

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Engenharia
Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos

Antonio Natanael Costa Sancho

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA E DECAIMENTO DE VÍRUS ENTÉRICOS E
SARS-COV-2 NO TRATAMENTO DE ESGOTO EM REATOR UASB E DA
PERSISTÊNCIA DE ROTAVÍRUS A EM LODO DE UASB DESSECADO EM LEITO
DE SECAGEM**

Belo Horizonte

2022

Antonio Natanael Costa Sancho

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA E DECAIMENTO DE VÍRUS ENTÉRICOS E
SARS-COV-2 NO TRATAMENTO DE ESGOTO EM REATOR UASB E DA
PERSISTÊNCIA DE ROTAVÍRUS A EM LODO DE UASB DESSECADO EM LEITO
DE SECAGEM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de concentração: Saneamento

Linha de pesquisa: Tratamento de águas residuárias

Orientador: Prof. Dr. César Rossas Mota Filho

Belo Horizonte

2022

S211a

Sancho, Antonio Natanael Costa.

Avaliação da ocorrência e decaimento de vírus entéricos e SARS-coV-2 no tratamento de esgoto em reator UASB e da persistência de Rotavírus A em lodo de UASB dessecado em leito de secagem [recurso eletrônico] / Antonio Natanael Costa Sancho. – 2022.

1 recurso online (72 f. : il., color.) : pdf.

Orientador: César Rossas Mota Filho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Bibliografia: f. 65-72.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Engenharia sanitária - Teses. 2. Saneamento - Teses. 3. Esgotos - Teses. 4. COVID-19 (Doença) - Epidemiologia - Teses. 5. Rotavírus - Teses. I. Mota Filho, César Rossas. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. III. Título.

CDU: 628(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
[ESCOLA DE ENGENHARIA]
COLEGIADO DO CURSO DE GRADUAÇÃO / PÓS-GRADUAÇÃO EM [SANEAMENTO, MEIO AMBIENTE E RECURSOS
HÍDRICOS]

FOLHA DE APROVAÇÃO

["Avaliação da ocorrência e decaimento de vírus entéricos e SARS-COV-2 no tratamento de esgoto em reator UASB e da persistência de rotavírus A em lodo de UASB dessecado em leito de secagem"]

[Antonio Natanael Costa Sancho]

Dissertação de Mestrado] defendida e aprovada, no dia [19 de abril de 2022], pela Banca Examinadora designada pelo [Colegiado do Programa de Pós-Graduação **EM SANEAMENTO, MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS**] da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores:

[Profa. Dra. Maria Clara Vieira Martins Starling] - **Membro Interno**

[UFMG]

[Prof. Marcos von Sperling - **Membro Interno**]

[UFMG]

[Prof. César Rossas Mota Filho - **Orientador**]

[UFMG]

APROVADA PELO COLEGIADO DO PPG SMARH

Sonaly Cristina Rezende Borges de Lima - Coordenadora

Belo Horizonte, 19 de abril de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Cesar Rossas Mota Filho, Professor do Magistério Superior**, em 19/04/2022, às 11:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Von Sperling, Professor do Magistério Superior**, em 19/04/2022, às 11:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Clara Vieira Martins Starling, Professora do Magistério Superior**, em 06/07/2023, às 19:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Priscilla Macedo Moura, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 25/10/2023, às 11:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1392625** e o código CRC **CF937B07**.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer ao meu amor Torres por todo incentivo, apoio e compreensão durante a realização do mestrado.

Gostaria de agradecer ao Professor Dr. César pela confiança, orientação e autonomia dada durante o mestrado bem como pela compreensão das dificuldades enfrentadas durante a pandemia da COVID-19.

Agradeço aos professores da banca examinadora, Marcos von Sperling e Maria Clara Vieira Martins Starling, pelos comentários e contribuições dadas ao trabalho.

Agradeço à Bruna Coelho por todo auxílio no desenvolvimento da pesquisa. Pelo incentivo, ensinamentos, pelas dúvidas tiradas e pelo apoio incondicional nas atividades de laboratório.

Agradeço ao laboratório de microbiologia do departamento de veterinária pelo acesso aos equipamentos e autorização para realizar a análise de RT-qPCR no departamento, em especial a professora Érica.

Ao suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

À FAPEMIG, ao CNPq e ao INCT ETEs Sustentáveis pelo apoio no desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço ao Alcino pelas conversas, auxílio no laboratório e pelas discussões sobre vírus, PCR e esgoto.

