,0 \log_{10}$  de HAdV-2 em efluente e lodo suinícola, nas temperaturas de 16, 22, 37 e 55°C.



## 4.2 Desinfecção por meio de amônia não-ionizada

### 4.2.1 Análises físico-química

Após a adição da ureia as amostras foram monitoradas por 48 h quanto ao seu pH, sendo que as concentrações de ureia foram determinadas como suficientes quando um pH mínimo de 8,9 foi atingido, em diferentes concentrações que foram testadas deste aditivo em lodo e efluente suinícola de biodigestor anaeróbio.

A elevação da concentração de  $\text{NH}_3$  é diretamente influenciada pela temperatura e pH e essas medidas foram tomadas ao longo de 120 dias (4 meses) de análises ( $n=8$ ).

As médias gerais de concentração de amônia total, temperatura da amostra e pH atingido nas respectivas concentrações de ureia em efluente e lodo estão apresentadas na **Tabela 2**, permitindo calcular a concentração de  $\text{NH}_3$  disponível nas amostras, segundo as equações propostas por Emerson et al. (1975):

$$pka = \frac{2729,92}{(T + 0,090181)}$$

$$f(NH_3) = \frac{1}{(10^{pka} - pH + 1)}$$

Observou-se que para os controles (sem adição de ureia), o pH manteve-se em cerca de 7,0, enquanto para os tratamentos (com adição de ureia) o pH obtido foi > 8,9, o qual favoreceu positivamente a obtenção de NH<sub>3</sub>.

**Tabela 2.** Média dos parâmetros físico-químico avaliados nas amostragens de efluente e lodo suinícola, frente aos percentuais de ureia adicionada nas amostras e seus respectivos valores de temperatura, pH, amônia total, NH<sub>3</sub> ao final de 120 dias de estocagem.

Efluente				
Ureia (%)	Amônia Total (mg.L <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	pH	NH <sub>3</sub> (mM)
0,00	2927 ± 569	23 ± 0,90	7,3 ± 0,27	2,2 ± 33,52
4,00	8175 ± 1060	23 ± 0,90	9,0 ± 0,09	171,7 ± 179,70
8,00	13437 ± 3047	23 ± 0,83	9,1 ± 0,21	322,2 ± 213,60
12,00	24837 ± 2111	23 ± 0,96	9,2 ± 0,19	670,0 ± 168,70
Lodo				
Ureia (%)	Amônia Total (mg.L <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	pH	NH <sub>3</sub> (mM)
0,00	6440 ± 1922	23 ± 0,73	7,2 ± 0,02	3,3 ± 146,41
8,00	20483 ± 5330	23 ± 1,00	9,1 ± 0,07	370,5 ± 328,60
16,00	28440 ± 7723	23 ± 0,91	9,2 ± 0,05	786,7 ± 403,47
32,00	52325 ± 8135	23 ± 0,70	9,3 ± 0,17	1609,4 ± 532,40

No efluente, HAdV-2 foi inativado significativamente após 15 dias de tratamento nas concentrações de NH<sub>3</sub> de 171,7 mM e 322,2 mM, com reduções de 3,6 e 4,0log<sub>10</sub>, respectivamente. Na concentração de 670,0 mM de NH<sub>3</sub>, o HAdV-2 reduziu significativamente após 9 dias de tratamento 3,0log<sub>10</sub>, como mostrado na **Figura 10a**.

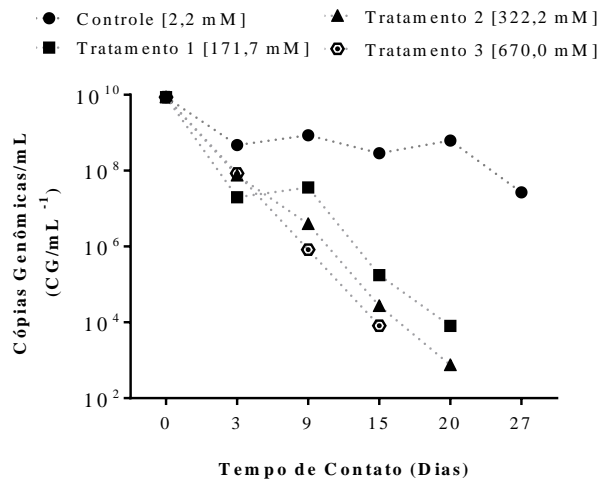
No lodo biodigerido, HAdV-2 foi inativado significativamente após 9 dias, nas concentrações de 370,5 mM e 786,7 mM de NH<sub>3</sub>, atingindo reduções de 3,5 e 4,0log<sub>10</sub>, respectivamente. Utilizando a concentração de 1609,4 mM de NH<sub>3</sub>, HAdV-2 decaiu 3,0log<sub>10</sub> em 3 dias,

como mostrado na **Figura 10b**. Todas as reduções se ajustaram ao modelo linear com variação de  $r^2 = 0,82 - 0,98$ .

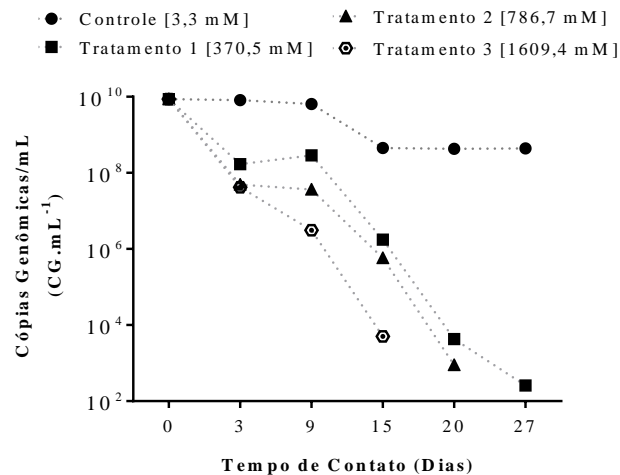


**Figura 10.** Perfil de desinfecção de efluente e lodo HAdV-2 frente aos tratamentos baseados na elevação de  $\text{NH}_3$ .

**(a) Efluente**

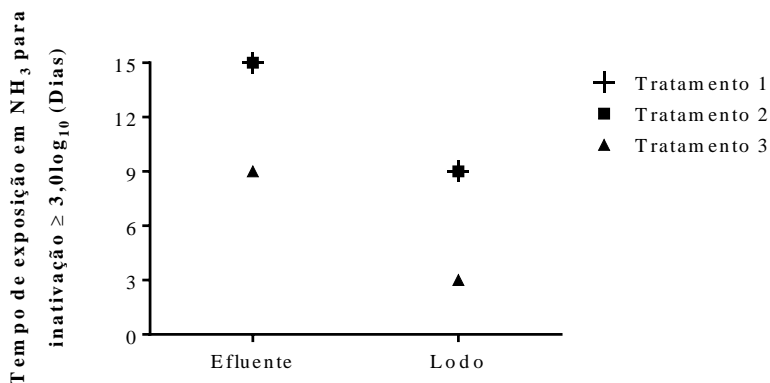


**(b) Lodo**



O tempo para a inativação de  $3,0\log_{10}$  de HAdV-2 em efluente e lodo suíno frente exposição à  $\text{NH}_3$  quando submetidos ao Tratamento 1 foi de 15 e 9 dias, respectivamente; Para o Tratamento 2 foram necessários 15 e 9 dias para efluente e lodo, respectivamente; E para o Tratamento 3 foram necessários 9 e 3 dias para efluente e lodo, respectivamente, como apresentado na **Figura 11**.

**Figura 11.** Tempo necessário de exposição à amônia não-ionizada para a inativação de  $\geq 3,0\log_{10}$  de HAdV-2 em efluente e lodo suínico.



## 5 DISCUSSÃO

A suinocultura no Brasil envolve tanto a produção intensiva quanto a familiar, gerando grande quantidade de dejetos todos os anos. Estes dejetos são despejados deliberadamente em rios/lagoas de forma clandestina, ou usados na agricultura sem qualquer controle prévio de sua segurança sanitária. Deste modo, causam impactos ambientais severos, prejudicando a saúde pública humana e animal, bem como a economia do país (FONGARO et al., 2014).

