

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

Estêvão Brasiliense de Souza

**USO DE CASCAS DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* ÍNTEGRAS E
FRACIONADAS PARA FINS DE TRATAMENTO DE EFLUENTES DA
SUINOCULTURA**

Florianópolis

2021

Estêvão Brasiliense de Souza

**USO DE CASCAS DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* ÍNTEGRAS E
FRACIONADAS PARA FINS DE TRATAMENTO DE EFLUENTES DA
SUINOCULTURA**

Trabalho Conclusão do Curso submetido ao Curso de
Graduação em Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção
do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Gislaine Fongaro, Dra.

Coorientadora: Doris Sobral Marques Souza, Dra.

Florianópolis

2021

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

Souza, Estêvão

USO DE CASCAS DE SEMENTES DE MORINGA OLEIFERA ÍNTEGRAS
E FRACIONADAS PARA FINS DE TRATAMENTO DE EFLUENTES DA
SUINOCULTURA / Estêvão Souza ; orientador, Gislaine
Fongaro, coorientador, Doris Sobral Marques Souza, 2021.
73 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis,
2021.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Biocontrole. 3. Recuperação de
recursos naturais. 4. Águas Residuárias. 5. Patógenos
entéricos. I. Fongaro, Gislaine . II. Sobral Marques
Souza, Doris . III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Estêvão Brasiliense de Souza

**USO DE CASCAS DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* ÍNTEGRAS E
FRACIONADAS PARA FINS DE TRATAMENTO DE EFLUENTES DA
SUINOCULTURA**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelo curso de Graduação em Ciências Biológicas

Florianópolis, 18 de Maio de 2021.

Prof. Carlos Zanetti, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Profa. Gislaine Fongaro, Dra.
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Deisi Tápparo, MsC.
Avaliadora
Embrapa Suínos e Aves

Profa. Maria Célia da Silva Lanna, Dra.
Avaliadora
Universidade Federal de Ouro Preto

Este trabalho é dedicado aos meus pais, amigos e colegas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, que sem eles nada dessa jornada seria possível. Aos meus amigos e colegas, que me deram força e ajudaram a concluir esse trabalho e a graduação. Aos meus colegas de laboratório, que se dispuseram a ajudar e a ficar horas sem intervalos para concluir um experimento. À minha orientadora, Dra. Gislaine Fongaro, a qual me instruiu e acreditou no meu potencial como futuro pesquisador. À Dra. Doris Sobral, a qual foi a peça chave em todas as etapas deste trabalho, acompanhando e sanando minhas dúvidas de início ao fim. À Dra. Maria Célia, a qual teve a ideia inicial e incentivou a confecção deste trabalho.

“[...] Find What you love and let it kill you [...]
(Bukowski, 1986)

RESUMO

Moringa oleifera é uma planta originária do Sul da Ásia e é conhecida popularmente como Acácia-branca. Tal espécie é reconhecida por diversos povos como uma “árvore milagrosa” devido às diversas propriedades medicinais e nutricionais presentes nas folhas, raízes, sementes, cascas e flores. Uma de suas características mais promissoras diz respeito à purificação de águas para consumo humano, devido a presença de compostos coagulantes naturais presentes principalmente dentro da semente da moringa. No entanto, pouco se sabe se a casca da semente de moringa, parte membranosa “alada” que é descartada nos processamentos e usos diversos dessa semente, possui capacidade para adsorção e/ou coagulação de agentes biológicos, como bactérias e vírus entéricos, bem como de matéria orgânica. Nesse sentido, o presente estudo visou avaliar a capacidade de redução da turbidez de águas residuárias da suinocultura, bem como o processo de redução e/ou adsorção de bactérias entéricas (representadas pela *Escherichia coli*.) e vírus entéricos (representados pelos Circovírus porcino – PCV-2, bem como usando Adenovírus Humano respiratório– HAdV-5 como controle interno viral) mediado por sementes íntegras de *M. oleifera* assim como por somente membranas aladas destas sementes. A concentração de 125 mg/L de semente apresentou redução significativa na turbidez do efluente, sendo, portanto, considerada a concentração mais promissora para testes subsequentes usando apenas membranas aladas. Assim, usou-se 125 mg/L de sementes, obtendo-se apenas as membranas aladas das sementes (rendendo 0,85 mg/L) para o tratamento de efluentes da suinocultura. Em até 8h houve avaliação da redução de turbidez e patógenos, sendo que as membranas aladas foram capazes de reduzir 99,9% de PCV-2 nos efluentes e 1 log de *E.coli* no sobrenadante tratado após período de repouso / precipitação das membranas por 15 minutos. Assim, o uso de membranas aladas de *M. oleifera* seguido de processo de sedimentação apresenta potencial como biomaterial a ser explorado na descontaminação de águas residuárias visando seu reciclo para fins de recuperação hídrica e de nutrientes.

Palavras-chave: Biocontrole; Recuperação de recursos naturais; Águas residuárias; Vírus entéricos; Bactérias entéricas.

ABSTRACT

Moringa oleifera is a plant originated from South Asia being popularly known as “Acácia-branca” by Brazilian population. This species is known by different peoples as a “miracle tree”, due to the medicinal and nutritional properties of the leaves, roots, seeds, bark and flowers. One of the most remarkable characteristics of this plant is the use of one’s extract as a water purifier, due to the presence of flocculant compounds in the interior of the seed. Compounds that are able to reduce water turbidity and improvement of the overall water quality by bacteria retention. Nonetheless, few is known about if the seed shell of the plant, the “winged” membrane which is usually discarded in the processing of the seed, have also potential in adsorption and/or coagulation of biological contaminants, like bacteria and viruses, as well as overall organic matter. In that sense, the present study aims to evaluate the reduction capacity of water turbidity of wastewater and the potential reduction and adsorption of enteric bacteria (*Escherichia coli*.) and enteric viruses (Porcine circovirus type – PCV-2, as well as using Human Respiratory Adenovirus – HAdV 2/5 as an internal control), mediated by *Moringa oleifera* whole seed shells and isolated “winged membranes” of the seed. The 125 mg/L concentration achieved an expressive reduction of the effluent turbidity, being chosen as the most promising concentration and used in the next tests using only seed membranes. Therefore, it was used 125 mg/L to obtain isolated seed membranes (achieving 0,85 mg/L) for the swine effluent treatment. There was evaluation of the reduction of pathogens and turbidity till 8h, being the winged membranes able to reduce 99,9% of PCV-2 in the effluents and 1 log of *E.coli* in the water-column treated after the resting/precipitation of 15 minutes of the membranes. Therefore, the use of “winged” membranes of *M. oleifera* followed by a precipitation process appears to have potential as a biomaterial for further exploration in wastewater decontamination, aiming its recycling for ends of recovery of water and nutrients.

Keywords: Biocontrol, Natural resources recovery, Wastewater, Enteric viruses, Enteric bacteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – BA de Lagoa Coberta. A câmara entre a entrada do dejetto bruto e a digestão representa o recipiente onde o dejetto é armazenado e digerido.

Figura 2 - Etapas da digestão anaeróbia em biorreatores de lagoa fechada

Figura 3 - Sementes de *Moringa oleifera* íntegras. Indicando as membranas aladas (indicadas por “1” em vermelho), seu envoltório não membranoso (indicadas por “2” em azul).

Figura 4 - Fluxograma dos Ensaio 1, 2 e 3

Figura 5 - Sementes íntegras imersas no efluente sob agitação contínua (ensaio 1).

Figura 6 - Comparação entre a semente de *Moringa oleifera* (A: placa à esquerda) e sua membrana “alada” (B: placa à direita), onde o volume de membranas da imagem corresponde diretamente às sementes descascadas em uma relação de 2,5g de sementes para 0,17 g de membranas aladas.

Figura 7 - Redução com tendência linear de decaimento da turbidez no tratamento SIMO usando 125 mg/L.

Figura 8 - Citotoxicidade aparente de SIMO em células VERO. Diluição 1:128 e 1:264 não foram citotóxicas, já nas diluições 1:32 e 1:64 houve citotoxicidade.

Figura 9 - Turbidez de efluente tratado e não tratado com MASMO em até 8h.

Figura 10 - Precipitação observada em MASMO após tratamento de 8 h seguido de 15 min de repouso. Círculos vermelhos indicam concentrações de membranas aladas da semente (objetos de cor clara).

Figura 11 - Média detectada de HAdV-5 e PCV-2 após tratamento com MASMO, onde o controle e tratamento (MASMO) estão representados em cores laranja e azul, respectivamente. Média detectada de HAdV-5 e PCV-2 após tratamento com MASMO, onde o controle e tratamento (MASMO) estão representados em cores laranja e azul, respectivamente.

Figura 12: Citotoxicidade aparente de MASMO em células VERO. Diluições não apresentaram efeitos citotóxicos nas diluições 1:32, 1:64, 1:128 e 1:256.

Figura 13 - Variação em unidades formadoras de colônias de *E.coli* após tratamento com MASMO. Controle e tratamento (MASMO) estão representados respectivamente em laranja e azul.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos das amostras de efluentes suínícolas - coleta 1 (2019) e 2 (2020).

Tabela 2 - Média dos resultados da turbidez via leitura espectrométrica em SpectraMax ® M2^e à 540 nm e a redução percentual após os tratamentos usando sementes íntegras de *M. oleifera*.

Tabela 3 - Redução da turbidez do efluente suínícola após MASMO seguido de sedimentação de 15 min em relação ao controle não tratado.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MASMO: Membranas aladas de sementes de *Moringa oleifera*

SIMO: Sementes íntegras de *Moringa oleifera*

BA: Biodigestores anaeróbios

RV-A: Rotavírus A

HAdV: Adenovírus humano

HAdV-2: Adenovírus humano do tipo 2

HAdV-5: Adenovírus humano do tipo 5

HEV: Vírus da Hepatite E

PCV-2: Circovírus Porcino do tipo 2

PAdV: Adenovírus porcino

CDRS: Complexo de doenças respiratórias do suíno

PDNS: Síndrome dermatite e nefropatia suína

PCR: Reação em cadeia da polimerase

RT-qPCR: Transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase

qPCR: PCR em Tempo Real

N-NH₃: Nitrogênio amoniacal total

DO: Densidade óptica

CG/ml: Cópias genômicas por mililitro

UFC/ml: Unidades formadoras de colônias por mililitro

/ml: por/em função de mililitros

/h: por/em função de horas

/L: por/em função de Litros

µl: Microlitros

kDa: Unidades de massa atômica

nm: Nanômetros

RPM: Rotações por minuto

M. oleifera: *Moringa oleifera*

E. coli: *Escherichia coli*

pH : Potencial Hidrogeniônico

BHI: Brain Heart Infusion Broth

UFOP: Universidade Federal de Ouro Preto

LMBT: Laboratório de Microbiologia e Bioprospecção Tecnológica

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

LVA: Laboratório de Virologia Aplicada (UFSC)

CCB: Centro de Ciências Biológicas (UFSC)

MIP: Departamento de Microbiologia Imunologia e Parasitologia (UFSC)

LISTA DE SÍMBOLOS

®: Marca registrada

™: Registrado no exterior

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	24
1.1	TRATAMENTO DE DEJETOS DA SUINOCULTURA E EFLUENTES DE BIODIGESTORES	25
1.2	PATÓGENOS ENTÉRICOS E MARCADORES DE CONTAMINAÇÃO FECAL NA SUINOCULTURA	29
1.2.1	Vírus entéricos	29
1.2.1.1	<i>Vírus da hepatite E</i>	30
1.2.1.2	<i>Circovírus Porcino</i>	31
1.2.1.3	<i>Rotavírus A</i>	32
1.2.2	Bactérias Entéricas	32
1.2.2.1	<i>Escherichia coli</i>	32
1.2.2.2	<i>Salmonella spp.</i>	33
1.3	MÉTODOS ALTERNATIVOS E DESCENTRALIZADOS PARA TRATAMENTO DE RECURSOS HÍDRICOS BASEADO EM <i>Moringa oleifera</i>	34
1.4.	CASCAS DE <i>Moringa oleifera</i> NA REDUÇÃO DE PATÓGENOS EM RECURSOS HÍDRICOS	36
1.5	CASCAS DE <i>Moringa oleifera</i> PARA O TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS ...	37
2.	OBJETIVO GERAL	40
2.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3.	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	EFLUENTES DA SUINOCULTURA: COLETAS E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	42
3.2	SEMENTES DE <i>M. oleifera</i>	43
3.3	AValiação E QUANTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS ENTÉRICOS VIRAIS	43
3.3.1	Vírus entéricos	43
3.3.2	Análises de <i>E. coli</i>	44

3.4 ANÁLISE DE TURBIDEZ POR ESPECTROFOTOMETRÍA ÓPTICA	44
3.5 ANÁLISE DO POTENCIAL HIDROGENIÔNICO	45
3.6 DESENHO EXPERIMENTAL	45
3.6.1 Ensaio 1: Piloto investigativo usando semente íntegra de <i>M. oleifera</i> (SIMO)	46
3.6.2 Ensaio 2: Tratando efluente suinícola com membrana alada de <i>M. oleifera</i> (MASMO) 46	
3.6.2.1 Ensaio 3: Sedimentação natural pós-tratamento MASMO	48
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4. 1 Ensaio 1 - SEMENTE ÍNTEGRA (SIMO)	50
4. 2 EnsaioS 2 e 3 - Tratando efluente suinícola com membrana alada de <i>M. oleifera</i> (MASMO) seguido de sedimentação	52
→ Turbidez	52
→ Redução viral e bacteriana	54
5. CONCLUSÃO.....	60
6. DEMAIS ATIVIDADES LABORATORIAIS REALIZADAS NO PERÍODO DE TCC 62	
7. REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

Como grande parte dos países em desenvolvimento, o Brasil não possui sistemas eficientes de tratamento de água para atender a maioria de sua população, enfrentando falta de água limpa mesmo com o enorme volume hídrico do país. Sendo que entre 2003 a 2016, o país teve aproximadamente 50% de seus municípios (2,783) declarados em estado de emergência devido a secas prolongadas (ANA, 2017). Grande parte desse problema sendo devido à poluição por dejetos domésticos, dejetos industriais e provenientes da agricultura, assim como por sistemas de descontaminação inapropriados ou muitas vezes ausentes (FERREIRA *et al.*, 2019).

Um dos setores mais responsáveis pela contaminação de recursos hídricos no Brasil, porém essencial para o desenvolvimento econômico do país, trata-se do setor agropecuário, a qual utiliza cerca de 70% de toda a água canalizada do país (SEBRAE, 2014; HESPANHOL, 2002). Um sistema de reuso seguro proveniente dos setores agropecuários, portanto, é altamente pertinente dentro do conceito de economia circular, visto a possibilidade de reciclo hídrico e de nutrientes para fins de lavagem de instalações, fertilização de solos e irrigação de plantas (VIANCELLI *et al.*, 2013; VELHO *et al.*, 2012; BRASIL, 2016).

Dentre as atividades do setor agropecuário que mais requerem água, assim como produzem contaminantes na mesma, está a suinocultura, sendo estimado que é necessário $6 m^3$ de água para produzir um kilo de carne suína (PALHARES *et al.*, 2011). A criação de suínos, além de necessitar um consumo elevado de água para manutenção desses animais e para crescer seus alimentos, inviabiliza grandes quantidades de recursos hídricos pela produção de excretas possivelmente contaminadas desses sistemas, gerando um custo adicional para a recuperação destas águas.