Agradeço aos colegas do grupo Esponjinhas: Baruc, Débora, Fernanda, Isa, Júlio, Letícia, Luan, Priscila, Tati e Sheilane.

Ao grupo de treinadores de Pokémon Go do bairro Ouro Preto pelo acolhimento durante a moradia em Belo Horizonte, em especial ao Tafas e Maristela.

RESUMO

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a ocorrência dos vírus SARS-CoV-2, rotavírus A e norovírus nas matrizes de esgoto bruto, esgoto tratado, lodo e espuma em um sistema de tratamento do tipo reator UASB. Adicionalmente, avaliou-se a persistência do rotavírus A no lodo excedente desaguado no leito de secagem durante 63 dias. O estudo foi realizado no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) UFMG/COPASA, localizado na Estação de Tratamento de Esgoto do Arrudas na cidade de Belo Horizonte/MG. O sistema compacto de tratamento do tipo UASB tratou uma vazão de 80 m³/dia e foram descartados 3 m³ de lodo anaeróbio excedente em leito de secagem para avaliação do decaimento de vírus. Foram realizadas 9 coletas para cada matriz durante os meses de setembro a dezembro de 2020. Para a detecção e quantificação dos vírus, foi utilizada a técnica de RT-qPCR. A concentração de SARS-CoV-2 no esgoto bruto variou entre 2,00x10⁴ e 3,76x10⁴ cg/l, com amplificação de 67% das amostras. Em contrapartida, os rotavírus amplificaram em 100% das amostras, com concentrações variando de 9,09x10³ cg/l a 4,65x10³ cg/l. No esgoto tratado, as concentrações de SARS-CoV-2 variaram entre 6,73x10² e 6,34x10³ cg/l com remoção média de 0,66 log₁₀. O efluente tratado apresentou rotavírus A em concentrações de 4,65x10³ e 4,63x10⁴ cg/l, com redução de 0,27 log₁₀. Os percentuais de amostras positivas foram de 67% e 100% para SARS-CoV-2 e rotavírus A, respectivamente. No lodo de reator UASB as concentrações de SARS-CoV-2 variaram de 7,84x10³ a 8,98x10⁴ cg/gST, enquanto os rotavírus A variaram de 3,35x10⁴ a 5,91x10⁴ cg/gST. Os vírus deixaram o reator por meio do descarte de lodo na proporção de 29% e 17% para o novo coronavírus e rotavírus, respectivamente. Nas amostras de lodo, a taxa de positividade para o SARS-CoV-2 e rotavírus foi de 89% para ambos os vírus. A espuma apresentou concentrações de SARS-CoV-2 variando de 2,67x10³ a 2,39x10⁴ cg/gST. Foram detectadas concentrações de rotavírus A na faixa de 1,3x10⁴ e 7,40x10⁴ cg/gST em amostras de espuma. Nas amostras de espuma, as taxas de positividade foram de 67% e 100% para o SARS-CoV-2 e rotavírus A respectivamente. Os norovírus apresentaram concentrações abaixo do limite de quantificação em todas as matrizes. Foi observada a presença de norovírus em 44% das amostras de esgoto bruto, 56% de efluente tratado, em 22% das amostras de lodo e 56% nas amostras de espuma. Foi avaliada a persistência do rotavírus A no lodo de descarte do reator UASB após o desague no leito de secagem. Constatou-se que o vírus estava presente em 100% das amostras após o monitoramento de 63 dias.

Palavras-chave: Sars-CoV-2. Rotavírus. Norovírus. Esgoto.