Não há atualmente uma legislação nacional brasileira que padronize e tome providências sobre o uso dos efluentes animais como fertilizantes na agricultura, o que pode contribuir para a disseminação de diversos patógenos entéricos. Os dejetos animais possuem uma carga variada de patógenos entéricos, como bactérias, protozoários, helmintos e vírus, os quais podem ser encontrados nas mais diversas matrizes ambientais, desde água para consumo até dejetos animais utilizados diretamente na agricultura. Dentre estes patógenos, destacam-se os zoonóticos, responsáveis pela transmissão de doenças entre animais e humanos, onde os animais figuram como os hospedeiros obrigatórios, participando na manutenção do ciclo do patógeno, e o homem como hospedeiro acidental (ACHA; SZYFRES, 2001; CARDOSO, 2009).

As zoonoses são muitas vezes confundidas com doenças que afetam humanos e animais, no entanto para ser classificada como tal, o hospedeiro inicial deve participar ativamente na manutenção do ciclo do patógeno. Assim, Cardoso (2009) classificou as zoonoses conforme a sua forma de transmissão, podendo ser: a) Zoonoses transmitidas de maneira indireta, a partir da ingestão dos alimentos, estas, causando grande impacto na saúde pública e na economia do país, uma vez que coloca em risco todas as pessoas que consomem o alimento e, b) Zoonoses transmitidas de maneira direta, onde o animal entra em contato com o patógeno na fonte de contaminação.

Os biodigestores anaeróbios, desenvolvidos para a geração de energia também estabilizam os dejetos animais e podem contribuir na desinfecção dos mesmos dependendo da sua temperatura de atuação e eficiência, já que as temperaturas são determinantes na digestão da biomassa frente aos microrganismos anaeróbios e metanogênicos (CHEN; CHENG; CREAMER, 2008). No presente estudo HAdV-2

foi utilizado como patógeno entérico modelo para inferir a eficiência de higienização e desinfecção de efluentes e lodos suinícolas. Os adenovírus humanos são considerados um dos patógenos entéricos mais resistentes quando presentes no ambiente (MORESCO et al., 2012; RODRIGUEZ-MANZANO et al., 2014), sendo os HAdV-2 passíveis de cultivo *in vitro* e enumeração. No presente estudo a técnica de ICC-et-RT-qPCR foi utilizada para enumerar HAdV-2 infecciosos. Esse método é considerado seguro e acurado, pois consiste na quantificação dos vírus infecciosos, uma vez que amplifica os mRNA virais transcritos durante a etapa de replicação do vírus no interior da célula. A inativação de HAdV-2 foi avaliada através de um experimento conduzido em escala laboratorial mimetizando as temperaturas de operação dos biodigestores, a fim de avaliar a estabilidade térmica viral e extrapolar esses dados para os demais patógenos entéricos, já que o HAdV-2 constitui um modelo aceitável desses. Os resultados mostraram que o HAdV-2 permaneceu estável em condições naturais e mesofílicas (**Figura 7a-b**), sendo necessário um pós-tratamento dos efluentes e lodos processados em BA nessas condições, visto que o HAdV-2 manteve-se estável por um longo período de tempo atingindo  $4,0\log_{10}$  de decaimento somente entre 60 e 120 dias para o efluente e 30 e 120 dias para o lodo, sendo esses tempos superiores ao tempo de retenção hidráulica (RH) usualmente adotados que variam entre 30-40 dias (EMBRAPA – SUÍNOS E AVES, 2003). Todavia, na temperatura de 55°C (**Figura 8**), o HAdV-2 foi eficientemente inativado, tendo alcançado  $4,0\log_{10}$  de decaimento em 24 h para o efluente e 12 h para o lodo.

Considerando a inativação de patógenos entéricos virais, aqui representado pelo HAdV-2, recomenda-se que o tempo de retenção hidráulica (RH) de dejetos suínos em BA variem de acordo com a temperatura de atuação dos mesmos. Em condições naturais no inverno, é necessário um pós-tratamento dos efluentes e lodos suinícolas para seu reciclo mais seguro, no entanto, no verão recomenda-se uma RH de 30 dias sendo que em mesofilia recomenda-se uma RH de 20 dias e em termofilia uma RH mínima de 24 h.

A relativa resistência do adenovírus frente a temperaturas ambiente e moderadamente elevadas pode ser devida à ausência de envelope lipoproteico e ao seu genoma de DNA dupla fita, o qual pode utilizar enzimas presentes na célula hospedeira infectada para o reparo de danos no seu genoma (GERBA; NWACHUKU; RILEY, 2003). Todavia, quando submetido à temperaturas superiores a 50°C, ocorre uma rápida

inativação, observada neste estudo e em Maheshwari et al. (2004), o qual relatou uma inativação significativa de  $4,0 \log_{10}$  de decaimento do HAdV-5 em 10 min quando em temperatura de 50°C, sendo esta inativação relacionada a danos no capsídeo viral por meio da degradação proteica, impedindo a infecção (BERTRAND et al., 2012; VERHAELLEN et al., 2012; CARRATALÀ et al., 2013). No entanto, para manter a biomassa em temperaturas superiores às ambientais, como em mesofilia e termofilia, é requerida uma demanda energética, o que encarece o sistema e aumenta o custo-benefício para a sua implantação. Assim, o uso de BAs em temperaturas naturais pode ser uma alternativa atraente para a produção de energia, porém, para um reciclo agrícola seguro do efluente e lodo gerado no processo, recomenda-se a desinfecção posterior ao processo de biodigestão anaeróbia.

Do mesmo modo, a produção de biogás nos BAs é afetada de maneira indireta pela temperatura, uma vez que pode contribuir para o crescimento de microrganismos metanogênicos, bem como inativá-los. Angelidaki e Ahring (1994) e Hansen; Angelidaki e Ahring (1999) observaram uma diminuição da produção de biogás em BAs termofílicos, todavia, em BAs mesofílicos a produção era incrementada. Isto deve-se ao fato que em temperaturas acima de 55°C, ocorre a inativação de microrganismos por  $\text{NH}_3$ , devido ao aumento da concentração deste agente, favorecido pelo aumento da temperatura.

Como tratamento alternativo pós-biodigestão em temperaturas naturais, foram conduzidos, em escala laboratorial, testes de desinfecção de efluentes e lodo suinícolas digeridos, utilizando a amônia não-ionizada gerada como agente biocida, obtendo-se tal condição por adição de ureia nessas matrizes.

A amônia não-ionizada tem sido amplamente reportada como eficiente na desinfecção de fezes humanas, lodos de esgoto e resíduos biológicos industriais (EMMOTH et al., 2011; MAGRI et al., 2015). A reação de conversão de  $\text{NH}_4^+$  em  $\text{NH}_3$  depende diretamente de um pH alcalino, obtido no presente trabalho por meio da adição de ureia. A ureia disponível é solubilizada nos efluentes e lodos e em contato com ureases presentes naturalmente nos dejetos é hidrolisada gerando um meio alcalino e biocida pela ação de  $\text{NH}_3$ , com concentrações variáveis em função da temperatura e pH (PECSON et al., 2007).

Os resultados apontaram que o HAdV-2, quando submetido ao tratamento com  $\text{NH}_3$  (**Figura 10a-b**), foi rapidamente inativado após 15 e 20 dias no lodo e efluente, respectivamente, mostrando-se susceptível

em todos os tratamentos utilizados, considerando os controles não tratados. Também se pode observar uma relação de dose dependente, sendo que, quanto maior a concentração de  $\text{NH}_3$ , mais rapidamente o HAdV-2 foi inativado. Esses resultados corroboram com os dados de PECSON et al. (2007) que também observou essa relação quando estudou os efeitos de  $\text{NH}_3$  frente aos ovos *Ascaris suum*, o qual utilizou concentrações de 1000 mM e 5000 mM de  $\text{NH}_3$ .