Na China, granjas de suínos em pequena escala produzem cerca de 216 a 773 toneladas (Zhang *et al.*, 2017) de dejetos anualmente, tais excretas possuem usualmente uma alta concentração de bactérias e protozoários entéricos, responsáveis por diversos surtos na indústria de alimentos e consumo local como: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Cryptosporidium* e *Giardia* (GUAN *et al.*, 2003; GIÁCOMAN-VALLEJOS *et al.*, 2015). Ainda, ressalta-se que essas matrizes ambientais podem apresentar vírus entéricos, muito desses zoonóticos, como por exemplo Circovírus porcino (PCV-2), Adenovírus porcino (PAdV), Rotavírus A (RV-A), vírus da hepatite E (HEV),

entre outros (FONGARO *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2020, VIANCELLI *et al.*, 2012; VLASOVA *et al.*, 2017; MENG, 2013).

Nisso, a descontaminação de efluentes suinícolas é necessário para haver a recuperação dos recursos hídricos a qual foram utilizados para a produção e manutenção destes animais e que estão agora inviabilizados até um tratamento prévio, visto que uma desinfecção imprópria pode ocasionar uma retro-contaminação de toda a cadeia produtiva, assim como trabalhadores e habitantes que entrem em contato com tal material, visto a presença de patógenos zoonóticos (GARCÍA *et al.*, 2020; KLOUS *et al.*, 2016; THAPALIYA *et al.*, 2014). Vendo isso, sistemas de tratamento adicionais e de baixo custo são altamente visados para recuperação de tais recursos, sendo de especial importância à países em desenvolvimento, visto que muitos podem possuir recursos limitados para um tratamento eficaz destes efluentes. Neste quesito, o uso de bioprodutos é altamente visado devido ao seu baixo custo e eficácia na redução de contaminantes, podendo utilizar até materiais a partir de biomassas as quais seriam comumente descartadas após seu processamento/refinamento (como, por exemplo, biocarvão a partir de bagaço de cana-de-açúcar) (NOVOTNY *et al.*, 2015; WEBER *et al.*, 2008). Entre materiais comumente descartados e que poderiam ser explorados (e assim obter um material adicional na recuperação de águas a partir do reciclo de biomassa), estão as cascas de *Moringa oleifera*. Tal planta é conhecida por seu uso no tratamento de águas residuais devido à presença de proteínas floculantes no interior de sua semente, porém, pouco se sabe se suas cascas podem ser utilizadas para uso similar, atuando como um possível descontaminante de baixo custo em efluentes suinícolas (DELELEGN *et al.* 2018; BAPTISTA *et al.*, 2017; NOUHI *et al.*, 2019; NDABIGENGESERE *et al.*, 1995).

1.1 TRATAMENTO DE DEJETOS DA SUINOCULTURA E EFLUENTES DE BIODIGESTORES

O método mais comumente utilizado na região Sul brasileira para tratar dejetos provenientes da atividade da suinocultura, baseia-se na biodigestão por meio de reatores chamados de biodigestores anaeróbios do tipo lagoa coberta (KUNZ *et al.*, 2009). O sistema de tratamento consiste em lagoas de dejetos suinícolas nas quais as excretas dos animais (assim como possíveis carcaças) são acumuladas em câmaras hermeticamente fechadas e mantidas estocadas por cerca de 45 dias e retenção hidráulica (TRH) - (AMARAL *et al.*, 2014).

Os biodigestores anaeróbios (BA) do tipo Lagoa Coberta ou Canadense são os modelos mais adotados por propriedades suinícolas da região Sul brasileira, por seu menor custo de implantação e manutenção, quando comparados a outros modelos de biodigestores anaeróbios (OLIVEIRA, 2006). Tal tipo de BA são constituídos por um tanque de digestão (em lona PVC) e por um gasômetro (campânula), no qual o tanque armazena, e assim digere a biomassa, enquanto o gasômetro é utilizado para armazenar o biogás produzido pela digestão anaeróbia (OLIVEIRA, 2006), tal modelo de biorreator é representado na Figura 1.

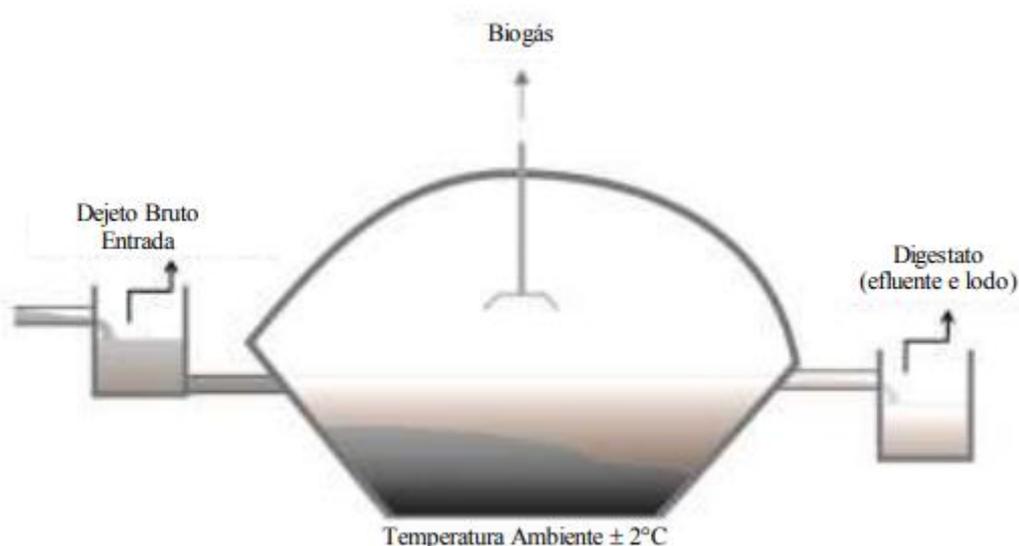


Figura 1: BA de Lagoa Coberta. A câmara entre a entrada do dejetto bruto e a digestão representa o recipiente onde o dejetto é armazenado e digerido

Fonte: FONGARO (2016).

Tais reatores necessitam de um tempo relativamente extenso para realizar propriamente a digestão da matéria orgânica, podendo levar de 30 a 50 dias no caso das lagoas cobertas. Sendo que o volume do biodigestor é projetado em função do volume de dejetos produzidos diariamente e do tempo de retenção hidráulica utilizado (OLIVEIRA, 2006; KUNZ *et al.*, 2009).

Por se tratar de um mecanismo que utiliza fatores biológicos é necessário que as condições de temperatura, pH e proporção nutricional estejam propriamente ajustados para garantir a sobrevivência dos microrganismos anaeróbios e para que uma digestão significativa do material aconteça. As fases de degradação de matéria orgânica, proporcionadas pelo biorreator, podem ser definidas em diferentes etapas (ver Figura 2): a) Hidrólise: primeira fase a qual consiste na hidrólise de materiais particulados e solutos simples; b) Acidogênese: os

produtos hidrólise são metabolizados pelas bactéria anaeróbicas em compostos orgânicos simples como aldeídos, álcoois, cetonas, ácidos graxos voláteis de cadeia curta, CO₂ e H₂, modificando a proporção das comunidades microbianas e influenciando em um diferente tipo de fermentação da comunidade original; c) Acetogênese: ocorre a transformação de produtos da acidogênese em ácido acético (precursor da formação do metano), também previne a acumulação de ácidos graxos voláteis, com exceção do ácido acético. Como os ácidos em concentrações elevadas inibem a etapa final da digestão anaeróbia, tais ácidos precisam ser consumidos. Durante esse processo de conversão do ácido acético há a liberação hidrogênio, podendo ser visado economicamente. Durante a acetogênese, os ácidos graxos voláteis assim como os álcoois, também são transformados em ácido acético pelas bactérias produtoras de hidrogênio; d) Metanogênese: na etapa final do processo de biodigestão anaeróbia, os compostos produzidos na fase acidogênica são transformados em biogás por microrganismos anaeróbios estritos. Os substratos responsáveis pela formação do metano são o dióxido de carbono, hidrogênio, ácido acético, ácido fórmico e etanol. As principais vias para a formação do metano são a descarboxilação do ácido acético (microrganismos metanogênicos acetotróficos) ou redução do dióxido de carbono (microrganismos metanogênicos) (BELLI FILHO, 1995).

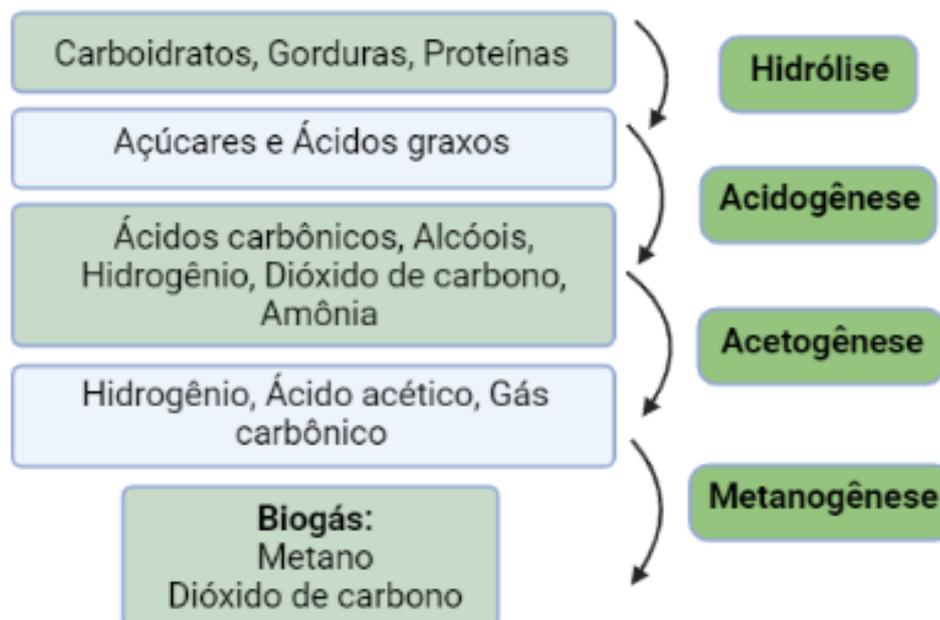


Figura 2: Etapas da digestão anaeróbia em biorreatores de lagoa fechada

Fonte: Adaptado de FONGARO (2016).

Tal técnica por biodigestores possui a vantagem de conseguir reduzir elevadas massas de material orgânico, possuir baixo custo e necessidade de treinamento, baixa manutenção e a possibilidade de utilizar o biogás liberado pelo sistema como um potencial biocombustível. Além disso, o efluente final, formado por parte do sistema, possui alta quantidade de matéria orgânica nitrogenada, podendo ser utilizado como um fertilizante em outros sistemas agrícolas (APPELS *et al.*, 2008; JINGURA *et al.*, 2009).

A produção de biocombustíveis, gerados como subprodutos da digestão anaeróbica de dejetos suínos (geralmente sendo composto de metano, gás carbônico e hidrogênio) é classificada como um sistema de baixo impacto ambiental, sendo caracterizado como um combustível “verde” e amplamente utilizado em regiões com alta produção de suínos e com planejamento sistemático de seus dejetos (CHASNYK *et al.*, 2015; PRETEL *et al.*, 2013; KHAN *et al.*, 2016). Países como a Alemanha, por exemplo, têm utilizado tal método de tratamento e produção de fontes energéticas por mais de 40 anos (AUER *et al.*, 2016). Tais características tornam o sistema tradicional de digestão anaeróbica um método de alto valor competitivo.

Ainda, cabe ressaltar o reciclo de nutrientes e recursos hídricos a partir do efluente final dos sistemas de biodigestão anaeróbia, chamados de efluentes ou digestatos. Os dejetos resultantes do tratamento por esses sistemas são almejados para sua utilização na cadeia produtiva de grãos como biofertilizantes, bem como para a fertirrigação. Ainda, o reuso hídrico a partir desses efluentes é estudado para lavagem de instalações de produção de suínos e para irrigação direta de solos (VIANCELLI *et al.*, 2013; VELHO *et al.*, 2012). Porém, cabe ressaltar que tais efluentes podem carrear contaminantes fecais, dentre eles patógenos virais e bacterianos, os quais podem afetar tanto a saúde animal quanto humana, classificados como patógenos zoonóticos, sendo necessário tratamento prévio antes que tais efluentes entrem em contato com recursos naturais ou adentrem novamente à granja (GARCÍA *et al.*, 2020; KLOUS *et al.*, 2016; THAPALIYA *et al.*, 2014). Mesmo com devidas modificações e adição de tratamentos adicionais, como a utilização seriada de diversos biodigestores para um mesmo dejetos, o sistema de digestão anaeróbia ainda é insuficiente para uma remoção completa de microrganismos patogênicos, em especial vírus entéricos, os quais além de mais estáveis do que organismos bacterianos também possuem um maior grau de infecciosidade (FONGARO *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2020).

1.2 PATÓGENOS ENTÉRICOS E MARCADORES DE CONTAMINAÇÃO FECAL NA SUINOCULTURA

1.2.1 Vírus entéricos

Vírus entéricos são espécies (ou estruturas) virais as quais são primariamente transmitidas por meio da via fecal-oral pela ingestão de água ou alimentos contaminados, podendo ser raramente transmitidos por via parental como é o caso do vírus da hepatite E (HEV) (SÁNCHEZ *et al.*, 2016).

Como os vírus são unidades que necessitam de um hospedeiro para seu desenvolvimento, e mais importantemente, não possuem metabolismo próprio para manter sua homeostase fora destes, tais estruturas se encontram vulneráveis quando expostas ao ambiente externo, tendo sua estabilidade e sobrevivência influenciada por suas características estruturais e pelo grau e tipo de adversidade encontrada no meio externo (SÁNCHEZ *et al.*, 2016). Tais tipos de adversidades podem incluir: radiação ultravioleta, temperatura, disruptões físicas (como vibrações e pressão), proteases, lipases (no caso de vírus envelopados), salinidade, amônia, agentes virucidas produzidos artificialmente ou por organismos. Mesmo com a desvantagem adaptativa de não possuir metabolismo próprio a fim de contornar adversidades ambientais, os vírus entéricos costumam ter uma maior estabilidade em comparação aos patógenos bacterianos, podendo permanecer estável por grandes períodos de tempo em ambientes a qual seriam inóspitos para a maior parte dos patógenos bacterianos (LOPMAN *et al.*, 2004; SCALLAN *et al.*, 2011). Tornando esses agentes infecciosos mais prevalentes em sistemas com baixo tratamento de resíduos ou águas (LOPMAN *et al.*, 2004).

É importante realçar, visto que o ambiente ideal para um vírus é no interior de seu hospedeiro, que quanto maior for o tempo de estabilidade do vírus em relação às forças externas maior é seu potencial de transmissão. Pois o meio em que se encontra (seja esse um substrato como solo ou meio líquido) permanece por mais tempo infeccioso pela presença de partículas virais ativas ou “vírions” (RZEŠUTKA *et al.*, 2004).