ABSTRACT

This research aimed to evaluate the occurrence of SARS-CoV-2, rotavirus A, and norovirus viruses in sewage, treated sewage, sludge and scum from a UASB reactor-type treatment system. Additionally, the persistence of rotavirus in the sludge in the drying bed for 63 days was evaluated. The study was carried out at the Sanitation Research and Training Center (CePTS) UFMG/COPASA, located at the Arrudas Sewage Treatment Station in the city of Belo Horizonte/MG. The UASB-type compacted system used has a treatment capacity of 80 m³/day and 3 m³ of sludge anaerobic volume were discarded in the drying bed. Nine samplings were carried out for each matrix during the months of September to December 2020. For the detection and quantification of the viruses, the RT-qPCR technique was used. The concentration of SARS-CoV-2 in sewage varied between 2.00x10⁴ and 3.76x10⁴ gc/l, with amplification of 67% of the samples. In contrast, rotaviruses A amplified in 100% of the samples and ranged from 9.09x10³ gc/l to the maximum concentration, 6.5x10³ cg/l. In the treated sewage, the SARS-CoV-2 varied between 6.73x10³ gc/l with an average removal of 0.66. Rotavirus A had a concentration of 4.65x10³ and 4.63x10⁴ gc/l, with a reduction of 0.27 log₁₀. The positive sample rates were 66.67% and 100% for SARS-CoV-2 and rotavirus A, respectively. In the UASB reactor bottom sludge, SARS-CoV-2 concentrations ranged from 7.84x10³ to 8.98x10⁴ gc /gTS while rotavirus A ranged from 3.35x10⁴ to 5.91x10⁴ gc /gTS. The viruses left the reactor through the disposal of sludge in the proportion of 29% and 17% for the new coronavirus and rotavirus A, respectively. The positivity rate of the samples for SARS-CoV-2 and rotavirus A was 89% for both viruses. The scum showed SARS-CoV-2 concentration values ranging from 2.67x10³ and 2.39x10⁴ gc /gTS. Rotavirus concentrations in the range of 1.3x10⁴ and 7.40x10⁴ cg/gTS were detected. Sample positivity rates were 67% and 100% for SARS-CoV-2 and rotavirus A respectively. It was not possible to quantify noroviruses due to its low concentration in the environmental. However, the presence of this virus was observed in 44% of the raw sewage samples, 56% in the treated effluent, in 22 % of the sludge samples and 56% in the scum samples. The persistence of rotavirus A in the waste sludge from the UASB reactor after dewatering in the drying bed was evaluated. The virus was found in 100% of the samples after the 63-day monitoring.

Keywords: Sars-CoV-2. Rotavirus. Norovirus. Wastewater.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Número de ETE's no Brasil por tipo de tecnologia de tratamento.	17
Figura 3.2 - Vírus não-envelopado e envelopado.....	18
Figura 3.3 - Possíveis rotas de transmissão dos vírus entéricos em ambientes aquáticos.	19
Figura 3.4 - Tamanhos dos vírus humano.....	22
Figura 3.5 - Tamanhos dos vírus humano.....	27
Figura 4.1 – Reator utilizado no experimento.....	39
Figura 4.2 – Kit de filtração.....	41
Figura 4.3 – Curva padrão SARS-CoV-2.	42
Figura 4.4 – Curva padrão Rotavírus.	42
Figura 4.5 – Curva padrão Norovírus.	43
Figura 5.1 - Concentração do vírus SARS-CoV-2 no esgoto bruto e no efluente do reator UASB.	50
Figura 5.2 - Concentração do vírus SARS-CoV-2 no lodo do reator UASB e na Escuma.	51
Figura 5.3 - Concentração do vírus SARS-CoV-2 no esgoto bruto e no efluente do reator UASB.	51
Figura 5.4 – Concentração do vírus rotavírus A em diferentes matrizes.	54
Figura 5.5 – Concentração do vírus rotavírus A no esgoto bruto e no efluente do reator UASB.	54
Figura 5.6 – Concentração do vírus rotavírus A no lodo e no escuma do reator UASB.	56
Figura 5.7 – Vista do leito de secagem imediatamente após o desague do lodo (à esquerda) e após 63 dias de secagem (à direita).....	60
Figura 5.8 – Variação de temperatura, precipitação e sólidos totais observadas durante o período de estudo.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Vírus humano encontrados no ambiente aquático	20
Tabela 3.2 – Concentração dos vírus nos sistemas de tratamentos	23
Tabela 3.3 – Principais parâmetros para projetos de reatores UASB	29
Tabela 3.4 – Principais estudos recentes sobre a ocorrência de vírus nos esgotos Brasileiros	32
Tabela 3.5 – Vantagens e desvantagens do método de cultura	33
Tabela 3.6 – Vantagens e desvantagens dos métodos moleculares	36
Tabela 4.1 – Dados do reator compacto.	39
Tabela 4.2 – RT-qPCR iniciadores utilizados no presente estudo.	44
Tabela 4.3 – Reação química da qPCR e condições de amplificação.	44
Tabela 5.1 – Características físico-químicas do esgoto bruto e do efluente do reator UASB (n = 9 amostras).	46
Tabela 5.2 – Características do lodo do reator UASB (n = 9 amostras).	47
Tabela 5.3 – Resultados da amplificação das amostras para o SARS-CoV-2.	48
Tabela 5.4 – Concentração de SARS-CoV-2 no esgoto.	49
Tabela 5.5 – Balanço do SARS-CoV-2 no reator UASB.	52
Tabela 5.6 – Resultados da amplificação das amostras para o Rotavírus A.	53
Tabela 5.7 – Estatística descritiva das amostras para o Rotavírus A.	54
Tabela 5.8 – Matriz de correlação entre SARS-CoV-2 e Rotavírus.	57
Tabela 5.9 – Balanço de Massa do Rotavírus A no reator UASB.	57
Tabela 5.10 – Amostras positivas para norovírus.	58
Tabela 5.11 – Valores de Ct das amostras para norovirus.	59
Tabela 5.12 – Presença de rotavírus no leito de secagem após desague do lodo.	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AdV	Adenovírus
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CePTS	Centro de Treinamento e Pesquisa em Saneamento
COVID-19	Doença do Coronavírus 2019
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EPS	Exopolissacarídeos
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
HVA	Vírus da Hepatite A
JCPyV	JC Poliomavirus
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
NoV	Norovírus
PCR	Polymerase Chain Reaction
qPCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	(Reverse Transcription) - Polimerase Chain Reaction
RT-qPCR	(Reverse Transcription) - Polimerase Chain Reaction In Real Time
RVA	Rotavírus A
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket
UV	Ultravioleta
WBE	Wastewater Based Epidemiology
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	VÍRUS E O ESGOTAMENTO SANITÁRIO	16
3.1.1	<i>Vírus</i>	18
3.1.2	<i>Vírus e os sistemas de tratamento de esgoto</i>	22
3.2	VIROLOGIA AMBIENTAL NO BRASIL E MINAS GERAIS	29
3.3	MÉTODOS DE DETECÇÃO VIRAL	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO E PLANO DE AMOSTRAGEM	38
4.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EFLUENTE.....	39
4.3	QUANTIFICAÇÃO DE VÍRUS POR MEIO DA TÉCNICA RT-QPCR.....	40
4.3.1	<i>Concentração viral por meio de membranas eletronegativas</i>	40
4.3.2	<i>Extração do RNA Viral</i>	40
4.3.3	<i>Detecção e quantificação dos vírus por PCR quantitativo (qPCR)</i>	41
4.4	BALANÇO DE MASSA.....	45
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	CARACTERÍSTICAS DOS EFLUENTES AMOSTRADOS.....	46
5.2	CONCENTRAÇÃO DE SARS-CoV-2 NO ESGOTO	47
5.3	CONCENTRAÇÃO DE ROTAVÍRUS NO ESGOTO	52
5.4	OCORRÊNCIA DE NOROVÍRUS NO ESGOTO	57
5.5	DECAIMENTO DE ROTAVÍRUS NO LEITO DE SECAGEM.....	60
6	CONCLUSÕES.....	63
7	RECOMENDAÇÕES.....	65
	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