A eficiência biocida do  $\text{NH}_3$  vem sendo amplamente estudada e comprovada nas diversas classes de microrganismos, no entanto, não há estudos que demonstrem o mecanismo de inativação deste composto em vírus. Ward (1978) foi um dos precursores quanto a utilização da amônia não-ionizada como biocida para vírus entéricos, onde utilizou o Poliovírus, genoma RNA simples fita, sugerindo que a inativação ocorreria a nível de genoma, decorrida da clivagem do material genético. Decrey et al. (2015) utilizaram o bacteriófago MS2, com genoma RNA simples fita, para avaliar sua inativação frente à exposição a  $\text{NH}_3$ , utilizando concentrações variando entre 0-160 mM de  $\text{NH}_3$ . Observaram a perda da infecciosidade, sugerindo que a inativação ocorre devido a uma transesterificação alcalina. Em microrganismos com genoma constituído por RNA, o grupo hidroxila presente no carbono 2 ( $\text{C}_2\text{-OH}$ ) está próximo à ligação fosfodiéster (característica que confere instabilidade ao RNA). Desta maneira, a presença do oxigênio próximo a esta ligação, permite ser atacado por bases fortes, levando à clivagem do material genético. Entretanto, não há estudos quanto à adsorção e penetração viral, avaliando a inativação em nível de capsídeo e genoma, bem como estudos que avaliem vírus com genoma DNA dupla fita.

Estudos utilizando outros patógenos entéricos, como *Salmonella enterica* Typhimurium, bacteriófago PhiX-174 e ovos de *Ascaris lumbricoides*, utilizando concentrações de  $\text{NH}_3$  variando entre 160-370 mM, mostraram que a bactéria foi rapidamente inativada, todavia, PhiX-174 e ovos de *Ascaris lumbricoides* mostraram-se resistentes por um período maior, frente aos tratamentos com  $\text{NH}_3$ , necessitando de um período maior de exposição (DECREY et al., 2015; MAGRI et al., 2015).

A regulamentação nº1774 de 2002 da União Europeia, exige a redução de infecciosidade de vírus termorresistentes em pelo menos  $3,0\log_{10}$  para processos térmicos e químicos. Neste estudo, quanto aos tratamentos térmicos (**Figura 9**), HAdV-2 teve decaimento  $\geq 3,0\log_{10}$  variando entre 100 e 7 dias para condições naturais e mesofílicas. Entretanto, quando em condições termofílicas, foi rapidamente inativado

após 12 h. No processo químico, configurado aqui pela exposição a  $\text{NH}_3$  (**Figura 11**), a redução  $\geq 3,0 \log_{10}$  de HAdV-2 foi obtida variando entre 3 a 15 dias para ambas as matrizes avaliadas. Deste modo, a infecciosidade viral é significativamente reduzida na presença de altas concentrações de  $\text{NH}_3$ , obtendo 99,9% de inativação de HAdV-2 presente no efluente e lodo pós-biodigestão anaeróbia, demonstrando a eficiência do processo de desinfecção aqui proposto.

Cabe ressaltar que a amônia não-ionizada é considerada tóxica (ANDERSON; STRADER; DAVIDSON, 2003; ANEJA et al., 2008; BEHERA et al., 2013). A presença do íon amônio nos dejetos, leva à acidificação dos solos e ambientes aquáticos, podendo ocasionar eutrofização e agravamento ambiental (WALKER; ANEJA; DICKEY, 2000). Nesse sentido o reciclo agrícola de resíduos com alto teor de  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  deve considerar os aspectos agronômicos do solo, águas e cultura vegetal que demandem altas concentrações da mesma, como no caso de cultivos de milho, cana-de-açúcar, soja e trigo (FONTOURA; BAYER, 2009); EMBRAPA – MILHO E SORGO, 2015). Ainda assim, a aplicação do fertilizante em camadas de média profundidade ao invés de faixas superficiais reduz significativamente os impactos por volatilização de  $\text{NH}_3$  (RODHE; PELL; YAMULKI, 2006; OTTOSON; SCHNÜRER; VINNERÅS, 2008).

Explica-se, nos aspectos agronômicos que o pH do fertilizante é ligeiramente alcalino (acerca de pH 8,0), permitindo que  $\text{NH}_3$  volte à forma de  $\text{NH}_4^+$  e então utilizado para o desenvolvimento vegetal (CRUZ; PELACANI; ARAÚJO, 2004). Os fertilizantes nitrogenados são utilizados em grande parte para impulsionar a produção de alimentos, principalmente em lavouras que demandem maior consumo desses macronutrientes, como soja, milho e cana-de-açúcar, uma vez que aumentam a biodiversidade do solo com microrganismos que contribuem para o crescimento da planta, bem como é necessário para a formação de algumas estruturas do vegetal (BENTO, 1997). Quanto ao uso de fertilizantes, atualmente o Brasil importa cerca de 50% dos utilizados nas culturas típicas (nitrogênio, fósforo e potássio), caracterizados por adubos químicos e fonte não renovável (ANDA, 2015). Neste sentido, a produção de fertilizantes que reciclem biomassa da produção de suínos é promissora, reduzindo custos de importação, bem como a dependência brasileira por adubos químicos e reciclando a biomassa suinícola, nesse caso, de forma segura em um ciclo sustentável.

## 6 SUMÁRIO DE RESULTADOS

### 6.1 Quanto à estabilidade térmica viral:

- ❖ Em condições de temperaturas naturais no inverno (16°C) HAdV-2 obteve  $\geq 3,0\log_{10}$  de inativação em efluente e lodo suíno em 100 e 70 dias, respectivamente;
- ❖ Em condições de temperaturas naturais no verão (22°C) HAdV-2 obteve  $\geq 3,0\log_{10}$  de inativação em efluente e lodo suíno em 30 e 20 dias, respectivamente;
- ❖ Em condições mesofílicas (37°C) HAdV-2 obteve  $\geq 3,0\log_{10}$  de inativação em efluente e lodo suíno em 20 e 7 dias, respectivamente;
- ❖ Em condições termofílicas (55°C) HAdV-2 obteve  $\geq 3,0\log_{10}$  de inativação em efluente e lodo suíno em 12 e 24 h, respectivamente.

### 6.2 Quanto à desinfecção por amônia não-ionizada

- ❖ Para o Tratamento 1 (Efluente: 171,7 mM de  $\text{NH}_3$ ; Lodo: 370,5 mM de  $\text{NH}_3$ ) HAdV-2 obteve  $\geq 3,0\log_{10}$  de inativação em efluente e lodo em 15 e 9 dias, respectivamente;
- ❖ Para o Tratamento 2 (Efluente: 322,2 mM de  $\text{NH}_3$ ; Lodo: 786,7 mM de  $\text{NH}_3$ ) HAdV-2 obteve  $\geq 3,0\log_{10}$  de inativação em efluente e lodo em 15 e 9 dias;
- ❖ Para o Tratamento 3 (Efluente: 670,0 mM de  $\text{NH}_3$ ; Lodo: 1609,4 mM de  $\text{NH}_3$ ) HAdV-2 obteve  $\geq 3,0\log_{10}$  de inativação em efluente e lodo em 9 e 3 dias, respectivamente.



## 7 CONCLUSÃO

A biodigestão anaeróbia em condições mesofílicas e termofílicas é indicada na redução de patógenos entéricos, porém demandam gastos energéticos para o aquecimento e manutenção da biomassa. As condições termofílicas podem afetar negativamente a produção de biogás, posto que também ocorrerá a inativação dos microrganismos metanogênicos.