Outro fator que eleva a periculosidade dos vírus entéricos em comparação com microrganismos bacterianos é a relação da dose infecciosa necessária para ocasionar um quadro de infecção, sendo necessário somente de 1 a 5 partículas virais ativas para ocasionar um quadro infeccioso (HUSMAN *et al.*, 2013). Comparativamente, microrganismos como *Campylobacter*

sp., patógeno frequente em contaminações bacterianas, necessitam em torno de 100 a 1000 unidades ativas para ocasionar uma infecção (ACHESON *et al.*, 2001).

Considerando que um indivíduo pode eliminar cerca de 10^5 partículas por ml por meio de secreções como vômito ou diarreia, e visto como tais partículas podem se manter estáveis por grandes períodos mesmo em ambientes hostis, é fácil reconhecer como uma contaminação por estes patógenos podem se alastrar com facilidade e potencialmente se estender por meses após o primeiro contágio (HUSMAN *et al.*, 2013).

Akin *et al.* (1971) e Sattar *et al.* (1981), por exemplo, verificaram que a perda de unidades infecciosas virais de poliovírus, coxsackieviruses e echovírus em diferentes tipos de águas (provenientes de rios poluídos e não poluídos, de lençóis freáticos e de abastecimento caseiro) é menos de 1 log por dia (sendo a maior redução em águas de torneira com reduções diárias de 0.576 logs).

Vírus possuem facilidade de propagação através da contaminação de superfícies, um estudo por Bidawid *et al.* (2004) demonstrou que dedos contaminados por calicivírus felino conseguiam transferir taxas de mais de 46% do total de unidades virais para a superfície de lâminas de presunto por meio de sua manipulação. Adenovírus humano do tipo 2 (HAdV-2) manteve-se infeccioso por mais de 120 dias à 20 graus em águas extraídas de aquíferos, apresentando somente uma redução de 2.4 logs da concentração original após esse período, sendo que na temperatura de 4 graus não foi observado qualquer degradação significativa de seu material genético (OGORZALY *et al.*, 2010). A diferença da estabilidade de amostras de rotavírus humano à diferentes temperaturas foram associadas por Raphael *et al.* (1985) à atuação de microrganismos, a qual possuem uma taxa metabólica mais acentuada em altas temperaturas, e assim, produziam mais compostos reativos.

1.2.1.1 *Vírus da hepatite E*

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o vírus da hepatite E (HEV) é o maior responsável por quadros de hepatite entérica mundialmente (WHO, 2011). Tal vírus é identificado pela Organização Mundial da Saúde como sendo o responsável por cerca de 3.3% da mortalidade mundial relacionada a hepatites transmitidas por meio de estruturas virais. De acordo o órgão, tal patógeno é responsável por cerca de 20 milhões de infecções anualmente, constituindo 3.3 milhões de casos assintomáticos e 44.000 mortes somente em 2015 (WHO, 2011; REIN *et al.*, 2012). HEV usualmente ocasiona o quadro clínico caracterizado como

hepatite aguda, porém em pacientes imunocomprometidos pode se elevar à um quadro crônico. Em pacientes com prévias enfermidades hepáticas e gestantes, HEV foi observado provocando insuficiência hepática fulminante (JILANI *et al.*, 2007).

Além de ser um dos mais importantes vírus causadores de gastroenterites, principalmente em países em desenvolvimento, e o principal agente em hepatites causadas por patógenos virais, tal vírus também precisa ser abordado como um contaminante tanto de animais quanto humanos, visto que possui característica zoonótica, podendo transitar de animais para humanos e vice-versa (GARCÍA *et al.*, 2020).

Embora seja classificado como um vírus zoonótico, algumas variantes são mais prevalentes em animais do que outras, havendo fenótipos que só infectam especificamente uma espécie enquanto outros conseguem ocasionar uma infecção e avanço da doença em múltiplas espécies. As variantes HEV-1 e HEV-2, por exemplo, são conhecidas por somente provocar infecção em humanos. HEV-3 e HEV-4, as mais encontradas em suínos, possuem capacidade zoonótica, sendo o fenótipo do tipo “3” a mais prevalente em infecções humanas propagadas por contato prévio com o vírus replicado em hospedeiros suínos (GARCÍA *et al.*, 2020).

1.2.1.2 *Circovírus Porcino*

Outro vírus entérico importante no manejo de infecções em sistemas de suinocultura é o Porcino Vírus 2 (PCV-2), que embora não se trate de um organismo zoonótico, está entre os patógenos mais prevalentes e danosos em suínos. Seu quadro infeccioso ocasiona diversas alterações no sistema imunológico e danifica o aparelho respiratório, permitindo diversas infecções secundárias a qual podem agravar o quadro (ROSE *et al.*, 2012).

Tal vírus pode ocasionar características clínicas, podendo ser muitas vezes confundido com um patógeno bacteriano por profissionais inexperientes. Quadros como o complexo de doenças respiratórias do suíno (CDRS), podendo em certos casos ser causada por microrganismos bacterianos, usualmente é caracterizado por proeminente perda de peso, emaciação, dispneia, taquipnéia e icterícia (THACKER *et al.*, 2001). Circovirose suína, caracterizado como danos ao sistema imunológico dos animais, é outro sintoma comum em animais infectados, podendo facilitar a infecção secundária do indivíduo debilitado (OPRIESSNIG *et al.*, 2007). Síndrome dermatite e nefropatia suína (PDNS), caracterizado pelo aparecimento de lesões cutâneas como necrose e petéquias, febre, letargia e alteração da estrutura renal, podendo o quadro ser fatal em casos graves (OPRIESSNIG *et al.*, 2007).

1.2.1.3 Rotavírus A

De acordo com um relatório realizado pela UNICEF cerca de 480.000 crianças menores do que 5 anos de idade morrem anualmente decorrente de quadros de diarreia provocados pela falta de água limpa. Rotavírus, um dos gêneros virais mais comuns em contaminações humanas e animais em corpos d'água, está relacionado à cerca de 29,3% de todas as fatalidades entéricas de menores de 5 anos, sendo um dos patógenos mais visados na descontaminação de recursos ambientais (LANATA *et al.*, 2013). Mais notável é a capacidade de tal patógeno provocar uma infecção pelo número de partículas virais ativas por ml, identificados pelo método de unidades formadoras de colônias (PFU), sendo necessário somente 1 PFU/ml ingerido para provocar um quadro infeccioso (GRAHAM *et al.*, 1987).

Além de ser um dos patógenos mais prevalentes na saúde humana, tal vírus também é classificado como um dos principais causadores de gastroenterites dentro da pecuária, assim como também é referido como a espécie de maior importância dentre os rotavírus (MIYABE *et al.*, 2020). Em animais, infecções por RV-A são encontradas principalmente em bezerros e leitões. Afetando leitões em torno de uma a três semanas de idade e causando quadros diarreicos nestes animais (MARTHALER *et al.*, 2014; MARTELLA *et al.*, 2010)

Visto que o RV-A foi observado permanecendo ativo por mais de 200 dias em condições anaeróbicas, assim como em câmeras de dejetos de suíno por diversos meses, perdendo uma carga viral de somente um log após 6 meses (SIDHU *et al.*, 2015; PESARO *et al.* 1995) é possível concluir que recursos contaminados por Rotavírus permanecem infecciosos por tempo indeterminado até uma própria descontaminação. Assim como demais vírus entéricos, tais patógenos possuem uma alta sobrevivência em diferentes condições ambientais, sendo visado métodos adicionais para a redução de partículas virais (SIDHU *et al.*, 2015).

1.2.2 Bactérias Entéricas

1.2.2.1 *Escherichia coli*

A maior parte das cepas de *Escherichia coli* são não patogênicas, sendo encontradas comumente no intestino de animais e humanos como bactérias da microbiota natural, apresentando efeitos benéficos como a regulação da concentração de vitaminas K e B12 no

organismo (BLOUNT *et al.*, 2015). Porém, certas variedades patogênicas causam grandes danos no organismo nos animais infectados, como é o caso das *E.coli* enterohemorrágicas, podendo se alastrar em toda uma cadeia produtiva a partir de um material contaminado, sendo a análise de sua presença altamente visada em sistemas agropecuários (CROXEN *et al.*, 2013; STROMBERG *et al.*, 2018).

Visto à periculosidade das espécies patogênicas e levando em consideração que tal bactéria é um dos microrganismos mais estudados, *E.coli* é utilizada comumente como um marcador de contaminação por patógenos entéricos, sendo sua presença em águas e sólidos um indicativo de contaminação por excretas (WEN *et al.*, 2020; CROXEN *et al.*, 2013). Além disso *E.coli* é presente em altas concentrações nos intestinos de animais de sangue quente (incluindo humanos), devido a sua resistência no ambiente e abundância em dejetos é possível indicar que caso haja a presença de coliformes fecais na água, porém não *E.coli*, a contaminação provavelmente não é devido à presença de fezes (BRANDT *et al.*, 2017). Sua redução, portanto, é um indicador essencial para a validação de possíveis novos tratamentos para a descontaminação de efluentes (como nesse caso os efluentes suínicos), sendo necessária para haver a reutilização de tais efluentes.

1.2.2.2 *Salmonella spp.*

Além de *E.coli*, *Salmonella spp.* trata-se de um patógeno prevalente em alimentos e recursos hídricos, assim como na contaminação de granjas suínicas, sendo uma das principais bactérias responsáveis por danos na saúde dos suínos (assim como humanos) (SWARTZ *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2017). Suínos infectados por *Salmonella spp.* podem permanecer assintomáticos por vários meses, estes, porém, continuam a liberar o patógeno em suas fezes, podendo contaminar toda a cadeia de produção (SCHERER *et al.*, 2008; PIRES *et al.*, 2012). Assim como em infecções por RV-A, infecções por *S. enterica* são mais prevalentes em suínos jovens, como leitões e porcos a qual recém entraram na fase de engorda (MEURENS *et al.*, 2008; MARTHALER *et al.*, 2014; MARTELLA *et al.*, 2010).

Por se tratar de um organismo altamente resistente e frequentemente presente em sistemas pecuários, sua redução é usualmente mais almejada do que a busca de sua eliminação completa do sistema (DOYLE *et al.*, 2012). Sendo a pesquisa por novos mecanismos de descontaminação sempre pertinente para tais patógenos de difícil controle.

1.3 MÉTODOS ALTERNATIVOS E DESCENTRALIZADOS PARA TRATAMENTO DE RECURSOS HÍDRICOS BASEADO EM *Moringa oleifera*

Moringa oleifera, conhecida popularmente também como Acácia-branca, se refere à uma árvore nativa do Sul da Ásia (FAO, 2019) a qual tem havido uma crescente demanda para seu consumo assim como utilização de suas propriedades para fins de saúde em geral, sendo reconhecida tanto por suas qualidades nutritivas assim como suas alegadas propriedades no tratamento de doenças cardiovasculares, diabetes, câncer, etc (ANVISA, 2019). Em países como Índia, Etiópia, Filipinas, Sudão a *M. oleifera* é utilizada como um importante suplemento nutricional, sendo consumido suas sementes, folhas, casca, raízes e flores (FAO, 2019). Por suas qualidades medicinais e alimentícias, tal planta é referida como a “árvore milagrosa” por diversas tribos africanas (MATIC *et al.* 2018).

Uma importante aplicação da *M. oleifera* se dá com a aplicação do macerado das sementes na desinfecção de reservatórios de água, bem como na redução da turbidez da mesma, diminuindo o número de partículas sólidas que servem de substrato para patógenos se desenvolverem e se protegerem (DELELEGN *et al.* 2018; BAPTISTA *et al.*, 2017). Tal utilização já era observada por comunidades mais carentes do Sudão, assim como em áreas da Indonésia, Nordeste da África e América do Sul, que empregavam a semente macerada como alternativa à aplicação de sulfato de alumínio em locais de baixa renda (SUTHERLAND JP, FOLKARD G, GRANT WD, 1990).

A floculação de partículas orgânicas visando a redução da turbidez das águas é uma das técnicas mais tradicionais utilizadas pelo mundo e por grande parte da história humana (ALSAHARI *et al.*, 2020). Tal método tem como objetivo reduzir o número total de substratos suspensos, a qual por sua vez podem estar abrigando uma larga quantidade de microrganismos aderentes (MATILAINEN *et al.*, 2005). Nesse sentido a agregação de partículas suspensas continua a ser um método viável no controle de patógenos no meio ambiente, sendo necessário a caracterização das propriedades físico-químicas e comportamentais entre o substrato, patógeno e coagulante para uma maior retenção de partículas potencialmente infecciosas.

O uso de materiais orgânicos de característica floculante são candidatos cada vez mais explorados para serem utilizados como potenciais substitutos a métodos de coagulação/floculação tradicionais, como, por exemplo, o uso de sulfato de alumínio. Ao contrário da aplicação de sulfato de alumínio, o qual além de ser de maior custo é conhecido

por deixar resíduos na água tratada e está associado com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (YEGAMBARAM *et al.*, 2015), sementes de *Moringa oleifera* tratam-se de biomateriais de baixo custo e biodegradáveis, as quais demonstraram possuir propriedades como floculantes naturais de baixo impacto ambiental. Sendo, muito possivelmente, o melhor coagulante natural atualmente disponível (NOUHI *et al.*, 2019).

A capacidade de floculação de compostos em suspensão, a qual conferiu tal objeto como uma alternativa ao sulfato de alumínio, se dá pela presença de compostos no macerado da semente como globulina e albumina, aos quais foram verificadas proporcionando uma alta redução da turbidez da água, assim como uma significativa purificação da mesma. Porém, igualmente como o potencial tóxico do extrato da semente, pouco se sabe a respeito da capacidade floculante da membrana “alada” que envolve as sementes de moringa, as quais são descartadas muitas vezes em processos que utilizam tal macerado para a floculação e ainda que utilizam a semente para fins alimentícios e fitoterápicos (GARCIA-FAYOS *et al.*, 2015; BAPTISTA *et al.* 2017; DELELEGN *et al.* 2018; HOA e HUE 2018; VALVERDE *et al.* 2018).

Foi inferido que a capacidade floculante dos extratos de *Moringa oleifera* é devido à presença de proteínas de alto peso molecular (em torno de 13 kDa) a qual possuem capacidade de adsorção de moléculas presentes na água, apresentando ponto isoelétrico de 10 e 11, demonstrando o caráter catiônico destas proteínas. Experimentos anteriores utilizando macerados de sementes descascadas e sementes íntegras (apresentando tanto extratos macerados do interior da semente como sua casca) indicaram que sementes íntegras apresentaram menor capacidade adsorptiva em águas em comparação às descascadas. Isso demonstra uma clara concentração das proteínas ativas em seu interior, porém, como há uma grande concentração de proteínas e óleos em sua casca é possível que haja a presença das mesmas proteínas coagulantes, porém em menor quantidade (NDABIGENGESERE *et al.*, 1995).

Tais propriedades floculantes foram vistas proporcionando a agregação à diferentes contaminantes hídricos. Carbono ativado a base de cascas de *M. oleifera* foi demonstrado possuindo atividade adsorptiva na retenção de Trialometano, assim como outros contaminantes químicos em águas artificialmente poluídas (OKOYA *et al.*, 2020). Bezerra *et al.* (2018) identificou que cascas de *M. oleifera* possuem também capacidade adsorptiva na retenção de herbicidas em meios hídricos.