No ano de 2017, foram reportados à Organização Mundial da Saúde aproximadamente 1,2 milhão de casos de cólera e 5.654 mortes resultantes da ingestão de água contaminada e péssimas condições sanitárias (WHO, 2018).

A maior parte das infecções virais transmitidas pela água são causadas por vírus entéricos, que são vírus não-envelopados, como enterovírus (poliovírus, coxsackievirus, echovirus), norovírus, adenovírus, rotavírus, astrovírus, hepatite A e E (AW, 2018). Os rotavírus e norovírus são responsáveis por surtos de gastroenterite em todo o globo terrestre. Nos países desenvolvidos, os norovírus são identificados como a causa mais comum de gastroenterite aguda não bacteriana em crianças e adultos (AHMED et al., 2014). No entanto, nos países em desenvolvimento, os rotavírus são os principais responsáveis por gastroenterites aguda em lactentes e crianças pequenas no sul da Ásia e na África Subsaariana (DA SILVA et al., 2016).

As estações de tratamento de esgoto (ETE) exercem um importante papel no controle da poluição. Por meio de diversas operações unitárias, removem a matéria orgânica, nutrientes e patógenos presentes nos esgotos ao nível de concentração na qual os corpos d'água conseguem depurar. Porém, ainda há poucas informações disponíveis quanto à remoção de vírus nos sistemas de tratamento, especialmente aqueles usados em países em desenvolvimento, como reatores UASB, lagoas e sistemas alagados construídos. Estudos de remoção desses microrganismos em ETEs são escassos e concentrados em sistemas de lodos ativados e biorreator de membranas, pois a maioria dos estudos foram realizados em países desenvolvidos, onde tais tecnologias são aplicadas.