Os BAs no Brasil que atuam entre 16-22°C (temperaturas naturais), permitem a estabilização de dejetos suínos, geram biogás sem gasto energético, uma vez que não necessitam de energia para o aquecimento da biomassa, porém estas condições não foram eficientes na higienização de efluentes e lodos suínos. Deste modo, recomenda-se o tratamento destes subprodutos, pós-biodigestão anaeróbia, sendo o uso de amônia não-ionizada promissor na inativação de HAdV-2, o que possibilita gerar biofertilizantes sanitariamente seguros.

## 8 PERSPECTIVAS

São perspectivas deste trabalho:

1. Realizar estudos agronômicos em relação aos fertilizantes produzidos a partir dos digestato suínos;
2. Otimizar os tratamentos com ureia, utilizando menores concentrações desse mineral;
3. Elucidar o mecanismo de inativação da amônia não-ionizada em patógenos virais com genoma DNA simples fita, dupla fita e fita circular, visto que não há estudos que comprovem o local de ação da inativação desse biocida em vírus de genoma DNA;
4. Realizar análise quantitativa de risco microbiológico no reciclo do digestato tratado.

## REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals**. 3. Scientific and Technical Publication: Pan American Health Organization, 2001.
- ADU-GYAMFI, N.; RAVELLA, S. R.; HOBBS, P. J. Optimizing anaerobic digestion by selection of the immobilizing surface for enhanced methane production. **Bioresource technology**, v. 120, p. 248-255, 2012.
- AHMED, W.; HARWOOD, V. J.; GYAWALI, P.; SIDHU, J. P.; TOZE, S. Comparison of concentration methods for quantitative detection of sewage-associated viral markers in environmental waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 6, p. 2042-2049, 2015.
- ALBURQUERQUE, J. A.; DE LA FUENTE, C.; FERRER-COSTA, A.; CARRASCO, L.; CEGARRA, J.; ABAD, M., BERNAL, M.P. Assessment of the fertiliser potential of digestates from farm and agroindustrial residues. **Biomass and Bioenergy**, v. 40, p. 181-189, 2012.
- ANDA - Associação Nacional para Difusão de Adubos. **Principais indicadores do setor de fertilizantes**. 2015. Disponível em: <<http://www.anda.org.br/index.php?mpg=03.00.00>>. Acessado em: 16 de novembro de 2015.
- ANDERSON, N.; STRADER, R.; DAVIDSON, C. Airborne reduced nitrogen: ammonia emissions from agriculture and other sources. **Environment International**, v. 29, n. 2-3, p. 277-286, 2003.
- ANEJA, V. P.; ARYA, S. P.; RUMSEY, I. C.; KIM, D. S.; BAJWA, K.; ARKINSON, H. L.; SEMUNEGUS, H.; DICKEY, D. A.; STEFANSKI, L. A.; TODD, L.; MOTTUS, K.; ROBARGE, W. P.; WILLIAMS, C. M. Characterizing ammonia emissions from swine farms in eastern North Carolina: part 2--potential environmentally superior technologies for waste treatment. **Journal of the Air & Waste Management Association**, v. 58, n. 9, p. 1145-1157, 2008.

ANGELIDAKI, I.; AHRING, B. K. Anaerobic thermophilic digestion of manure at different ammonia loads: Effect of temperature. **Water Research**, v. 28, n. 3, p. 727-731, 1994.

APHA – American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22. ed. Washington, Dc: American Public Health Association, 2012. 1000 p.

ARTHURS, C. E.; JARVIS, G. N.; RUSSELL, J. B. The effect of various carbonate sources on the survival of Escherichia coli in dairy cattle manure. **Current Microbiology** v. 43, p. 220–224, 2001.

ASTALS, S.; ARISO, M.; GALÍ, A.; MATA-ALVAREZ, J. Co-digestion of pig manure and glycerine: Experimental and modelling study. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 4, p. 1091-1096, 2011.

ASTALS, S.; NOLLA-ARDÈVOL, V.; MATA-ALVAREZ, J. Thermophilic co-digestion of pig manure and crude glycerol: Process performance and digestate stability. **Journal of Biotechnology**, v. 166, n. 3, p. 97-104, 2013.

BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks – An update 2004–2010. **Water Research**, v. 45, n. 20, p. 6603-6614, 2011.

BEHERA, S. N.; SHARMA, M.; ANEJA, V. P.; BALASUBRAMANIAN, R. Ammonia in the atmosphere: a review on emission sources, atmospheric chemistry and deposition on terrestrial bodies. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 20, n. 11, p. 8092-8131, 2013.

BELLI-FILHO, P. **Stockage et odeurs des dejections animales cas du lisier de porc**. 1995. 181 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química industrial e ambiental, L'université de Rennes I, France, 1995.

BENTO, M. M. **Fontes de matéria orgânica na composição de substratos para a produção de mudas micorrizadas de**

**maracujazeiro**. 1997. 59f. (Dissertação de Mestrado) – ESALQ, Piracicaba, 1997.

BERTRAND, I.; SCHIJVEN, J. F.; SANCHEZ, G.; WYN-JONES, P.; OTTOSON, J.; MORIN, T.; MUSCILLO, M.; VERANI, M.; NASSER, A.; DE RODA HUSMAN, A. M.; MYRMEL, M.; SELLWOOD, J.; COOK, N.; GANTZER, C. The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 6, p. 1059-7104, 2012.

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

BOUDAUD, N.; MACHINAL, C.; DAVID, F.; FRÉVAL-LE BOURDONNEC, A.; JOSSENT, J.; BAKANGA, F.; ARNAL, C.; JAFFREZIC, M. P.; OBERTI, S.; GANTZER, C. Removal of MS2, Q $\beta$  and GA bacteriophages during drinking water treatment at pilot scale. **Water Research**, v. 46, n. 8, p. 2651-2664, 2012.

BOUQUET, J.; TESSÉ, S.; LUNAZZI, A.; ELOIT, M.; ROSE, N.; NICAND, E.; PAVIO, N. Close Similarity between Sequences of Hepatitis E Virus Recovered from Humans and Swine, France, 2008–2009. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. 2018-2025, 2011.

BOZKURT, H.; D'SOUZA, D. H.; DAVIDSON, P. M. Thermal inactivation kinetics of hepatitis A virus in homogenized clam meat (Mercenaria mercenaria). **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 834-844, 2015.

BRASIL. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 357 de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasília, DF: Diário Oficial da União, 17 de mar. 2005.

BRASIL. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 430 de 13 de maio de 2011.** Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Brasília, DF: Diário Oficial da União, 13 de mai. 2011.

BROWN, D.; SHI, J.; LI, Y. Comparison of solid-state to liquid anaerobic digestion of lignocellulosic feedstocks for biogas production. **Bioresource Technology**, v. 124, n. 0, p. 379-386, 2012.

BRUUN, T.; SORENSEN, G.; FORSHELL, L. P.; JENSEN, T.; NYGARD, K.; KAPPERUD, G.; LINDSTEDT, B. A.; BERGLUND, T.; WINGSTRAND, A.; PETERSEN, R. F.; MULLER, L.; KJELSO, C.; IVARSSON, S.; HJERTQVIST, M.; LOFDAHL, S.; ETHELBERG, S. An outbreak of Salmonella Typhimurium infections in Denmark, Norway and Sweden, 2008. **Euro Surveillance**, v. 14, n. 10, p. 19147-19152, 2009.

CARDOSO, M. O que representam os suínos na transmissão de zoonoses para humanos? **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 1, p. 81-89, 2009.

CARRATALÀ, A.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; HUNDESA, A.; RUSIÑOL, M.; FRESNO, S.; COOK, N.; GIRONES, R. Effect of temperature and sunlight on the stability of human adenoviruses and MS2 as fecal contaminants on fresh produce surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v. 164, n. 2–3, p. 128-134, 2013.

CASTANHO, D. S. **Biodigestores**. 2008. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/chines1\\_000g7gph0mm02wx5ok0wtedt3q5rn9mk.pdf](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/chines1_000g7gph0mm02wx5ok0wtedt3q5rn9mk.pdf)>. Acesso em: 03 de agosto de 2015.