1.4. CASCAS DE *Moringa oleifera* NA REDUÇÃO DE PATÓGENOS EM RECURSOS HÍDRICOS

Contemplando o sistema de tratamento e vigilância de águas, a presença de coliformes fecais está entre os bioindicadores mais utilizados para verificar a presença de contaminação provenientes de dejetos humanos ou de animais, embora tal ferramenta não seja eficaz para verificar a presença de vírus entéricos, visto que tais organismos são estritamente distintos entre si e apresentam diferentes graus de sobrevivência à tratamentos ambientais, podendo haver a sobrevivência de espécies virais mesmo após ocorrer a eliminação de patógenos bacterianos. A redução do número de coliformes, porém, ainda é necessário para que as águas desse sistema possam ser utilizadas legalmente (GIGLIO *et al.*, 2017; GIBSON *et al.*, 2010).

Uma das ferramentas que demonstrou a redução do número de tais bactérias (além de radiação, toxinas, temperatura, predação e competição) é a adsorção desses organismos por substratos naturais ou artificiais (WEBER *et al.*, 2008). Com a crescente demanda destes produtos, sementes de *M. oleifera* podem se demonstrar um substrato importante na retenção de indicadores bacterianos, assim como muito provavelmente vírus entéricos.

Contudo, é possível que cascas de sementes de *Moringa oleifera*, comumente descartadas na produção de fármacos e alimentos, poderiam ser exploradas tanto para tratar águas provenientes da suinocultura do estado de Santa Catarina como na redução de altos índices de metais presentes em águas contaminadas, aos quais podem modular positivamente a capacidade infecciosa de vírus entéricos que podem estar presentes (OKOYA *et al.*, 2020). Jami *et al.* (2019) sugere que tais cascas poderiam ser reaproveitadas pela indústria farmacêutica e alimentícia, devido à identificação de altos níveis de cálcio e potássio presente em sua estrutura. Porém seu uso como possível descontaminante de águas residuais é de grande pertinência para a indústria suinícola e deve ser explorado.

Onsare *et al.* (2013) observou atividade antimicrobiana em diferentes patógenos bacterianos pelo uso de cascas de *M. oleifera*, entre eles *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* 1 e *Escherichia coli*. Assim como redução no crescimento de *Candida albicans*, demonstrando o potencial do uso de cascas de *M. oleifera* para diferentes patógenos. Porém, ainda há pouca literatura certificar o material como um agente antimicrobiano, sendo necessário mais experimentos, e em especial, na influência do objeto em patógenos viriais.

É possível que além de capacidade coagulante, tais cascas também possuam capacidade de agir sobre patógenos virais. Visto que já foi registrado atividade antiviral em ovos inoculados

contaminados com a doença de Newcastle após estes serem previamente tratados pelo extrato das sementes maceradas (CHOLLOM *et al.*, 2012). Possivelmente demonstrando potencial das cascas de *M. oleifera* frente à patógenos virais caso tal atividade não esteja restrita à componentes presentes no interior da semente.

É importante destacar que como o objeto de estudo trata-se, em especial, da possível concentração de proteínas de atividade floculante presentes na casca da semente, tal concentração pode flutuar de acordo com o desenvolvimento da planta, sendo influenciado pela proporção da deslocação de nutrientes para as sementes. Uma planta crescida em solo pobre pode apresentar menor concentração de um metabólito secundário de interesse devido ao seu baixo desenvolvimento, por exemplo mudas de *Hemerocallis fulva* apresentaram significativamente mais seu composto ativo oxypinnatanine (substância com propriedades sedativas) quando cultivadas em solos ricos em ferro (NGUYEN *et al.*, 2016).

Da mesma forma foi verificado capacidades floculantes diferenciadas em dois lotes de sementes de *M. oleifera* provenientes de dois locais diferentes. Em um estudo realizado por Nouhi *et al.* (2019) foi observado que extratos de sementes de *M. oleifera* provenientes de Botsuana apresentaram uma maior capacidade de reter impurezas da água em comparação a sementes da mesma espécie obtidas do Irã, apresentando também diferenças na concentração de argininas e ácido glutâmico. Tal informação é importante pois como o objeto de estudo trata-se de um organismo vivo, este está submetido a alterações genéticas e ambientais que podem não ser totalmente documentadas, podendo assim interferir no resultado almejado. Abrindo a possibilidade para que, caso se obtenha descobertas promissoras com o presente estudo, seja pertinente analisar como as variantes genéticas e ambientais possam aprimorar o resultado obtido.

1.5 CASCAS DE *Moringa oleifera* PARA O TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS

Ao contrário de sulfato de alumínio e outros agentes coagulantes metálicos, compostos orgânicos, como extratos a base de *Moringa oleifera*, são biodegradáveis e apresentam baixa toxicidade (MADRONA *et al.*, 2012). Porém, tal pressuposto pode ser necessário ser revisto com mais dados devido às características bioquímicas específicas da *M. oleifera*, visto que já foram observados efeitos citotóxicos com concentrações de 1 a 50 mg/L em ensaios celulares sistemas de células inteiras imobilizadas (AL-ANIZI *et al.*, 2014). Kavitha *et al.* (2012), inclusive, relatou em seu estudo que extratos de *M. oleifera* possuem capacidade tóxica em

Cyprinus carpio (carpa-comum), identificando uma concentração subletal à 124 mg/L. Inferindo que tais compostos podem trazer efeitos adversos à diferentes espécies de um local de aplicação, como por exemplo, caso tais compostos fossem inseridos em um rio ou em um corpo d'água que possa a entrar em contato com animais. Porém, não se sabe se tal efeito é similar em cascas de *M. oleifera*, sendo necessário experimentos para verificar a segurança do material em largas aplicações.

Outro poluente de recursos hídricos que está correlacionado à surtos por patógenos virais é a presença elevada de metais na água. Tal presença está diretamente relacionada à diversas interações entre as proteínas virais, promovendo uma maior funcionalidade e estabilidade nessas estruturas (AL-BADAI e SHUHAIMI-OTHMAN, 2015). Diversos metais como zinco, cobre e manganês mediam a atividade viral, aumentando a taxa de sobrevivência assim como a taxa de suscetibilidade de infecção (CHATURVEDI *et al.*, 2004). Por exemplo, Zinco, foi identificado sendo relacionado a atividade da transcriptase reversa em HIV-1 (GUO *et al.*, 2000). Tais metais também possibilitam uma maior presença de vírions viáveis em comparação a águas com pouco desses compostos, sendo observado uma maior presença de HADV em águas com alta presença de manganês, níquel, arsênio, bário e chumbo (REIS *et al.*, 2019).

Estudos anteriores demonstraram eficiência na utilização de “bolos” de *M. oleifera* (obtidos pelo mascaramento das sementes e sucessivas secagem do material a fim de obter um material com consistência de pasta) na absorção de diferentes tipos de metais em água, incluindo chumbo (GONÇALVES JUNIOR *et al.*, 2013). Porém pouco se sabe se um resultado semelhante pode ser obtido pela utilização de cascas das sementes que são comumente descartadas. Neste sentido, o presente estudo baseou-se na hipótese de que membranas aladas de semente de *M. oleifera* atuam na redução de turbidez, *E. coli* e vírus entéricos em efluentes suinícolas.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de sementes íntegras (SIMO) e membranas aladas de sementes de *M. oleifera* (MASMO) frente à redução da turbidez, de *E. coli* e dos vírus entéricos em efluentes da suinocultura.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a eficiência da redução de turbidez usando sementes íntegras de *M. oleifera* (SIMO) vs MASMO;
- Determinar o potencial de MASMO na redução de turbidez, de *E. coli* e de PCV-2 no tratamento de efluentes suinícolas;
- Avaliar a redução bacteriana e viral após tratamento integrado de MASMO seguido de sedimentação em tempo fixo (15 min).
- Comparar efeitos citotóxicos de efluentes tratados com SIMO vs MASMO.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EFLUENTES DA SUINOCULTURA: COLETAS E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

Para realização deste estudo foram coletados efluentes da saída de biodigestores anaeróbios provenientes de três granjas de criação de suínos, situadas no município de Concórdia-SC (27°18' S, 51°59' W). Tratavam-se de granjas de suínos em fase de engorda (fase de terminação), com aproximadamente 300 animais em cada uma. Os biodigestores anaeróbios possuíam uma média de 15 m de comprimento, 7 m de largura, volume de 135 m³ de dejetos suinícola, com alimentação diária de 3 m³/dia e Tempo de Retenção Hidráulica estimado entre 30 – 50 dias.

Amostras compostas de efluentes ($n=3$ amostras), cada uma de 1 L, foram coletadas em duas campanhas amostrais, em outubro de 2019 e em outubro de 2020, as amostras da primeira coleta foram mixadas em um único container, o mesmo ocorreu com as da segunda coleta. Amostras foram transportadas até o Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) - MIP-CCB-UFSC, sob refrigeração (aproximadamente 10°C). Foi realizada a avaliação físico-química das amostras frente aos parâmetros de pH, nitrogênio amoniacal total (N-NH₃) e média da temperatura amostral na coleta (APHA, 2017). Todos estes ensaios foram realizados em parceria com a Embrapa Suínos e Aves. A Tabela 1 resume os resultados dos parâmetros físico-químicos das amostras de efluentes suinícolas.

Tabela 1: Média e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos das amostras de efluentes suinícolas e ambiente - coleta 1 (2019) e 2 (2020).

Parâmetro	Coleta 1 (2019)	Coleta 2 (2020)
T. Amostra (°C)	20,0±1,8	22,0±2,8
T. Ambiente (°C)	22,0±2,5	24,0±1,5
pH	7,5±0,2	7,5±0,3
N-NH ₃ (mg/L)	890,0±215,0	763,0±145,0

3.2 SEMENTES DE *M. oleifera*

Sementes de *Moringa oleifera* foram obtidas comercialmente da Caiçara Comércio de Sementes LTDA (Lote: 04, safra 2016), gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia e Bioprospecção Tecnológica (LMBT) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), coordenado pela Profa. Dra. Maria Célia da Silva Lanna. As sementes íntegras da planta possuem um envoltório não membranoso e uma membrana alada que circunda a semente conforme a Figura 3. Não foi possível identificar a região de cultivo e especificidades do solo para melhor datação da influência ambiental e nutricional no experimento.



Figura 3: Sementes de *M. oleifera* íntegras. Indicando as membranas aladas (indicadas por “1” em vermelho), seu envoltório não membranoso (indicadas por “2” em azul).

3.3 AVALIAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS ENTÉRICOS VIRAIS

3.3.1 Vírus entéricos

Para a concentração de ácidos nucleicos das amostras, as quais haviam sido previamente inoculadas com 3×10^6 HAdV-5 (utilizado como controle interno), foi utilizado o protocolo de extração pelo Kit PureLink® Viral RNA/DNA, Invitrogen (Life Technologies). De acordo com a metodologia foi colhido 200 μ L das amostras (em cada tratamento em seu respectivo tempo), adicionado 25 μ L de Proteinase K para exposição do material nuclear, e seguido por lavagens

e transferências de colunas até a obtenção do concentrado viral. O concentrado de material genético foi armazenado à - 20 °C para sua amplificação e quantificação viral foi realizada pelo método de PCR (Reação da Cadeia da Polimerase) em tempo real (qPCR).

A quantificação de ácidos nucleicos virais foi feita pelo método de qPCR de acordo com Hundesa *et al.* (2009), Opriessnig *et al.* (2003), Jothikumar *et al.* (2006) e Zeng *et al.* (2008), visando a detecção e quantificação PAdV, PCV-2, HEV e RV-A, respectivamente. Como controle interno viral utilizou-se o HAdV-5, o qual foi detectado de acordo com Hernroth *et al.* (2002). Para vírus de RNA, como foi o caso do RV-A e HEV, foi utilizado o QIAGEN OneStep RT-PCR Kit, contendo a transcriptase reversa para a síntese do cDNA para a reação usando RT-qPCR em único estágio. Plasmídeos contendo os fragmentos gênicos dos vírus avaliados foram utilizados em diluição seriada para a formação da curva padrão. Todas as análises contaram com controle negativo e foram realizadas em placas de 96 cavidades (MicroAmp Applied Biosystems), no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

3.3.2 Análises de *E. coli*

A análise e quantificação de *E. coli* foi realizada por meio de isolamento direto em Ágar seletivo e diferencial MacConkey (frequentemente utilizado para diferenciar vários bacilos gram-negativos capazes de fermentar a lactose, produzindo colônias rosas). O efluente foi diluído seriamente na base 10 em tampão fosfato salino 1 X (pH 7,5). Um total de 100 uL de cada diluição até na diluição de 100 mil vezes foi plaqueado em condições assépticas e as placas foram incubadas a 37°C durante 24 h. A contabilização deu-se em Unidade Formadora de Colônia (UFC) /mL.

3.4 ANÁLISE DE TURBIDEZ POR ESPECTROFOTOMETRÍA ÓPTICA

Para fins de análises de turbidez dos efluentes, realizou-se a avaliação espectral da densidade óptica (DO) utilizando o aparelho SpectraMax® M2°. As leituras foram realizadas na faixa de 540 nm, usando 200µL de efluente em placas de 96 cavidades, em quadruplicatas. Usualmente o teste de turbidez em análises microbiológicas são realizadas por meio de um turbidímetro, porém, a leitura por espectrofotometria continua a ser aceita como um método alternativo ao aparelho (MAIA *et al.*, 2016; KOCH *et al.*, 2014).

3.5 ANÁLISE DO POTENCIAL HIDROGENIÔNICO

Os efluentes tiveram seus pH aferidos em pHmetro modelo KASVI, modelo K39-2014B) ou usando fita de papel indicador especial - Merck®.

3.6 DESENHO EXPERIMENTAL

Realizaram-se três ensaios para alcançar os respectivos objetivos deste estudo: Ensaio 1 (Piloto investigativo com sementes íntegras de *M. oleifera* (SIMO); Ensaio 2 e 3 (ensaios dependentes usando MASMO seguido de sedimentação, respectivamente) - Ver Figura 4 para visualização da confecção dos diferentes ensaios descritos nas Sessões 3.6.1, 3.6.2 e 3.6.2.1.