Para que os sistemas de tratamento possam ser melhorados, estudos sobre a ocorrência, prevalência e remoção de diferentes vírus devem ser realizados nos mais variados tipos de ETEs e nas matrizes ambientais presentes nos sistemas de tratamento para gerar dados que possam ser utilizados na construção de modelos matemáticos para melhor compreensão dos processos de remoção e para o aprimoramento do projeto de estações de tratamento. Não obstante, os dados também podem auxiliar as autoridades ambientais na tomada de decisão quanto aos riscos envolvidos no reúso de água direto e indireto bem como dos subprodutos gerados, tais como os biossólidos. Ainda podem servir de referência para a proposição de normas regulamentadoras de aplicação dos subprodutos.

Cabe ressaltar que o crescimento da população e da demanda de água aliados aos impactos ambientais da poluição, fazem com que cresça o interesse pelo reúso de águas residuárias. A compreensão de como os vírus persistem nos sistemas é fundamental para que sejam desenvolvidas tecnologias para o tratamento adequado e gestão segura da água.

No Brasil, as pesquisas sobre inativação de vírus no tratamento de esgoto têm focado principalmente em lodos ativados, sendo escassos os estudos em outras tecnologias aplicadas no país. Em Minas Gerais, ASSIS (2016) realizou um dos primeiros estudos de ocorrência de vírus entéricos no esgoto. A autora avaliou a remoção de adenovírus humano e rotavírus A em um sistema de tratamento de esgotos por lodos ativados na cidade de Juiz de Fora.

Com o surto da COVID-19 em 2019, causada pelo vírus SARS-CoV-2, identificado em dezembro daquele ano e a elevação da situação para pandemia em março de 2020, foi descoberto que os pacientes acometidos por esta síndrome, excretavam partículas virais do novo coronavírus nas fezes. A partir desta observação, iniciaram-se, mundialmente, pesquisas para o monitoramento destes microrganismos no esgoto e durante o tratamento em ETEs. O Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em ETE's Sustentáveis – INCT ETE's Sustentáveis e a Agência Nacional de Águas (ANA) realizaram o projeto piloto de monitoramento da COVID-19 nos esgotos de Belo Horizonte com o objetivo de compreender esta técnica como ferramenta epidemiológica para o combate à COVID-19.

Recentes estudos na região metropolitana de Belo Horizonte avaliaram a ocorrência e a remoção de adenovírus e SARS-CoV-2 nos esgotos (ESPINOSA *et al.*, 2022; MOTA *et al.*, 2021). Há lacunas sobre a presença de outros vírus de interesse ambiental e de saúde pública nos efluentes domésticos da cidade de Belo Horizonte, que possuam como forma de transmissão a rota fecal-oral, tais como os rotavírus A e norovírus, assim como remoção desses patógenos por meio de tecnologias comumente aplicadas no país. Estes vírus também estão presentes nos lodos gerados pelas estações, que geralmente são despejados em leitos de secagem para remoção de umidade antes de serem encaminhados para a destinação final.

Desta maneira, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a ocorrência dos vírus entéricos rotavírus e norovírus assim como o vírus SARS-CoV-2 em uma estação de tratamento do tipo UASB localizada na cidade de Belo Horizonte, além de avaliar a partição desses vírus nas diferentes matrizes presentes (afluente, efluente, lodo e espuma). Adicionalmente, estudou-se a persistência do rotavírus A em lodo de UASB após seu descarte em leito de secagem durante 2

meses. A escolha deste monitoramento foi devido aos referidos patógenos apresentar resistência aos agentes físicos e químicos pelas suas características estruturais e possuem importância epidemiológica por serem causadores de doenças diarreicas em crianças e indivíduos jovens.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Avaliar a ocorrência e decaimento dos vírus rotavírus, norovírus e do SARS-CoV-2 em um sistema de Tratamento de Esgoto do tipo UASB e a persistência de rotavírus em lodo desaguado em leito de secagem.

2.2 *Objetivos específicos*

- Avaliar a ocorrência e decaimento dos vírus rotavírus, norovírus e SARS-CoV-2 nas matrizes constituintes do sistema UASB: esgoto bruto, esgoto tratado, espuma, lodo do reator UASB;
- Avaliar o decaimento do vírus rotavírus A durante o período de 63 dias de desaguamento do lodo em leito de secagem;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Vírus e o Esgotamento Sanitário*

O ser humano é um reservatório natural de diversos organismos microscópicos tais como bactérias, protozoários, helmintos e vírus. Estes microrganismos podem apresentar capacidade de causar enfermidades em seus hospedeiros, sendo assim denominados de agentes patogênicos ou por apenas patógenos. Muitas doenças são transmitidas através da rota fecal-oral tendo como principais veículos de transmissão as excretas humanas e de animais ricas em agentes infecciosos (FEACHEM *et al.*, 1983). O contágio é agravado pela falta de saneamento básico, o que favorece o contato dos indivíduos com os dejetos humanos.