CHEN, Y.; CHENG, J. J.; CREAMER, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4044-4064, 2008.

CHOWDHURY, R. B. S.; FULFORD, D. J. Batch and semi-continuous anaerobic digestion systems. **Renewable Energy**, v. 2, n. 4–5, p. 391-400, 1992.

COLLINS, P. J.; MARTELLA, V.; SLEATOR, R. D.; FANNING, S.; O'SHEA, H. Detection and characterisation of group A rotavirus in asymptomatic piglets in southern Ireland. **Archives of Virology**, v. 155, n. 8, p. 1247-1259, 2010.

COSTANTINI, V. P.; AZEVEDO, A. C.; LI, X.; WILLIAMS, M. C.; MICHEL, F. C.; SAIF, L. J. Effects of different animal waste treatment technologies on detection and viability of porcine enteric viruses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5284-5291, 2007.

CQFS-RS/SC - **Manual de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 2004. Disponível em: <[http://www.sbcs-nrs.org.br/docs/manual\\_de\\_adubacao\\_2004-versao\\_internet.pdf](http://www.sbcs-nrs.org.br/docs/manual_de_adubacao_2004-versao_internet.pdf)>. Acesso em: 20 de outubro de 2015.

CRUZ, J. L.; PELACANI, C. R.; ARAÚJO, W. L. Relações biométricas de mandioca cultivada com variada disponibilidade de nitrogênio. **Revista Científica Rural**, v. 9, p. 131-140, 2004.

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

DEBOOSERE, N.; PINON, A.; CAUDRELIER, Y.; DELOBEL, A.; MERLE, G.; PERELLE, S.; TEMMAM, S.; LOUTREUL, J.; MORIN, T.; ESTIENNEY, M.; BELLIOU, G.; POTHIER, P.; GANTZER, C.; VIALETTE, M. Adhesion of human pathogenic enteric viruses and surrogate viruses to inert and vegetal food surfaces. **Food Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 48-56, 2012.

DEBOOSERE, N.; PINON, A.; DELOBEL, A.; TEMMAM, S.; MORIN, T.; MERLE, G.; BLAISE-BOISSEAU, S.; PERELLE, S.; VIALETTE, M. A predictive microbiology approach for thermal inactivation of Hepatitis A virus in acidified berries. **Food Microbiology**, v. 27, n. 7, p. 962-967, 2010.

DECREY, L.; KAZAMA, S.; UDERT, K. M.; KOHN, T. Ammonia as an *in situ* sanitizer: inactivation kinetics and mechanisms of the ssRNA virus MS2 by NH<sub>3</sub>. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 2, p. 1060-1067, 2015.

EISCHEID, A. C.; MEYER, J. N.; LINDEN, K. G. UV disinfection of adenoviruses: molecular indications of DNA damage efficiency. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 23-28, 2009.

EMBRAPA – MILHO E SORGO. **Fixação biológica de nitrogênio**. 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-fixacao-biologica-de-nitrogenio>>. Acessado em: 16 de novembro de 2015.

EMBRAPA - SUÍNOS E AVES. **Biodigestão e tratamento do digestato**. 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355242/1529323/Treinamento+I+N+11+-+Airton+Kunz.pdf/e6a9c4c2-9837-4ea3-afce-a4e8d0390334>>. Acesso em: 29 de maio de 2015.

EMBRAPA - SUÍNOS E AVES. Produção de suínos - manejo de dejetos. **Sistemas de Produção**, v. 2, 2003.

EMERSON, K.; RUSSO, R. C.; LUND, R. E.; THURSTON, R. V. Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 32, n. 12, p. 2379-2383, 1975.

EMMOTH, E.; OTTOSON, J.; ALBIHN, A.; BELÁK, S.; VINNERÅS, B. Ammonia disinfection of hatchery waste for elimination of single-stranded RNA viruses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 12, p. 3960-3966, 2011.



EPAGRI/CIRAM - EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA E CENTRO DE INFORMAÇÕES DE RECURSOS AMBIENTAIS E DE HIDROMETEREOROLOGIA DE SANTA CATARINA. Disponível em:<[http://ciram.epagri.sc.gov.br/index.php?option=com\\_content&view=featured&Itemid=101](http://ciram.epagri.sc.gov.br/index.php?option=com_content&view=featured&Itemid=101)>. Acesso em: 14 de novembro de 2015.

ERICKSON, M. C.; SMITH, C.; JIANG, X.; FLITCROFT, I. D.; DOYLE, M. P. Manure source and age affect survival of zoonotic pathogens during aerobic composting at sublethal temperatures. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 2, p. 302-310, 2015.

ETERPI, M.; MCDONNELL, G.; THOMAS, V. Disinfection efficacy against parvoviruses compared with reference viruses. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, n. 1, p. 64-70, 2009.

FATMA – FUNDAÇÃO DO MEIO AMBIENTE. **Instrução normativa nº 11 – Suinocultura**. 2014. Disponível em: <<http://www.fatma.sc.gov.br/ckfinder/userfiles/arquivos/ins/11/IN%2011%20Suinocultura.pdf>>. Acesso em: 20 de outubro de 2015.

FIORE, A. E. Hepatitis A transmitted by food. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 5, p. 705-715, 2004.

FONG, T. T.; LIPP, E. K. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 2, p. 357-371, 2005.

FONG, T. T.; PHANIKUMAR, M. S.; XAGORARAKI, I.; ROSE, J. B. Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 3, p. 715-723, 2010.

FONGARO, G.; NASCIMENTO, M. A.; RIGOTTO, C.; RITTERBUSCH, G.; DA SILVA, A. D.; ESTEVES, P. A.; BARARDI, C. R. Evaluation and molecular characterization of human adenovirus in drinking water supplies: viral integrity and viability assays. **Virology Journal**, v. 10, p. 166-175, 2013.

FONGARO, G.; VIANCELLI, A.; MAGRI, M. E.; ELMAHDY, E. M.; BIESUS, L. L.; KICH, J. D.; KUNZ, A.; BARARDI, C. R. Utility of specific biomarkers to assess safety of swine manure for biofertilizing purposes. **Science of the Total Environment**, v. 479-480, p. 277-83, 2014.

FONTOURA, S. M. V.; BAYER, C. Adubação nitrogenada para alto rendimento de milho em plantio direto na região centro-sul do Paraná. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 1721-1732, 2009.

GABUTTI, G.; DE DONNO, A.; BAGORDO, F.; MONTAGNA, M. T. Comparative survival of faecal and human contaminants and use of *Staphylococcus aureus* as an effective indicator of human pollution. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 8, p. 697-700, 2000.

GALL, A. M.; SHISLER, J. L.; MARINAS, B. J. Analysis of the viral replication cycle of adenovirus serotype 2 after inactivation by free chlorine. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 7, p. 4584-4590, 2015.

GARCIA, L. A.; VIANCELLI, A.; RIGOTTO, C.; PILOTTO, M. R.; ESTEVES, P. A.; KUNZ, A.; BARARDI, C. R. Surveillance of human and swine adenovirus, human norovirus and swine circovirus in water samples in Santa Catarina, Brazil. **Journal of Water and Health**, v. 10, n. 3, p. 445-452, 2012.

GARCIA, L. A. T.; NASCIMENTO, M. A.; BARARDI, C. R. M. Effect of UV Light on the inactivation of recombinant human adenovirus and murine norovirus seeded in seawater in shellfish depuration tanks. **Food and Environmental Virology**, v. 7, n. 1, p. 67-75, 2015.

GASSILLOUD, B.; SCHWARTZBROD, L.; GANTZER, C. Presence of viral genomes in mineral water: a sufficient condition to assume infectious risk? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 3965-3969, 2003.

GERBA, C. P.; GRAMOS, D. M.; NWACHUKU, N. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 5167-5169, 2002.

GERBA, C. P.; NWACHUKU, N.; RILEY, K. R. Disinfection resistance of waterborne pathogens on the United States Environmental Protection Agency's Contaminant Candidate List (CCL). **Journal of Water Supply: Research and Technology - Aqua**, v. 52, n. 2, p. 81-94, 2003.