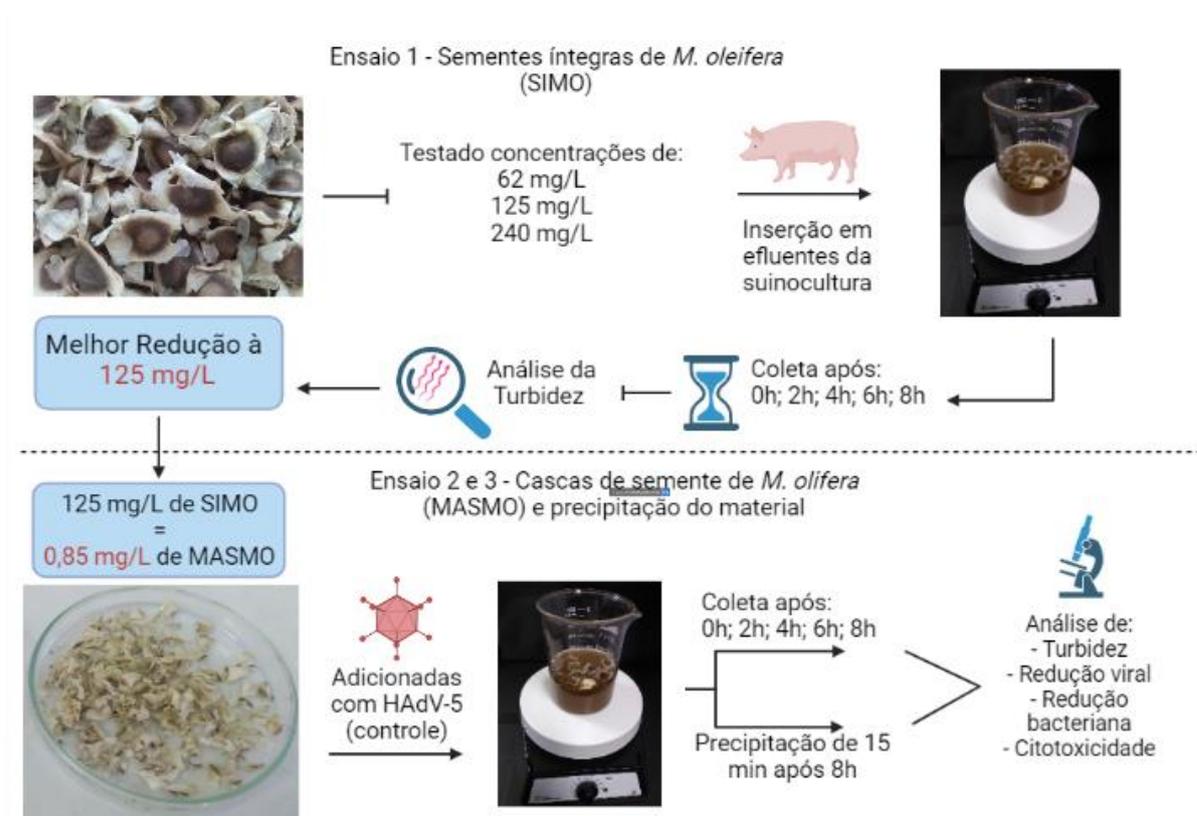


Figura 4: Fluxograma dos Ensaios 1, 2 e 3.

3.6.1 Ensaio 1: Piloto investigativo usando semente íntegra de *M. oleifera* (SIMO)

Efluentes da suinocultura foram segregados em frascos de vidro em um volume de 200 ml cada, em réplicas experimentais, em dois experimentos independentes. Neste piloto avaliou-se a capacidade de sementes íntegras reduzirem a turbidez em efluentes da suinocultura. Para tal fim, sementes íntegras foram adicionadas na concentração de 62 mg/L, 125 mg/L e 240 mg/L, considerando concentrações similares em estudos prévios da literatura (BHUPTAWAT *et al.*, 2007). O efluente foi mantido em agitação constante (150 RPM-min), em temperatura ambiente de 23°C (Figura 5). Amostras de 1-4 ml foram retiradas para análises de turbidez considerando intervalos de 0, 2, 4, 6 e 8 h de tratamento. Controles não tratados, foram igualmente avaliados. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas experimentais independentes.

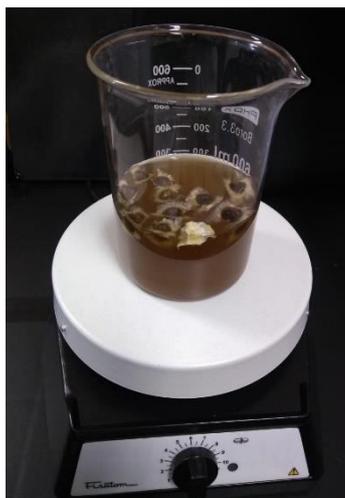


Figura 5: Sementes íntegras imersas no efluente sob agitação contínua (ensaio 1).

3.6.2 Ensaio 2: Tratando efluente suinícola com membrana alada de *M. oleifera* (MASMO)

Para fins de estudo da hipótese de que a membrana alada da casca da semente possui capacidade de adsorção/redução microbiana, realizou-se a segregação de tal membrana de cada unidade de semente individualizada. Em virtude de que os resultados do ensaio 1 apresentaram melhor redução da turbidez dos efluentes tratados usando a concentração de 125 mg/L de sementes íntegras, utilizou-se esse quantitativo para a extração mecânica das membranas

aladas de cada grão, rendendo 0,85 mg/L de membranas aladas de sementes de *M. oleifera* (MASMO) – Figura 6.



Figura 6: Comparação entre a semente de *Moringa oleifera* (A: placa à esquerda) e sua membrana “alada” (B: placa à direita), onde o volume de membranas da imagem corresponde diretamente às sementes descascadas em uma relação de 2,5g de sementes para 0,17 g de membranas aladas.

Os ensaios foram conduzidos nas mesmas condições que o ensaio 1, utilizando efluentes da suinocultura sabidamente negativo para PAdV, RV-A e HEV, mas positivo para PCV-2. É deduzido que a amostra era ausente de RV-A devido a tal vírus se comumente encontrado em leitões de 1 a 3 semanas de idade, sendo que as amostras foram extraídas de uma granja de terminação, havendo somente animais adultos nesta etapa (MARTHALER *et al.*, 2014). HEV também possui atividade sazonal, possuindo diferentes graus de estabilidade e persistência no ambiente de acordo com as condições ambientais, neste caso é possível que o HEV não se encontrava ativo no sistema quando as coletas foram realizadas, não necessariamente indicando que a granja estava ausente de HEV (LU *et al.*, 2013).

Para análises bacterianas, utilizou-se como modelo *E. coli*, sendo inoculado artificialmente 3×10^6 UFC/mL de *E. coli* ATCC13706 previamente produzida em caldo Brain Heart Infusion Broth (BHI), tal inoculação foi realizada devido à baixa presença de tal espécie na amostra, havendo menos de 1log de *E. coli* nativas nas amostras. Como controle interno viral do processo, utilizou-se o HAdV-5, previamente produzido em cultura celular no LVA, o qual foi inoculado na concentração de 3×10^6 PFU/mL.

Nesse experimento o tratamento baseou-se exclusivamente em MASMO, analisando-se aqui a redução de turbidez, PCV-2 natural e *E. coli* inoculada, ambos microrganismos abundantes em efluentes da suinocultura e modelos microbianos para estudos (WEN *et al.*, 2020; CROXEN *et al.*, 2013; OPRIESSNIG *et al.*, 2020).

3.6.2.1 Ensaio 3: Sedimentação natural pós-tratamento MASMO

Adicionalmente, após 8 h de tratamento na condição MASMO (**Ensaio 2**), realizou-se ensaio de sedimentação das membranas e verificação da redução de vírus e bactérias no efluente tratado. Efluentes foram colocados em repouso para processo de sedimentação natural em tempo fixo de 15 min. Após tal intervalo, 5 mL de amostras do sobrenadante foram recolhidas e analisadas de acordo com turbidez, *E.coli* e vírus entéricos (PCV-2 e HAdV-5), conforme o realizado com as amostras anteriores, considerando efluentes suínolas tratados e não tratados com MASMO.

3.6.3 CITOTOXICIDADE DOS EFLUENTES TRATADOS COM SIMO E MASMO

Ensaio de citotoxicidade do efluente pós-tratamento com SIMO e MASMO foram conduzidos em cultura celular animal, usando a linhagem VERO (oriundas de rim de macaco verde da África - ATCC® CCL81™). Para o ensaio, o efluente controle e os tratados com MAMO e SIMO foram previamente adicionados com 1% de antibióticos (Penicilina/Streptomicina/Anfotericina) e diluídos (1:32; 1:64, 1:128, 1:264). As células VERO previamente cultivadas foram alocadas em placas de 24 cavidades, foram lavadas com solução salina (PBS pH 7,0) e receberam 100 µl das respectivas diluições em duplicata, sendo então incubadas em estufa de CO₂ a 37°C durante 1 h. Em seguida, o sobrenadante foi aspirado e 1 mL do meio de manutenção (Meio Mínimo Essencial - MEM 1X, 1% Antibióticos, 2% Soro Fetal Bovino) foi adicionado em cada poço. As placas foram então levadas novamente à estufa de cultura celular animal, na qual permaneceram por 12 h (afim de evitar grande propagação de fungos e bactérias, bem como viral). Após esse período houve remoção do meio de cultura, lavagem celular com solução de PBS e coloração de células viáveis usando 250 µl de preto de naftaleno. A citotoxicidade aparente foi avaliada por meio de comparação da viabilidade celular entre células controle e àquelas desafiadas com os efluentes da suinocultura.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Análises estatísticas de variação entre os grupos experimentais foram conduzidos no GraphPad Prisma 5.0 (EUA) usando o teste ANOVA e regressão linear, sendo consideradas diferenças significativas quando $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ENSAIO 1 - SEMENTE ÍNTEGRA (SIMO)

Nas análises do ensaio 1 observou-se a maior redução da turbidez utilizando 125 mg/L de SIMO. A Tabela 2 demonstra os resultados da análise de turbidez por espectrofotometria óptica, havendo uma redução máxima de 53,78% da turbidez usando 125 mg/L de sementes.

Tabela 2: Média dos resultados da turbidez via leitura espectométrica em SpectraMax ® M2° à 540 nm e a redução percentual após os tratamentos usando sementes íntegras de *M. oleifera*.

Tempo (horas)	62 mg/L	125 mg/L	240 mg/L	Controle não tratado
2	1,85	2,51	2,04	2,31
4	1,76	1,50	1,94	2,31
6	1,63	1,07	1,47	2,50
8	1,49	1,16	1,41	2,09
Redução Total (%)	19,45	53,78	30,8	9,5

Houve uma tendência linear de decaimento entre os tempos 2 e 6 h com redução significativa no tratamento SIMO usando 125 mg/L – Figura 7.

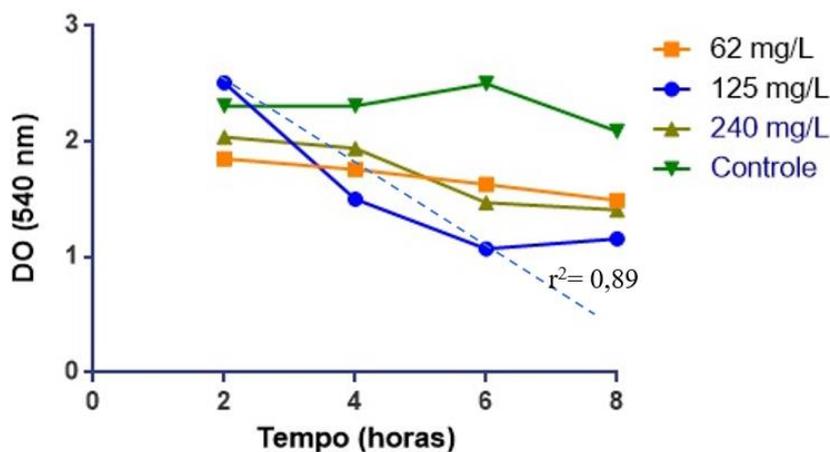


Figura 7: Redução com tendência linear de decaimento da turbidez no tratamento SIMO usando 125 mg/L.

As sementes íntegras podem ter atuado na agregação de sólidos em suspensão reduzindo a turbidez aparente dos efluentes em relação ao controle. Além disso, o estudo de toxicidade não apresentou efeitos citotóxicos nas diluições 1:128 e 1:256, porém apresentando citotoxicidade nas diluições 1:32 e 1:64 do efluente tratado em comparação com o controle em células VERO (Figura 8).

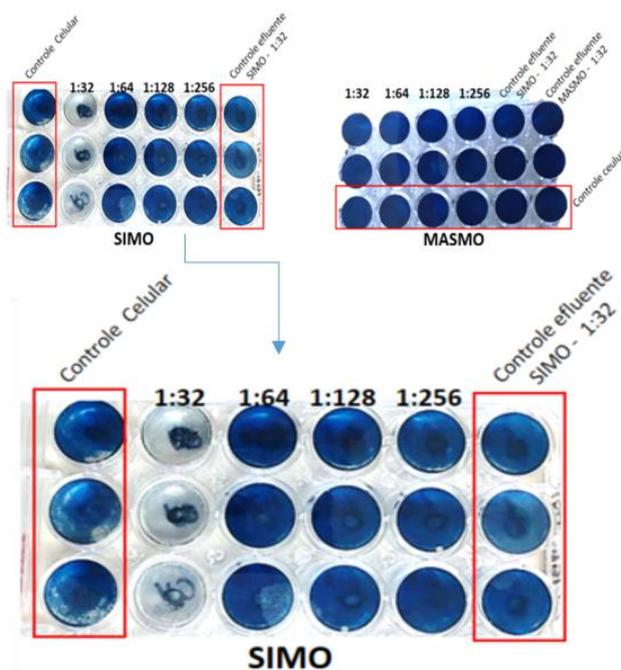


Figura 8: Citotoxicidade aparente de SIMO em células VERO. Diluição 1:128 e 1:256 não foram citotóxicas, já nas diluições 1:32 e 1:64 houve citotoxicidade.

Isso é um fato inédito, pois não usamos semente maceradas e sim íntegras, evitando a maior liberação de compostos tóxicos, porém mostrando sua capacidade na redução de turbidez amostral. Estudos prévios demonstram a efeitos citotóxicos, mesmo em altas diluições, superiores a 1:1000 em diferentes organismos quando utiliza-se extratos macerados de sementes de *M. oleifera*, incluindo ensaios *in vitro* e *in vivo* (*Cyprinus carpio* (carpa-comum)) - (AL-ANIZI *et al.*, 2014 e KAVITHA *et al.* 2012).

Vendo que o tratamento com SIMO demonstrou redução de indicativos de contaminantes, neste caso a turbidez do efluente, foi realizado os ensaios 2 e 3 para avaliar se tal resultado é devido primariamente a presença da membrana, bem como passou-se a questionar se haveria eficiência em reduzir patógenos entéricos.

4. 2 ENSAIOS 2 E 3 - TRATANDO EFLUENTE SUINÍCOLA COM MEMBRANA ALADA DE *M. oleifera* (MASMO) SEGUIDO DE SEDIMENTAÇÃO

→ Turbidez

A Figura 9 apresenta a turbidez de efluente tratado e não tratado com MASMO em até 8 h. Entre 6 e 8 h a curva do controle interpola-se com a curva do tratado, demonstrando uma potencial tendência de redução da turbidez. No entanto não houve redução significativa da turbidez do efluente suinícola tratado com MASMO até as primeiras 8 h de avaliação.

A variação de turbidez, tanto no controle quanto no tratamento, pode ser devido a replicação bacteriana no efluente. Tal comportamento, porém, não foi o mesmo obtido no Ensaio 1, podendo haver influência de inibição bacteriana da possível liberação de compostos da semente íntegra a qual não são encontrados nas membranas aladas.