GRIFFIN, D. W.; DONALDSON, K. A.; PAUL, J. H.; ROSE, J. B. Pathogenic Human Viruses in Coastal Waters. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 1, p. 129-143, 2003.

HAACK, S. K.; DURIS, J. W.; KOLPIN, D. W.; FOGARTY, L. R.; JOHNSON, H. E.; GIBSON, K. E.; FOCAZIO, M.; SCHWAB, K. J.; HUBBARD, L. E.; FOREMAN, W. T. Genes indicative of zoonotic and swinepathogens are persistent in stream water and sediment following a swine manure spill. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 10, p. 3430-3441, 2015.

HAMEL, A. L.; LIN, L. L.; NAYAR, G. P. S. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. **Journal of Virology**, v. 72, n. 6, p. 5262-5267, 1998.

HAMMOND, J. M.; JOHNSON, M. A. Porcine adenovirus as a delivery system for swine vaccines and immunotherapeutics. **The Veterinary Journal**, v. 169, n. 1, p. 17-27, 2005.

HANSEN, K. H.; ANGELIDAKI, I.; AHRING, B. K. Improving thermophilic anaerobic digestion of swine manure. **Water Research**, v. 33, n. 8, p. 1805-1810, 1999.

HARAMOTO, E.; KITAJIMA, M.; KATAYAMA, H.; ASAMI, M.; AKIBA, M.; KUNIKANE, S. Application of real-time PCR assays to genotyping of F-specific phages in river water and sediments in Japan. **Water Research**, v. 43, n. 15, p. 3759-3764, 2009.

HEIDEN, F. Indicadores da evolução do setor agrícola catarinense - dados preliminares. 2006. Acesso em 2015.

HELLSTRÖM, D.; JOHANSSON, E.; GRENNBERG, K. Storage of human urine: acidification as a method to inhibit decomposition of urea. **Ecological Engineering**, v. 12, n. 3–4, p. 253-269, 1999.

HENN. **Avaliação de dois sistemas de manejo de dejetos em uma pequena propriedade produtora de suínos : condição de partida**. 2005. Dissertação Centro Tecnológico, Programa de Pos-Graduação em Engenharia Ambiental., Universidade Federal de Santa Catarina

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

ICTV - INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY VIRUSES. Virus taxonomy — classification and nomenclature of viruses. In Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses ed. King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. San Diego, CA, USA: Elsevier Academic Press. 2012.

JIANG, S. C. Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 23, p. 7132-7140, 2006.

KROG, J. S.; LARSEN, L. E.; SCHULTZ, A. C. Enteric porcine viruses in farmed shellfish in Denmark. **International Journal of Food Microbiology**, v. 186, p. 105-109, 2014.

KUNZ, A.; MIELE, M.; STEINMETZ, R. L. Advanced swine manure treatment and utilization in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 22, p. 5485-5489, 2009.

LA ROSA, G.; FRATINI, M.; DELLA LIBERA, S.; IACONELLI, M.; MUSCILLO, M. Emerging and potentially emerging viruses in water environments. **Annali Dell'Istituto Superiore di Sanita**, v. 48, n. 4, p. 397-406, 2012.

LABATUT, R. A.; ANGENENT, L. T.; SCOTT, N. R. Conventional mesophilic vs. thermophilic anaerobic digestion: A trade-off between performance and stability? **Water Research**, v. 53, n. 0, p. 249-258, 2014.

LARSON, C.; ORONSKY, B.; SCICINSKI, J.; FANGER, G. R.; STIRN, M.; ORONSKY, A.; REID, T. R. Going viral: a review of replication-selective oncolytic adenoviruses. **Oncotarget**, v. 6, n. 24, p. 19976-19989, 2015.

LAZIĆ, G.; GRUBAČ, S.; LUPULOVIĆ, D.; BUGARSKI, D.; LAZIĆ, S.; KNEŽEVIĆ, P.; PETROVIĆ, T. Presence of human and animal viruses in surface waters in Vojvodina province of Serbia. **Food and Environmental Virology**, v. 7, n. 2, p. 149-158, 2015.

MAGRI, M. E.; FIDJELAND, J.; JÖNSSON, H.; ALBIHN, A.; VINNERÅS, B. Inactivation of adenovirus, reovirus and bacteriophages in fecal sludge by pH and ammonia. **Science of the Total Environment**, v. 520, p. 213-221, 2015.

MAGRI, M. E.; PHILIPPI, L. S.; VINNERAS, B. Inactivation of pathogens in feces by desiccation and urea treatment for application in urine-diverting dry toilets. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 7, p. 2156-2163, 2013.

MAHESHWARI, G.; JANNAT, R.; MCCORMICK, L.; HSU, D. Thermal inactivation of adenovirus type 5. **Journal of Virological Methods**, v. 118, n. 2, p. 141-146, 2004.

MANCUSO, P.C.S; SANTOS, H.F.D. **Reúso de Água**. Barueri-sp: Manole, 2003. 579 p.

MANSER, N. D.; MIHELICIC, J. R.; ERGAS, S. J. Semi-continuous mesophilic anaerobic digester performance under variations in solids retention time and feeding frequency. **Bioresource Technology**, v. 190, p. 359-366, 2015.

MANSER, N. D.; WALD, I.; ERGAS, S. J.; IZURIETA, R.; MIHELICIC, J. R. Assessing the fate of *Ascaris suum* ova during mesophilic anaerobic digestion. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 5, p. 3128-3135, 2015.

MANYI-LOH, C. E.; MAMPHWELI, S. N.; MEYER, E. L.; OKOH, A. I.; MAKAKA, G.; SIMON, M. Microbial anaerobic digestion (biodigesters) as an approach to the decontamination of animal wastes in pollution control and the generation of renewable energy. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 9, p. 4390-4417, 2013.

MASSÉ, D. I.; SAADY, N. M. C. High rate psychrophilic anaerobic digestion of undiluted dairy cow feces. **Bioresource Technology**, v. 187, n. 0, p. 128-135, 2015.

MATA-ALVAREZ, J.; MACÉ, S.; LLABRÉS, P. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 3-16, 2000.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; MCDONALD, S. M.; ATTOUI, H.; BANYAI, K.; BRISTER, J. R.; BUESA, J.; ESONA, M. D.; ESTES, M. K.; GENTSCH, J. R.; ITURRIZA-GOMARA, M.; JOHNE, R.; KIRKWOOD, C. D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P. P.; NAKAGOMI, O.; PARRENO, V.; RAHMAN, M.; RUGGERI, F. M.; SAIF, L. J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; PATTON, J. T.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Archives of Virology**, v. 156, n. 8, p. 1397-1413, 2011.

MENA, K. D.; GERBA, C. P. Waterborne adenovirus. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 198, p. 133-167, 2009.

MENDEZ, e; ARIAS, C.f. Astroviruses. In: KNIPE, David M.; HOWLEY, Peter. **Fields virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 875-893.

MORESCO, V.; VIANCELLI, A.; NASCIMENTO, M. A.; SOUZA, D. S. M.; RAMOS, A. P. D.; GARCIA, L. A. T.; SIMÕES, C. M. O.; BARARDI, C. R. M. Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 1, p. 40-48, 2012.

NIWAGABA, C.; KULABAKO, R. N.; MUGALA, P.; JONSSON, H. Comparing microbial die-off in separately collected faeces with ash and sawdust additives. **Waste Management**, v. 29, n. 7, p. 2214-2219, 2009.

NORDIN, A.; NYBERG, K.; VINNERAS, B. Inactivation of *Ascaris* eggs in source-separated urine and feces by ammonia at ambient temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 3, p. 662-667, 2009.

NORDIN, A.; OTTOSON, J. R.; VINNERAS, B. Sanitation of faeces from source-separating dry toilets using urea. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 5, p. 1579-1587, 2009.

OLIVEIRA, R. A. D. Balanço de massa de reatores anaeróbicos de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB) tratando águas residuárias de suinocultura. **Engenharia Agrícola**, v. 24, 2004.

OPRIESSNIG, T.; MADSON, D. M.; ROOF, M.; LAYTON, S. M.; RAMAMOORTHY, S.; MENG, X. J.; HALBUR, P. G. Experimental reproduction of porcine circovirus type 2 (PCV2)-associated enteritis in pigs infected with PCV2 alone or concurrently with lawsonia intracellularis or *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Comparative Pathology**, v. 145, n. 2-3, p. 261-270, 2011.

OTTOSON, J.; NORDIN, A.; VON ROSEN, D.; VINNERAS, B. *Salmonella* reduction in manure by the addition of urea and ammonia. **Bioresour Technol**, v. 99, n. 6, p. 1610-1615, 2008.

OTTOSON, J. R.; SCHNÜRER, A.; VINNERÅS, B. In situ ammonia production as a sanitation agent during anaerobic digestion at mesophilic temperature. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 325-330, 2008.

PALHARES, J. C. P. Water footprint of pigs slaughtered in the states of south-central **Acta Scientiarum Animal Sciences** v. 33, p. 309-314, 2011.

PECSON, B. M.; BARRIOS, J. A.; JIMÉNEZ, B. E.; NELSON, K. L. The effects of temperature, pH, and ammonia concentration on the inactivation of *Ascaris* eggs in sewage sludge. **Water Research**, v. 41, n. 13, p. 2893-2902, 2007.

RECESA - REDE DE CAPACITAÇÃO E EXTENSÃO TECNOLÓGICA EM SANEAMENTO. Esgotamento sanitário: qualidade da água e controle da poluição: guia do profissional em treinamento: nível 2 **Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental**, p. 87, 2008.

REUTER, G.; ZIMŠEK-MIJOVSKI, J.; POLJŠAK-PRIJATELJ, M.; DI BARTOLO, I.; RUGGERI, F. M.; KANTALA, T.; MAUNULA, L.; KISS, I.; KECSKEMÉTI, S.; HALAIHEL, N.; BUESA, J.; JOHNSEN, C.; HJULSAGER, C. K.; LARSEN, L. E.; KOOPMANS, M.; BÖTTIGER, B. Incidence, Diversity, and Molecular Epidemiology of Sapoviruses in Swine across Europe. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 363-368, 2010.

RIGOTTO, C.; HANLEY, K.; ROCHELLE, P. A.; DE LEON, R.; BARARDI, C. R. M.; YATES, M. V. Survival of adenovirus types 2 and 41 in surface and ground waters measured by a plaque assay. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 9, p. 4145-4150, 2011.

RODHE, L.; PELL, M.; YAMULKI, S. Nitrous oxide, methane and ammonia emissions following slurry spreading on grassland. **Soil Use and Management**, v. 22, n. 3, p. 229-237, 2006.

RODRIGUEZ-MANZANO, J.; HUNDESA, A.; CALGUA, B.; CARRATALA, A.; MALUQUER DE MOTES, C.; RUSIÑOL, M.; MORESCO, V.; RAMOS, A.; MARTÍNEZ-MARCA, F.; CALVO, M.; MONTE BARARDI, C.; GIRONES, R.; BOFILL-MAS, S. Adenovirus and norovirus contaminants in commercially distributed shellfish. **Food and Environmental Virology**, v. 6, n. 1, p. 31-41, 2014.



ROWSE, Laurel Erika. **Design of small scale anaerobic digesters for application in rural developing countries.** 2011. 125 f. Dissertation (Master) – Course of Science, Department of civil and environmental engineering, University of South Florida, Florida, 2011.

RUX, J. J.; BURNETT, R. M. Adenovirus structure. **Human Gene Therapy**, v. 15, n. 12, p. 1167-1176, 2004.

SANTOS, N. S. D. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à virologia humana.** 2. 2008. 532

SCHOGGINS, J. W.; FALCK-PEDERSEN, E. Fiber and penton base capsid modifications yield diminished adenovirus type 5 transduction and proinflammatory gene expression with retention of antigen-specific humoral immunity. **Journal of Virology**, v. 80, n. 21, p. 10634-10644, 2006.

SEGALES, J.; ALLAN, G. M.; DOMINGO, M. Porcine circovirus diseases. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 2, p. 119-142, 2005.

SEVERI, E.; VENNEMA, H.; TAKKINEN, J.; LOPALCO, P. L.; COULOMBIER, D. Hepatitis A outbreaks. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 632-634, 2015.

SHEETS, J. P.; GE, X.; LI, Y. Effect of limited air exposure and comparative performance between thermophilic and mesophilic solid-state anaerobic digestion of switchgrass. **Bioresource Technology**, v. 180, n. 0, p. 296-303, 2015.

SILVA, H. D.; PESSOA-DE-SOUZA, M. A.; FONGARO, G.; ANUNCIAÇÃO, C. E.; SILVEIRA-LACERDA, E. D. P.; BARARDI, C. R. M.; GARCIA-ZAPATA, M. T. A. Behaviour and recovery of human adenovirus from tropical sediment under simulated conditions. **Science of The Total Environment**, v. 530–531, p. 314-322, 2015.

SIRIKANCHANA, K.; SHISLER, J. L.; MARIÑAS, B. J. Inactivation kinetics of adenovirus serotype 2 with monochloramine. **Water Research**, v. 42, n. 6–7, p. 1467-1474, 2008.

SOUZA, J. C. P. V. B.; AMARAL, A. L. D.; MORÉS, N.; TREMÉA, S. L.; MIELE, M.; FILHO, J. I. D. S. Sistema de produção de leitões baseado em planejamento, gestão e padrões operacionais. **Embrapa Suínos e Aves**, p. 118, 2013.

SNOEYINK, V.; JENKINS, D.. **Water Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1980.

STEYER, A.; POLJŠAK-PRIJATELJ, M.; BARLIČ-MAGANJA, D.; JAMNIKAR, U.; MIJOVSKI, J. Z.; MARIN, J. Molecular characterization of a new porcine rotavirus P genotype found in an asymptomatic pig in Slovenia. **Virology**, v. 359, n. 2, p. 275-282, 2007.

TATE, J. E.; BURTON, A. H.; BOSCHI-PINTO, C.; STEELE, A. D.; DUQUE, J.; PARASHAR, U. D. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 136-141, 2012.

TENTER, A. M. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 364-369, 2009.

TROTMAN, L. C.; MOSBERGER, N.; FORNEROD, M.; STIDWILL, R. P.; GREBER, U. F. Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 12, p. 1092-1100, 2001.

US EPA – UNITED STATE ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **AgStar – Learn about biogas recovery**. 2015a. Disponível em: <<http://www2.epa.gov/agstar/learn-about-biogas-recovery#adwork>>. Acesso em: 07 de novembro de 2015.

US EPA – UNITED STATE ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Drinking water contaminant candidate list (CCL) and regulatory determination**. 2015b. Disponível em: <<http://www2.epa.gov/ccl>>. Acesso em: 28 de outubro de 2015.

VAN DER POEL, W. H. Food and environmental routes of hepatitis E virus transmission. **Current Opinion In Virology**, v. 4, p. 91-96, 2014.

VAN OOSTRUM, J.; BURNETT, R. M. Molecular composition of the adenovirus type 2 virion. **Journal of Virology**, v. 56, n. 2, p. 439-448, 1985.

VERHAELLEN, K.; BOUWKNEGT, M.; LODDER-VERSCHOOR, F.; RUTJES, S. A.; DE RODA HUSMAN, A. M. Persistence of human norovirus GI.4 and GII.4, murine norovirus, and human adenovirus on soft berries as compared with PBS at commonly applied storage conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, n. 2, p. 137-144, 2012.

WALKER, J. T.; ANEJA, V. P.; DICKEY, D. A. Atmospheric transport and wet deposition of ammonium in North Carolina. **Atmospheric Environment**, v. 34, p. 3407-3418, 2000.