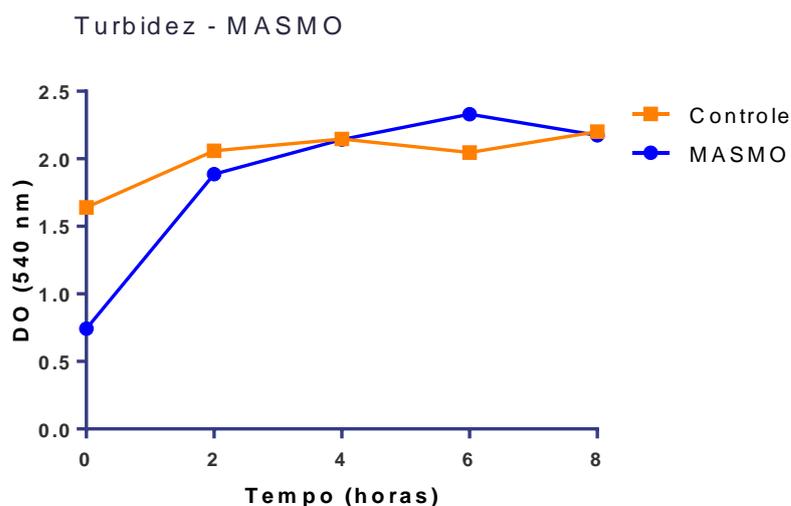


Figura 9: Turbidez de efluente tratado e não tratado com MASMO em até 8 h.

No entanto após sedimentação de 15 minutos o efluente tratado com MASMO teve redução de 69% em sua turbidez, quando comparado ao controle não tratado (Tabela 3). Isso representa um importante achado do ponto de vista operacional do tratamento de MASMO seguido de sedimentação do efluente, visando maior remoção de sólidos suspensos.

Tabela 3: Redução da turbidez do efluente suinícola após MASMO seguido de sedimentação de 15 min em relação ao controle não tratado.

Tempo (15min)	MASMO-Sedimentação	Controle não tratado
2	0,96±0,06	1,39±0,29
Redução Total (%)	69,06	

Examinando os dados de turbidez e comparando com estudos anteriores os quais utilizaram extratos da semente de *M. oleifera* (DELELEGN *et al.* 2018; BAPTISTA *et al.*, 2017), um novo tipo de amostragem foi proposta, considerando o fenômeno de sedimentação. Esse teste não foi realizado no primeiro ensaio porque usando SIMO havia floculação das sementes e não sedimentação como ocorrido em MASMO, justificável pela densidade da semente (Figura 10).

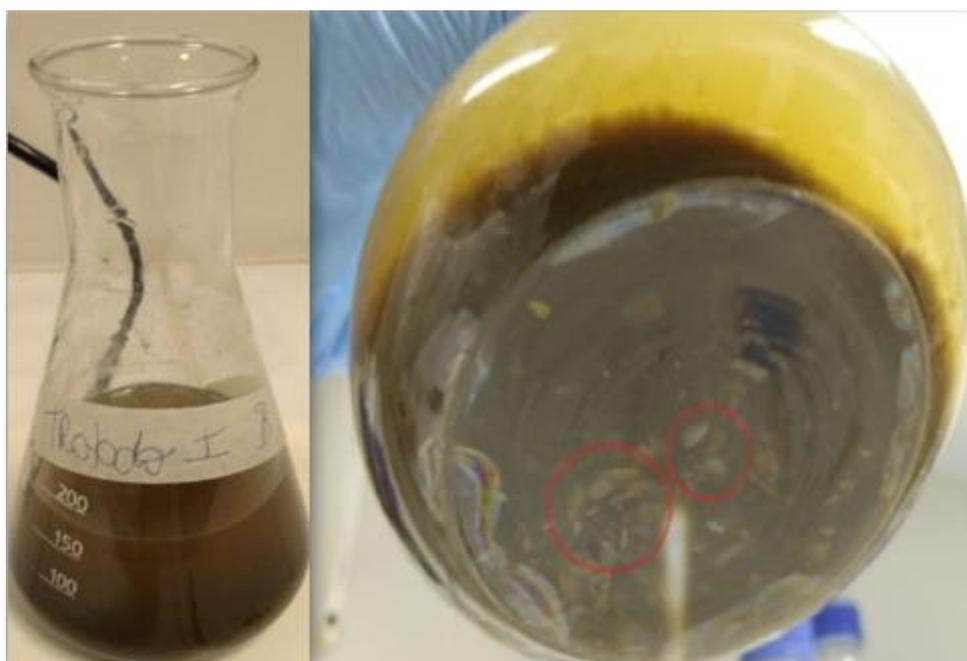


Figura 10: Precipitação observada em MASMO após tratamento de 8 h seguido de 15 min de repouso. Círculos vermelhos indicam concentrações de membranas aladas da semente (objetos de cor clara).

→ Redução viral e bacteriana

Patógenos podem se propagar por meio de efluentes e matéria contaminada e se estender por toda uma cadeia produtiva de alimentos (KLOUS *et al.*, 2016; GARCÍA *et al.*, 2020; CROXEN *et al.*, 2013). Para evitar surtos constantes causados por contaminações externas é necessário que os efluentes liberados por granjas de animais sejam propriamente tratados, para evitar assim, que patógenos espalhem-se na granja e sistemas adjacentes que podem entrar em contato com o mesmo. Em especial, patógenos virais são mais resistentes a tratamentos e condições ambientais do que os bacterianos, sendo mais dificilmente detectados em testes microbiológicos tradicionais como pela presença de coliformes totais (LOPMAN *et al.*, 2004; SCALLAN *et al.*, 2011). Em granjas de suínos PCV-2 e *E. coli*, incluindo as diarreio gênicas, são importantes contaminantes prevalentes, causando grandes danos nas produções (OPRIESSNIG *et al.*, 2020, CROXEN *et al.*, 2013; STROMBERG *et al.*, 2018).

Quando PCV-2 foi avaliado durante o tratamento do efluente da suinocultura usando MASMO, entre 4-8 h houve uma redução viral significativa de 3 logs (99,9%) em relação ao controle não tratado. Quanto ao HAdV-5, usado como controle viral interno, houve uma redução branda e não significativa de 1 log após 6 h de tratamento usando MASMO (Figura

11). Considera-se ainda que o HAdV-5 foi inoculado artificialmente na amostra para fins de controle viral; já o PCV-2 naturalmente ocorre nessas amostras, estando aclimatado e assim (possivelmente) possuindo maior resistência aos fatores ambientais do efluente, proporcionando uma maior titulação, e conseqüentemente, maior redução frente à MASMO. A redução viral pode estar relacionada com a ampla afinidade de vírus não envelopados com compostos orgânicos em suspensão, podendo por um lado, auxiliar na sedimentação viral e predação por protozoários ali presentes, bem como, inferir em uma maior estabilidade destes vírus ao gerar o efeito agregativo (AL-BADAI e SHUHAIMI-OTHMAN 2015; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2000; CHATURVEDI *et al.*, 2004).

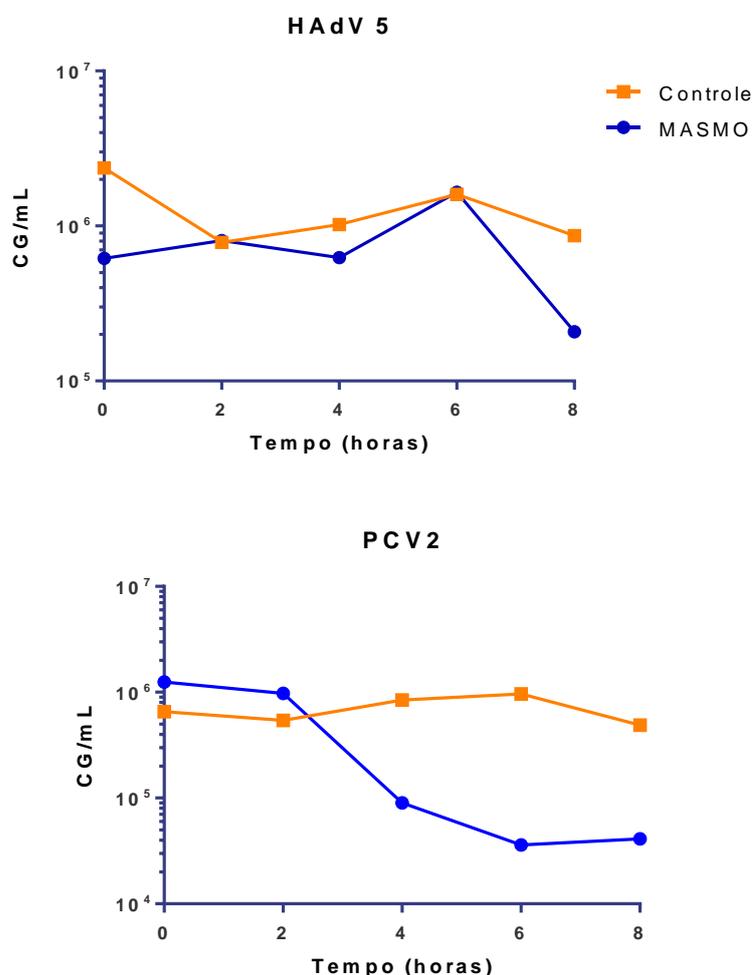


Figura 11: Média detectada de HAdV-5 e PCV-2 após tratamento com MASMO, onde o controle e tratamento (MASMO) estão representados em cores laranja e azul, respectivamente.

Cabe ressaltar que a inibição e/ou redução de PCV-2 possui grande importância no âmbito de se obter granjas suínolas que evitem retro-infecção pelo próprio sistema, visto seu alto potencial de propagação. Tal vírus é amplamente distribuído em criações de suínos no mundo, sendo raro os casos no qual há granjas livres do patógeno. PCV-2 ocasiona diversas lesões teciduais e enfraquece o organismo, sendo que tal vírus pode provocar infecção em todas as fases de criação animal, independente do estado imunológico (OPRIESSNIG *et al.*, 2020). Neste sentido, membranas aladas desempenham importante papel em um possível fenômeno adsorativo viral nas sementes de *M. oleifera* – demonstrado nos experimentos usando MASMO.

Os ensaios de citotoxicidade demonstraram que MASMO não apresentou efeitos negativos sob células animais (VERO), mesmo em diluição baixas (1:32; 1:64; 1:128 e 1:256), do efluente tratado após 8 h em comparação com o controle não tratado neste mesmo tempo (Figura 8).

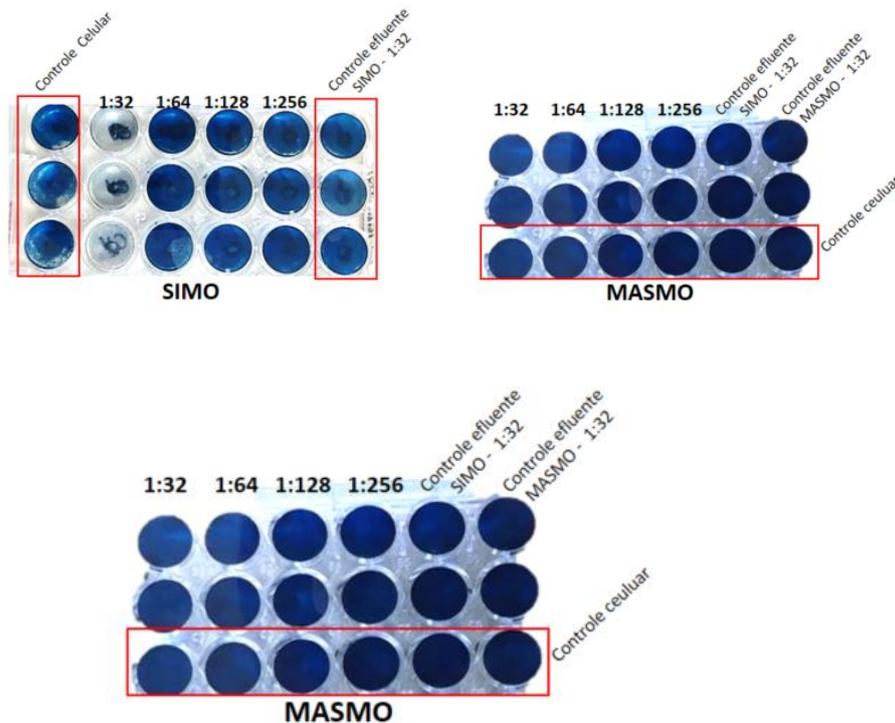


Figura 12: Citotoxicidade aparente de MASMO em células VERO. Diluições não apresentaram efeitos citotóxicos nas diluições 1:32, 1:64, 1:128 e 1:256.

É importante ressaltar que certos peptídeos encontrados no interior das sementes de *M. oleifera* apresentaram facilidade em se ligar em partículas negativamente carregadas de

característica coloidal, como por exemplo, partículas virais (BARAKAT *et al.*, 2016), havendo redução viral significativa em diferentes filtros tratados com extratos macerados das sementes, sejam eles compostos de biomateriais ou areia (XIONG *et al.*, 2017; FRANCISCO *et al.*, 2014). Porém nossos resultados apontam um possível uso simplificado e escalonável, apenas das membranas residuais de tais semente, sem aparente citotoxicidade, evitando-se o processo de maceração que pode interferir na toxicidade da matriz ambiental tratada.

No que se referiu à *E. coli* avaliada em MASMO não houve redução significativa, havendo apenas às 8 h de tratamento a interpolação das curvas de efluentes não tratado e tratado, o que indicaria um possível início de inativação ou redução bacteriana (Figura 13). Observa-se uma flutuação nos valores de *E. coli* ao longo das 8 horas experimentais. Tal flutuação pode ser devido à influência da adição de nutrientes no efluente comparado ao controle, hipotetizando que entre 4 e 6 h MASMO pode ter auxiliado no desenvolvimento bacteriano.

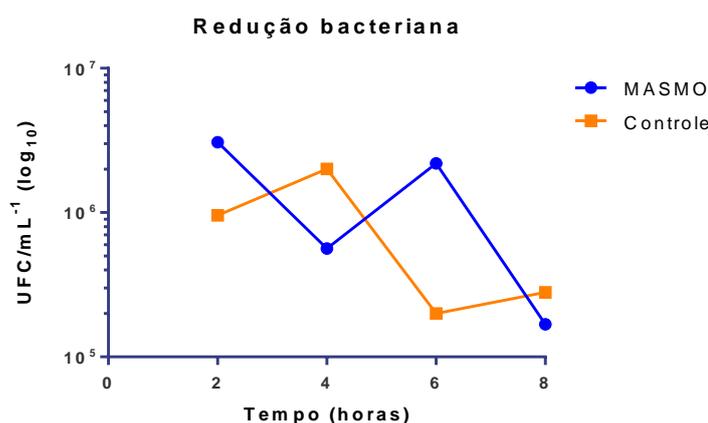


Figura 13: Variação em unidades formadoras de colônias de *E. coli* após tratamento com MASMO. Controle e tratamento (MASMO) estão representados respectivamente em laranja e azul.

Considerando o fenômeno de sedimentação após 8 h de tratamento MASMO houve redução de 90% de *E. coli*, PCV-2 e HAdV-2. Explica-se que com a precipitação de MASMO ao longo na coluna de efluente houve uma maior sedimentação viral ou sua inativação, comprovando assim o efeito agregativo ou inativatório em relação aos controles não tratados com MASMO e igualmente sedimentados.

Essa possível atração deve-se a capacidade adsortiva de patógenos às membranas que podem desempenhar um importante papel como biofiltros, como foi demonstrado por Xiong *et al.* (2017) a qual aumentou significativamente a eficácia a retenção de impurezas d'água após a

adição de sementes de *M. oleifera* em filtros de areia. Assim como Francisco *et al.* (2014), a qual aumentou a eficiência de biofiltros compostos orgânicos como carvão e folhas de eucalipto e bambu, após a adição do extrato do interior da semente de *M. oleifera*. Ao invés do extrato do interior da semente, a qual é comumente utilizado para aumentar capacidades de retenção de partículas em suspensão, MASMO poderia ser possivelmente utilizado como aditivo em diferentes tipos de filtros, utilizando tal material que seria normalmente descartado.

Em suma, com o aumento de 2,5 vezes do número total de suínos entre 1960 e 2010 (FAO, 2019) e com a perspectiva da população mundial de alcançar 9,6 bilhões de indivíduos em 2050 (UN, 2013), demandando proteína para fonte nutricional, bem como produção de grãos, cada vez mais o aspecto sanitário e epidemiológico se torna necessário na reciclagem de efluentes animais. Nisso, tratamentos adicionais acessíveis para uma própria eliminação de vírus e bactérias presentes no sistema de digestão anaeróbia, são de grande interesse.

Neste contexto, resíduos de sementes de *M. oleifera* como aqui estudado (resíduos da semente - membrana alada) podem ser de grande utilidade, por se tratar de um recurso barato, biodegradável, comumente descartado e a qual apresenta capacidade na redução de patógenos virais e bacterianos.

5. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram o potencial do uso de membranas aladas de cascas de sementes de *M. oleifera* seguido de sedimentação (membranas usualmente descartadas na produção de alimentos e medicamentos), alcançando a redução de patógenos bacterianos e virais em efluentes da suinocultura, para fins de reciclo hídrico para fins de biofertilização de plantas e solos.

6. DEMAIS ATIVIDADES LABORATORIAIS REALIZADAS NO PERÍODO DE TCC

- Participação e exposição de trabalhos no XXX e XXXI Congresso Brasileiro de Virologia. Realizados no período de 2019 e 2020.
- Apresentação de pôster XXX Congresso Brasileiro de Virologia, 2019:
 - “Viruses and Bacteria Adsorption from Swine Wastewater Using *Moringa oleifera* Seed Shell”.
 - “Brazilian Cattle Bacteriophages Isolation”.
 - “Prospection of New *Enterobacter aerogenes* Bacteriophages for Bacteria Control Purposes”
- Participação da rede de divulgação científica focada em virologia, RedeVirall Brasil.
- Participação como organizador do “Curso de Métodos moleculares e de cultura celular para diagnóstico de vírus entéricos em amostras ambientais”. No período de 2020.
- Participação como organizador e ministrante do "Minicurso de Biologia e Biotecnologia Viral”, da XX Semana Acadêmica da Biologia da Universidade Federal de Santa Catarina”. Realizado no período de 2019.
- Participação no capítulo “A saúde da água mediada pela redução de contaminantes do ambiente aquático e recirculação hídrica” para o livro “Água para o desenvolvimento regional: análises e propostas para a gestão das águas no território do Alto Uruguai Catarinense”
- Participação na publicação do artigo “Hepatitis E virus in manure and its removal by Psychrophilic Anaerobic Biodigestion in Intensive Production Farms, Santa Catarina, Brazil, 2018-2019” (SOUZA *et al.*, 2020) – Qualis A CAPES.
- Participação na Publicação do artigo “A review on alternative bioprocesses for removal of emerging contaminants” (VIANCELLI *et al.*, 2020) – QUALIS A CAPES.

7. REFERÊNCIAS

ACHESON, D. et al. *Campylobacter jejuni* Infections: update on emerging issues and trends. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 32, n. 8, p. 1201-1206, 15 abr. 2001. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/319760>.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS - ANA. **Atlas esgotos: despoluição de bacias hidrográficas**. Agência Nacional de Águas, Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental. Brasília: ANA, 2017a. 88 p.

AKIN, E.W., et al (1971). Enteric viruses in ground and surface waters: a view of their occurrence and survival. In: *Water Quality: Occurrence and Control*, Thirteenth Water Quality Conference Proceeding, University of Illinois, Urbana-Champaign, pp. 59–74

AL-BADAI F, SHUHAIMI-OTHTMAN M (2015) Water pollution and its impact on the prevalence of antibiotic-resistant *E. coli* and total coliform bacteria: a study of the Semenyih River, Peninsular Malaysia. **Water Qual Exp Health** 7:319–330

AL-ANIZI, Ali Adnan et al. Toxicity assessment and modelling of *Moringa oleifera* seeds in water purification by whole cell bioreporter. **Water Research**, [S.L.], v. 56, p. 77-87, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.045>.

AL-SAHARI, Mohammed *et al.* Natural Coagulates for Wastewater Treatment; A Review for Application and Mechanism. **Prospects Of Fresh Market Wastes Management In Developing Countries**, [S.L.], p. 17-31, 2020. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-42641-5_2.

AMARAL, André C. do et al. Swine effluent treatment using anaerobic digestion at different loading rates. **Engenharia Agrícola**, [S.L.], v. 34, n. 3, p. 567-576, jun. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-69162014000300019>.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. “**Proibidos alimentos com *Moringa oleifera***” **Resolução RE 1.478/2019**, de 4 de maio de 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/proibidos-alimentos-com-moringa-oleifera/219201?p_p_auth=VVIavxiK&inheritRedirect=false&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fnoticias%3Fp_p_auth%3DVVIavxiK%26p_p_id%3D101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3D_118_INSTANCE_KzfwbgagUNdE__column-2%26p_p_col_count%3D2> Acessado em: 20 julh. 2019.

APPELS, Lise et al. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. **Progress In Energy And Combustion Science**, [S.L.], v. 34, n. 6, p. 755-781, dez. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peccs.2008.06.002>.

AUER, Agathe et al. Agricultural anaerobic digestion power plants in Ireland and Germany: policy and practice. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, [S.L.], v. 97, n. 3, p. 719-723, 28 set. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.8005>.

BAPTISTA, Aline Takaoka Alves et al. Protein fractionation of seeds of *Moringa oleifera* lam and its application in superficial water treatment. **Separation And Purification Technology**, [s.l.], v. 180, p.114-124, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2017.02.040>

BARAKAT, Hassan et al. Physicochemical Properties of *Moringa oleifera* Seeds and Their Edible Oil Cultivated at Different Regions in Egypt. **Food And Nutrition Sciences**, [S.L.], v. 07, n. 06, p. 472-484, 2016. Scientific Research Publishing, Inc., <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2016.76049>.

BELLI FILHO, P. Stockage et odeurs des dejections animales cas du lisier de porc. Tese (Doutorado). Univesrsidade de Rennes I. France. 181 p, 1995

BEZERRA, Charleston de O. *et al.* Assessment of the use of *Moringa oleifera* seed husks for removal of pesticide diuron from contaminated water. **Environmental Technology**, [S.L.], v. 41, n. 2, p. 191-201, 10 jul. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09593330.2018.1493148>.

BHUPTAWAT, Hitendra et al. Innovative physico-chemical treatment of wastewater incorporating *Moringa oleifera* seed coagulant. **Journal Of Hazardous Materials**, [S.L.], v. 142, n. 1-2, p. 477-482, abr. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.08.044>.

BIDAWID, S., et al. “Norovirus Cross-Contamination during Food Handling and Interruption of Virus Transfer by Hand Antisepsis: Experiments with Feline Calicivirus as a Surrogate†”. **Journal of Food Protection**, vol. 67, nº 1, janeiro de 2004, p. 103–09. DOI.org (Crossref), doi:10.4315/0362-028X-67.1.103.

BLOUNT, Zachary D *et al.* The unexhausted potential of *E. coli*. **Elife**, [S.L.], v. 4, p. 1-11, 25 mar. 2015. ELife Sciences Publications, Ltd. <http://dx.doi.org/10.7554/elife.05826>.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. Diretriz Nacional do Plano de Amostragem da Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano. 2006. Disponível em:<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretriz_nacional_plano_amostragem_agua.pdf> Acessado em 20 julh. 2019.

BRANDT, Malcolm J. *et al.* Chemistry, Microbiology and Biology of Water. **Twort'S Water Supply**, [S.L.], p. 235-321, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-08-100025-0.00007-7>.

BUKOWSKI, E. **Houston Chronicle**. 1986.

CHASNYK, O. et al. Historical, technical and economic aspects of biogas development: case of poland and ukraine. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [S.L.], v. 52, p. 227-239, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.122>.

CHATTOPADHYAY, Sandip et al. Forces dictating colloidal interactions between viruses and soil. **Chemosphere**, [S.L.], v. 41, n. 8, p. 1279-1286, out. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0045-6535\(99\)00519-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0045-6535(99)00519-6).

CHATURVEDI U.C. Shrivastava R. Upreti R.K. (2004) Viral infections and trace metals: a complex interaction. *Curr. Sci.* 87.

CHOLLOM S. C. "Investigation of aqueous extract of Moringa oleifera lam seed for antiviral activity against newcastle disease virus in ovo". **Journal of Medicinal Plants Research**, vol. 6, n° 22, junho de 2012. DOI.org (Crossref), doi:10.5897/JMPR12.394.

CROXEN, M. A. et al. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia coli. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 822-880, 1 out. 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00022-13>.

DELELEGN, A., Sahile, S. & Husen, A. Water purification and antibacterial efficacy of Moringa oleifera Lam. *Agric & Food Secur* 7, 25 (2018) doi:10.1186/s40066-018-0177-1

DOYLE, Michael P. *et al.* Opportunities for mitigating pathogen contamination during on-farm food production. **International Journal Of Food Microbiology**, [S.L.], v. 152, n. 3, p. 54-74, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.037>.

FAO. FAO Statistical Database. 2009. Disponível em:<<http://faostat.fao.org/>> Acessado em 20 julh. 2019.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO. 2019 Disponível em:<<http://www.fao.org/traditional-crops/moringa/en/>> Acessado em 20 julh. 2019.

FERREIRA, Douglisnilson de Moraes et al. WASTEWATER USE IN AGRICULTURE: ANALYTICAL LIMITS OF SEWAGE FOR IMPACT CONTROL IN BRAZIL. **Revista Caatinga**, [s.l.], v. 32, n. 4, p.1048-1059, dez. 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252019v32n421rc>.

FONGARO, G. et al. Human and animal enteric virus in groundwater from deep wells, and recreational and network water. **Environmental Science And Pollution Research**, [s.l.], v. 22, n. 24, p.20060-20066, 25 ago. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-015-5196-x>.

FONGARO, G. et al. Utility of specific biomarkers to assess safety of swine manure for biofertilizing purposes. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 479-480, p. 277-283, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.004>.

FONGARO, G. Higienização de dejetos suínolas visando reciclo agrícola sanitariamente seguro. 2016. Tese. (Doutorado em Biotecnologia e Biociências. Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2016.

FRANCISCO, João P. *et al.* Evaluation of the effect of the seed extract of Moringa oleifera Lam over the efficiency of organic filters in wastewater treatment of dairy cattle

breeding. **Engenharia Agrícola**, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 143-152, fev. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-69162014000100015>.

GARCÍA, Nerea et al. Occurrence of Hepatitis E Virus in Pigs and Pork Cuts and Organs at the Time of Slaughter, Spain, 2017. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 10, p. 20-24, 28 jan. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.02990>.

GARCIA-FAYOS, B. et al. Use of Moringa oleifera in drinking water treatment: study of storage conditions and performance of the coagulant extract. **Desalination And Water Treatment**, [s.l.], v. 57, n. 48-49, p.23365-23371, 23 nov. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/19443994.2015.1117820>.

GIÁCOMAN-VALLEJOS, G. et al. Pathogen removal from domestic and swine wastewater by experimental constructed wetlands. **Water Science And Technology**, [S.L.], v. 71, n. 8, p. 1263-1270, 4 mar. 2015. IWA Publishing. <http://dx.doi.org/10.2166/wst.2015.102>.

GIBSON, Kristen E. et al. Detection of Bacterial Indicators and Human and Bovine Enteric Viruses in Surface Water and Groundwater Sources Potentially Impacted by Animal and Human Wastes in Lower Yakima Valley, Washington. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 77, n. 1, p. 355-362, 12 nov. 2010. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01407-10>.

GIGLIO, Osvalda de et al. Enteric Viruses and Fecal Bacteria Indicators to Assess Groundwater Quality and Suitability for Irrigation. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [s.l.], v. 14, n. 6, p.558-700, 24 maio 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph14060558>.

GONÇALVES JUNIOR, Affonso C. *et al.* Applicability of Moringa oleifera Lam. pie as an adsorbent for removal of heavy metals from waters. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 94-99, jan. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-43662013000100013>.

GUO, J. et al. Zinc Finger Structures in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Protein Facilitate Efficient Minus- and Plus-Strand Transfer. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 74, n. 19, p.8980-8988, 1 out. 2000. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.74.19.8980-8988.2000>.

GUAN, Tat Yee et al. Pathogen Survival in Swine Manure Environments and Transmission of Human Enteric Illness-A Review. **Journal Of Environmental Quality**, [S.L.], v. 32, n. 2, p. 383-392, mar. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.2134/jeq2003.3830>.

GRAHAM, D. Y. et al. Minimal infective dose of rotavirus. **Archives Of Virology**, [S.L.], v. 92, n. 3-4, p. 261-271, set. 1987. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf01317483>.

HERNROTH, Bodil E. *et al.* Environmental Factors Influencing Human Viral Pathogens and Their Potential Indicator Organisms in the Blue Mussel, *Mytilus edulis*: the first scandinavian report. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 68, n. 9, p. 4523-4533, set.

2002. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.68.9.4523-4533.2002>.

HESPANHOL, Ivanildo. Potencial de Reuso de Água no Brasil Agricultura, Industria, Municípios, Recarga de Aquíferos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, [s.l.], v. 7, n. 4, p.75-95, 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.21168/rbrh.v7n4.p75-95>.

HOA, Nguyen Thanh; HUE, Cao Thi. Enhanced water treatment by Moringa oleifera seeds extract as the bio-coagulant: role of the extraction method. **Journal Of Water Supply: Research and Technology-Aqua**, [s.l.], p.634-647, 19 set. 2018. IWA Publishing. <http://dx.doi.org/10.2166/aqua.2018.070>.

HUNDESA, A. et al. Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. **Journal Of Virological Methods**, [S.L.], v. 158, n. 1-2, p. 130-135, jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.02.006>.

HUSMAN, A.M. de Roda et al. Quantitative risk assessment for food- and waterborne viruses. **Viruses In Food And Water**, [S.L.], p. 159-175, 2013. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1533/9780857098870.2.159>.

JAMI, Mohammed Saedi *et al.* ELEMENTAL AND CHEMICAL COMPOSITION OF Moringa oleifera HUSK EXTRACTS. **Journal Of Chemical Engineering And Industrial Biotechnology**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 74-78, 1 maio 2019. Universiti Malaysia Pahang Publishing. <http://dx.doi.org/10.15282/jceib.v5i1.3897>.

JILANI, Nishat et al. Hepatitis E virus infection and fulminant hepatic failure during pregnancy. **Journal Of Gastroenterology And Hepatology**, [S.L.], v. 22, n. 5, p. 676-682, 18 abr. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1746.2007.04913.x>.

JINGURA, Raphael M. et al. Optimization of biogas production by anaerobic digestion for sustainable energy development in Zimbabwe. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [S.L.], v. 13, n. 5, p. 1116-1120, jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2007.06.015>.