WARD, R. L. Mechanism of poliovirus inactivation by ammonia. **Journal of Virology**, v. 26, n. 2, p. 299-305, 1978.

WHO/FAO – WORLD HEALTH ORGANIZATION AND FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Risk assessments of Salmonella in eggs and broiler chickens**. 2002. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/005/y4392e/y4392e00.pdf>>. Acesso em: 10 de junho de 2015.

WILKINS, D.; RAO, S.; LU, X.; LEE, P. K. H. Effects of sludge inoculum and organic feedstock on active microbial communities and methane yield during anaerobic digestion. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1114-1123, 2015.

WILLIAMS, P. D.; RANJZAD, P.; KAKAR, S. J.; KINGSTON, P. A. Development of viral vectors for use in cardiovascular gene therapy. **Viruses**, v. 2, n. 2, p. 334-371, 2010.

WONG, K.; MUKHERJEE, B.; KAHLER, A. M.; ZEPP, R.; MOLINA, M. Influence of inorganic ions on aggregation and adsorption behaviors

of human adenovirus. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 20, p. 11145-11153, 2012.

ZHANG, T.; MAO, C.; ZHAI, N.; WANG, X.; YANG, G. Influence of initial pH on thermophilic anaerobic co-digestion of swine manure and maize stalk. **Waste Management**, v. 35, p. 119-126, 2015.

## APÊNDICE

### 1. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 1.1 Artigos completos publicados em periódicos

1. FONGARO, GISLAINE, SILVA, HUGO DELEON, EL MAHDY, EL MAHDY MOHAMED, MAGRI, MARIA ELISA, **SCHISSI, CAMILA DAMINELLI**, MOREIRA, MARIANA, LANA, MARIA CÉLIA DA SILVA, LACERDA, ELISANGELA SILVEIRA, BARARDI, CELIA REGINA MONTE. Enteric viruses as contaminants and bioindicators in environmental samples: a review. *Virus Reviews and Research.*, v.20, p.1 - 12, 2015.

2. FONGARO, GISLAINE, PADILHA, J., **SCHISSI, C. D.**, NASCIMENTO, M. A., BAMPI, G. B., VIANCELLI, A., BARARDI, C. R. M. Human and animal enteric virus in groundwater from deep wells, and recreational and network water. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2015.

3. NASCIMENTO, MARIANA A, MAGRI, MARIA E, **SCHISSI, CAMILA D**, BARARDI, CÉLIA RM. Recombinant adenovirus as a model to evaluate the efficiency of free chlorine disinfection in filtered water samples. *Virology Journal.*, v.12, p.1 - 12, 2015.

#### 1.2 Artigos aceitos para publicação

1. EL MAHDY, EL MAHDY MOHAMED, FONGARO, G., **SCHISSI, C. D.**, BARARDI, C. R. M. Enteric viruses in surface water and sediment samples from the catchment area of Peri Lagoon, Santa Catarina State, Brazil. *Journal of Water and Health*, 2015.

#### 1.3 Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. ELMahdy M. ELMahdy, **SCHISSI, C. D.**, FONGARO, G., NASCIMENTO, M. A., BARARDI, C. R. M. Presence of human adenoviruses in surface water and sediments in Sangradouro River, Santa Catarina, Brazil In: Congresso Brasileiro de Virologia, 2014, Ribeirão Preto. **Annals of the XXV Brazilian Congress of Virology**, 2014. v.19. p.104 - 104

2. FONGARO, G., KUNZ, A., **SCHISSI, C. D.**, MAGRI, MARIA E, ZAGUINI, J., BARARDI, C. R. M. Sedimentation and survival evaluation of pathogens in swine effluent and sludge for safe reuse purposes In: Congresso Brasileiro de Virologia, 2014, Ribeirão Preto. **Annals of the XXV Brazilian Congress of Virology**, 2014. v.19. p.105 – 105

#### **1.4 Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)**

1. FONGARO, G., PADILHA, J., **SCHISSI, C. D.**, NASCIMENTO, MARIANA A, BAMPI, G. B., VIANCELLI, A., BARARDI, C. R. M. Presence and infectivity of human and animal enteric viruses in network and groundwater from deep wells In: 18th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, 2015, Lisbon. **18th International Symposium on Health Related Water Microbiology - WaterMicro 2015.** , 2015. p.217 - 218

2. FONGARO, G., KUNZ, A., MAGRI, MARIA E, **SCHISSI, C. D.**, ZAGUINI, J., BARARDI, C. R. M. Settling profile of enteric pathogens in swine wastewater for reuse purposes In: 18th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, 2015, Lisbon. **18th International Symposium on Health-Related Water Microbiology - WaterMicro 2015.** , 2015. p.83 - 85

#### **1.5 Apresentação de trabalho e palestra**

1. **SCHISSI, C. D.**, FONGARO, G., MAGRI, MARIA E, ZAGUINI, J., BARARDI, C. R. M. **Avaliação de processos para inativação de patógenos virais em efluentes da suinocultura utilizando Adenovírus Humano como modelo**, 2015. (Seminário, Apresentação de Trabalho)  
*Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários; Cidade: Florianópolis; Evento: Seminário de Iniciação Científica; Inst. promotora/financiadora: Universidade Federal de Santa Catarina.*

2. **SCHISSI, C. D., FONGARO, G., MAGRI, MARIA E, ZAGUINI, J., KUNZ, A., BARARDI, C. R. M. Estabilidade e inativação de vírus entéricos em efluentes e lodos da suinocultura utilizando Adenovírus humano como modelo**, 2014. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

*Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Cidade: Florianópolis; Evento: Simpósio de Integração das Pós-Graduações do CCB - SIP; Inst. promotora/financiadora: Universidade Federal de Santa Catarina*

3. FONGARO, G., KUNZ, A., **SCHISSI, C. D., MAGRI, MARIA E, ZAGUINI, J., BARARDI, C. R. M. Sedimentation and survival evaluation of pathogens in swine effluent and sludge for safe reuse purposes**, 2014. (Congresso, Apresentação de Trabalho).

*Referências adicionais: Brasil/Português; Cidade: Ribeirão Preto; Evento: Congresso Brasileiro de Virologia*

4. FONGARO, G., KUNZ, A., **SCHISSI, C. D., MAGRI, MARIA E, ZAGUINI, J., BARARDI, C. R. M. Sedimentation and survival evaluation of pathogens in swine effluent and sludge for safe reuse purposes**, 2014. (Simpósio, Apresentação de Trabalho).

*Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Cidade: Florianópolis; Evento: Simpósio de Integração das Pós-Graduações do CCB; Inst. promotora/financiadora: Universidade Federal de Santa Catarina*

5. FONGARO, G., **SCHISSI, CAMILA D, MAGRI, MARIA E, ZAGUINI, J., KUNZ, A., BARARDI, C. R. M. Sedimentation and survival evaluation of pathogens in swine effluent and sludge for safe reuse purposes**, 2014. (Simpósio, Apresentação de Trabalho).

*Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Cidade: Florianópolis; Evento: Simpósio de Integração das Pós-Graduações do CCB; Inst. promotora/financiadora: Universidade Federal de Santa Catarina*

## **2 EVENTOS**

### **2.1 Participação em eventos**

1. Apresentação Oral no (a) **Seminário de Iniciação Científica**, 2015. (Seminário). Avaliação de processos para inativação de patógenos virais em efluentes da suinocultura utilizando Adenovírus Humano como modelo.
2. Apresentação de Pôster / Painel no (a) **Seminário de Iniciação Científica**, 2015. (Seminário). Avaliação de processos para inativação de patógenos virais em efluentes da suinocultura utilizando Adenovírus Humano como modelo.
3. Apresentação de Pôster / Painel no (a) **XXV Congresso Brasileiro de Virologia**, 2014. (Congresso). Sedimentation and survival evaluation of pathogens in swine effluent and sludge for safe reuse purposes.