JOTHIKUMAR, Narayanan *et al.* A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. **Journal Of Virological Methods**, [S.L.], v. 131, n. 1, p. 65-71, jan. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.07.004>.

KAVITHA, Chokkalingam et al. Toxicity of Moringa oleifera seed extract on some hematological and biochemical profiles in a freshwater fish, Cyprinus carpio. **Experimental And Toxicologic Pathology**, [S.L.], v. 64, n. 7-8, p. 681-687, nov. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2011.01.001>.

KHAN, M.A. et al. Comparing the value of bioproducts from different stages of anaerobic membrane bioreactors. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 214, p. 816-825, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.013>.

KIM, Hyeun Bum *et al.* Salmonellain Swine: microbiota interactions. **Annual Review Of Animal Biosciences**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 43-63, 8 fev. 2017. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-animal-022516-022834>.

KLOUS, Gijs *et al.* Human–livestock contacts and their relationship to transmission of zoonotic pathogens, a systematic review of literature. **One Health**, [S.L.], v. 2, p. 65-76, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.onehlt.2016.03.001>.

KOCH, Arthur L. *et al.* Growth Measurement. **Methods For General And Molecular Microbiology**, [S.L.], p. 172-199, 30 abr. 2014. ASM Press. <http://dx.doi.org/10.1128/9781555817497.ch9>.

KUNZ, A. *et al.*, 2005. Biodigestor para o tratamento de dejetos de suínos: influência da temperatura ambiente. **Comunicado Técnico, Embrapa/CNPISA**, vol. 416, pp. 1–5.

KUNZ, A. *et al.* Advanced swine manure treatment and utilization in Brazil. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 100, n. 22, p. 5485-5489, nov. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.039>.

LANATA, Claudio F. *et al.* Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children: a systematic review. **Plos One**, [S.L.], v. 8, n. 9, p. 1-13, 4 set. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0072788>.

LOPMAN, Ben A. *et al.* Epidemiology and Cost of Nosocomial Gastroenteritis, Avon, England, 2002–2003. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 10, n. 10, p. 1827-1834, out. 2004. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid1010.030941>.

LU, Y. H. *et al.* Seasonal pattern of hepatitis E virus prevalence in swine in two different geographical areas of China. **Epidemiology And Infection**, [S.L.], v. 141, n. 11, p. 2403-2409, 7 fev. 2013. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0950268813000113>.

MADRONA, Grasielle Scaramal *et al.* Evaluation of extracts of Moringa oleifera Lam seeds obtained with NaCl and their effects on water treatment. **Acta Scientiarum. Technology**, [S.L.], v. 34, n. 3, p. 1-5, 28 maio 2012. Universidade Estadual de Maringa. <http://dx.doi.org/10.4025/actascitechnol.v34i3.9605>.

MAIA, Margarida R. G. *et al.* Simple and Versatile Turbidimetric Monitoring of Bacterial Growth in Liquid Cultures Using a Customized 3D Printed Culture Tube Holder and a Miniaturized Spectrophotometer: application to facultative and strictly anaerobic bacteria. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 7, p. 1-12, 31 ago. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01381>.

MARTELLA, V. *et al.* Zoonotic aspects of rotaviruses. **Veterinary Microbiology**, [S.L.], v. 140, n. 3-4, p. 246-255, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.028>.

MARTHALER, Douglas *et al.* Rapid detection and high occurrence of porcine rotavirus A, B, and C by RT-qPCR in diagnostic samples. **Journal Of Virological Methods**, [S.L.], v. 209, p. 30-34, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.08.018>.

MATIC, Ivana *et al.* Investigation of medicinal plants traditionally used as dietary supplements: a review on *Moringa oleifera*. **Journal Of Public Health In Africa**, [s.l.], v. 9, n. 3, p.1-20, 21 dez. 2018. PAGEPress Publications.

MATILAINEN, A. *et al.* Comparison of the Efficiency of Aluminium and Ferric Sulphate in the Removal of Natural Organic Matter During Drinking Water Treatment Process. **Environmental Technology**, [S.L.], v. 26, n. 8, p. 867-876, ago. 2005. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09593332608618502>.

MENG, Xiang-jin. Zoonotic and Foodborne Transmission of Hepatitis E Virus. **Seminars In Liver Disease**, [s.l.], v. 33, n. 01, p.041-049, 5 abr. 2013. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1338113>.

MEURENS, François *et al.* Early immune response following *Salmonella entericasubsppeciesentericaserovar Typhimurium* infection in porcine jejunal gut loops. **Veterinary Research**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 05, 16 out. 2008. EDP Sciences. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2008043>.

MIYABE, Flavia Megumi *et al.* Porcine rotavirus B as primary causative agent of diarrhea outbreaks in newborn piglets. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-11, dez. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-78797-y>.

NDABIGENGESERE, Anselme, *et al.* “Active Agents and Mechanism of Coagulation of Turbid Waters Using *Moringa Oleifera*”. **Water Research**, vol. 29, nº 2, fevereiro de 1995, p. 703–10. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/0043-1354(94)00161-Y.

NGUYEN, Nhung Thi Hong, *et al.* Influence of Three Soil Types in Okinawa, Japan and N, P, K Fertilizations on Growth, Yield, and Oxypinnatanine Concentration of *Hemerocallis Fulva* L. Var. *Sempervirens*. **Japanese Society for Tropical Agriculture**, 2016. DOI.org (CSL JSON), <https://doi.org/10.11248/jsta.60.109>.

NOUHI, Shirin *et al.* Comparative study of flocculation and adsorption behaviour of water treatment proteins from *Moringa peregrina* and *Moringa oleifera* seeds. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 45-111, 29 nov. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-54069-2>.

NOVOTNY, Etelvino Henrique *et al.* BIOCHAR: pyrogenic carbon for agricultural use - a critical review. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [S.L.], v. 39, n. 2, p. 321-344, abr. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/01000683rbc20140818>.

OGORZALY, Leslie, *et al.* “Occurrence, Survival, and Persistence of Human Adenoviruses and F-Specific RNA Phages in Raw Groundwater”. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, nº 24, dezembro de 2010, p. 8019–25. DOI.org (Crossref), doi:10.1128/AEM.00917-10.

OKOYA, Aderonke Adetutu *et al.* Efficacy of Moringa oleifera Seed Husk as Adsorptive Agent for Trihalomethanes from a Water Treatment Plant in Southwestern, Nigeria. **Journal Of Chemistry**, [S.L.], v. 2020, p. 1-11, 24 abr. 2020. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2020/3450954>.

OLIVEIRA, P. et al. Geração e utilização do biogás em unidades de produção de suínos. **Programa Nacional do Meio Ambiente – PNMA II; Projeto de Controle da Degradação Ambiental Decorrente da Suinocultura em Santa Catarina**. Embrapa Suínos e Aves. Concórdia, p. 41, 2006

ONSARE, JG. et al. Antimicrobial activity of Moringa oleifera from different locations against some human pathogens. **Academia Journal of Medicinal Plants** 1(5): 080-091, 30 abr. 2013.

OPRIESSNIG, T. et al. Effect of Vaccination with Selective Bacterins on Conventional Pigs Infected with Type 2 Porcine Circovirus. **Veterinary Pathology**, [S.L.], v. 40, n. 5, p. 521-529, set. 2003. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1354/vp.40-5-521>.

OPRIESSNIG, Tanja et al. Porcine Circovirus Type 2–Associated Disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. **Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation**, [S.L.], v. 19, n. 6, p. 591-615, nov. 2007. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/104063870701900601>.

OPRIESSNIG, Tanja et al. Porcine circoviruses: current status, knowledge gaps and challenges. **Virus Research**, [S.L.], v. 286, p. 198044, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198044>.

PALHARES, Júlio César Pascale et al. Pegada hídrica dos suínos abatidos nos Estados da Região Centro-Sul do Brasil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, [S.L.], v. 33, n. 3, p. 1-6, 8 jun. 2011. Universidade Estadual de Maringá. <http://dx.doi.org/10.4025/actascianimsci.v33i3.9924>.

PESARO, F. et al. In situ inactivation of animal viruses and a coliphage in nonaerated liquid and semiliquid animal wastes. *Appl Environ Microbiol* 61(1):92–97. 1995.

PIRES, A. F. A. *et al.* Longitudinal study of Salmonella shedding in naturally infected finishing pigs. **Epidemiology And Infection**, [S.L.], v. 141, n. 9, p. 1928-1936, 13 nov. 2012. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0950268812002464>.

PRETEL, R. *et al.* Environmental impact of submerged anaerobic MBR (SAnMBR) technology used to treat urban wastewater at different temperatures. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 149, p. 532-540, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.060>.

RAPHAEL, Roderick A., et al. “Long-Term Survival of Human Rotavirus in Raw and Treated River Water”. *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 31, nº 2, fevereiro de 1985, p. 124–28. DOI.org (Crossref), doi:10.1139/m85-024.

REIN, David B. et al. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. **Hepatology**, [S.L.], v. 55, n. 4, p. 988-997, 27 mar. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.25505>.

REIS, Deyse Almeida dos et al. The Relationship Between Human Adenovirus and Metals and Semimetals in the Waters of the Rio Doce, Brazil. **Archives Of Environmental Contamination And Toxicology**, [s.l.], v. 77, n. 1, p.144-153, 11 abr. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-019-00625-w>.

ROSE, Nicolas et al. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). **Virus Research**, [S.L.], v. 164, n. 1-2, p. 78-89, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2011.12.002>.

RZEŚUTKA, Artur et al. Survival of human enteric viruses in the environment and food. **Fems Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 441-453, out. 2004. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsre.2004.02.001>.

SÁNCHEZ, Gloria et al. Survival of Enteric Viruses in the Environment and Food. **Viruses In Foods**, [S.L.], p. 367-392, 2016. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-30723-7_13.

SATTAR, S.A. et al (1981) Virus survival in receiving waters. In: *Viruses and Wastewater Treatment* (Goddard, M., Burler, M., Eds.), pp.91–108 Pergamon Press, New York.

SCALLAN, Elaine et al. Foodborne Illness Acquired in the United States—Unspecified Agents. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 16-22, jan. 2011. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid1701.p21101>.

SCHERER, Kathrin *et al.* Time Course of Infection with Salmonella Typhimurium and Its Influence on Fecal Shedding, Distribution in Inner Organs, and Antibody Response in Fattening Pigs. **Journal Of Food Protection**, [S.L.], v. 71, n. 4, p. 699-705, 1 abr. 2008. International Association for Food Protection. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x-71.4.699>.

SEBRAE - SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO A MICROS E PEQUENAS EMPRESAS. Irrigação e uso racional da água no campo. 2014. Disponível em: <http://www.sebraemercados.com.br/irrigacao-e-uso-racional-da-agua-no-campo/>. Acesso em: 18 fev. 2016.

SIDHU, J. P. S. et al. Pathogen Decay during Managed Aquifer Recharge at Four Sites with Different Geochemical Characteristics and Recharge Water Sources. **Journal Of Environmental Quality**, [S.L.], v. 44, n. 5, p. 1402-1412, set. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.2134/jeq2015.03.0118>.

SOUZA, Doris Sobral Marques et al. Hepatitis E Virus in Manure and Its Removal by Psychrophilic anaerobic Biodigestion in Intensive Production Farms, Santa Catarina, Brazil, 2018–2019. **Microorganisms**, [S.L.], v. 8, n. 12, p. 2045, 21 dez. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8122045>.

STROMBERG, Zachary R. et al. Pathogenic and non-pathogenic Escherichia coli colonization and host inflammatory response in a defined microbiota mouse model. **Disease Models & Mechanisms**, [S.L.], v. 11, n. 11, p. 1-13, 1 nov. 2018. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/dmm.035063>.

SUTHERLAND *et al.* Natural coagulants for appropriate water treatment: a novel approach. **Waterlines**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 30-32, abr. 1990. Practical Action Publishing. <http://dx.doi.org/10.3362/0262-8104.1990.020>.

SWARTZ, Morton N. *et al.* Human Diseases Caused by Foodborne Pathogens of Animal Origin. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 34, n. 3, p. 111-122, jun. 2002. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/340248>.

THAPALIYA, Dipendra *et al.* Zoonotic Diseases of Swine: food-borne and occupational aspects of infection. **Zoonoses - Infections Affecting Humans And Animals**, [S.L.], p. 23-68, 9 dez. 2014. Springer Netherlands. http://dx.doi.org/10.1007/978-94-017-9457-2_2.

THACKER, Eileen L. *et al.* Immunology of the Porcine Respiratory Disease Complex. **Veterinary Clinics Of North America: Food Animal Practice**, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 551-565, nov. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30006-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30006-2).

UN, 2012. World Population Prospects, the 2012 Revision. Disponível em: <<https://www.un.org/en/development/desa/publications/world-population-prospects-the-2012-revision.html>> Acessado em 5 agosto de 2019.

VELHO, Viviane F *et al.* The viability of treated piggery wastewater for reuse in agricultural irrigation. **International Journal Of Recycling Of Organic Waste In Agriculture**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 10, 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/2251-7715-1-10>.

VIANCELLI, Aline *et al.* A review on alternative bioprocesses for removal of emerging contaminants. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, [S.L.], v. 43, n. 12, p. 2117-2129, 17 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-020-02410-9>.

VIANCELLI, A. *et al.* Detection of circoviruses and porcine adenoviruses in water samples collected from swine manure treatment systems. **Research In Veterinary Science**, [s.l.], v. 93, n. 1, p.538-543, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.07.022>.

VIANCELLI, A. *et al.* Performance of two swine manure treatment systems on chemical composition and on the reduction of pathogens. **Chemosphere**, [S.L.], v. 90, n. 4, p. 1539-1544, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.08.055>.

VLASOVA, Anastasia *et al.* Porcine Rotaviruses: epidemiology, immune responses and control strategies. **Viruses**, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 48, 18 mar. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v9030048>.

WEBER, Kela *et al.* Pathogen removal in constructed wetlands. 2008.

WEN, Xiaotong et al. Microbial Indicators and Their Use for Monitoring Drinking Water Quality—A Review. **Sustainability**, [S.L.], v. 12, n. 6, p. 2249, 13 mar. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/su12062249>.

WHO. Guideline for drinking water quality incorporation first addendum. Vol.1, Recommendations 3rd ed. 2006.

WHO, 2011. Hepatitis E [WWW Document]. World Heal. Organ. URL www.who.int (acessado em 4.27.20).

XIONG, Boya *et al.* Moringa oleifera f-sand Filters for Sustainable Water Purification. **Environmental Science & Technology Letters**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 38-42, 28 nov. 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.estlett.7b00490>.

YEGAMBARAM, Manivannan *et al.* Role of Environmental Contaminants in the Etiology of Alzheimer's Disease: a review. **Current Alzheimer Research**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 116-146, 24 fev. 2015. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1567205012666150204121719>.

ZHANG, Di et al. Impacts of Small-Scale Industrialized Swine Farming on Local Soil, Water and Crop Qualities in a Hilly Red Soil Region of Subtropical China. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [S.L.], v. 14, n. 12, p. 1524, 6 dez. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph14121524>.

ZENG, S.-Q. et al. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. **Journal Of Virological Methods**, [S.L.], v. 153, n. 2, p. 238-240, nov. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.08.004>.