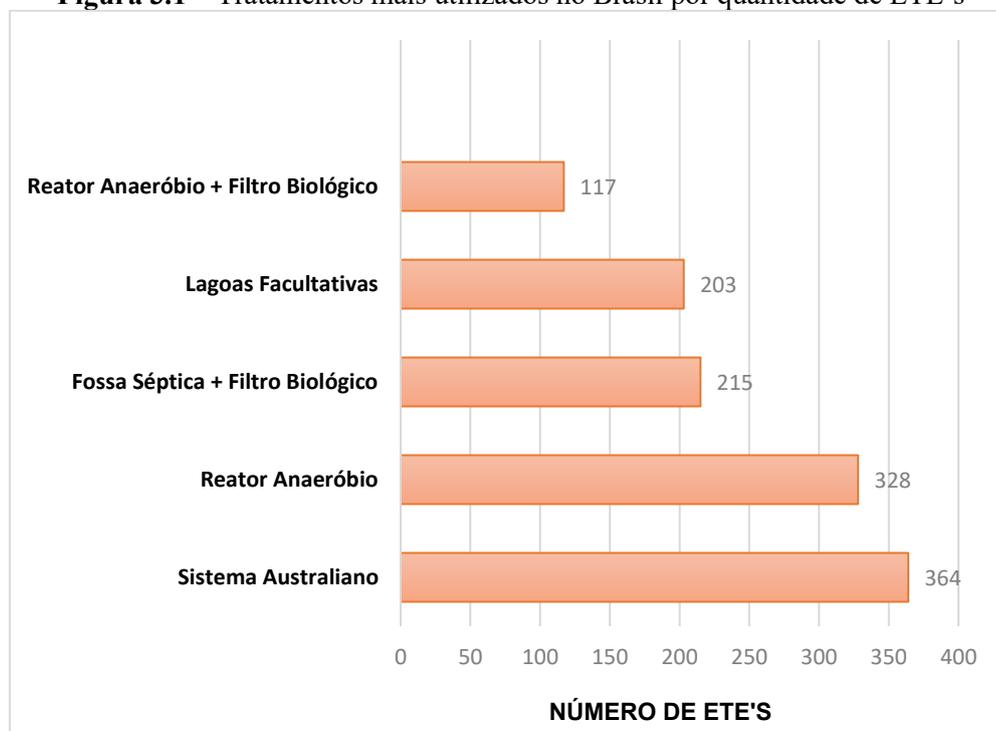
Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que a diarreia, doença de rota fecal-oral, é a segunda causa de mortalidade infantil em crianças menores de 5 anos (WHO, 2017). No ano de 2017, foram reportados à OMS aproximadamente 1,2 milhão de casos de cólera e 5.654 mortes resultantes da ingestão de água contaminada e péssimas condições sanitárias (WHO, 2018). No mundo, aproximadamente 616 milhões de pessoas não possuem acesso ao esgotamento sanitário ou a soluções melhoradas de esgoto e 494 milhões praticam a defecação a céu aberto. A maior parte da população sem acesso a esgotamento sanitário vive em áreas rurais. Além disso, um terço do total de pessoas que vivem sem saneamento básico residem em países menos desenvolvidos. Estima-se que 3,6 bilhões de pessoas no mundo ainda utilizam fossas, latrinas ou defecam ao ar livre (WHO; UNICEF, 2021).

No Brasil, dados do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento – SNIS mostram que 54,1% da população brasileira é atendida por rede de esgotamento sanitário e que as macrorregiões Norte, Nordeste e Sul apresentam índices inferiores à média nacional, com valores do indicador de atendimento respectivos de 12,3%, 28,3% e 46,3%. As regiões Sudeste e Centro-Oeste estão acima da média nacional com respectivos percentuais de 79,5% e 57,7% de cobertura de rede de esgoto. Calcula-se que do total de esgotos gerados no Brasil, apenas 49,1% são tratados. Em relação aos efluentes domésticos coletados nos domicílios brasileiros, somente 78,5% recebem tratamento (SNS, 2019). De acordo com a Agência Nacional de Águas (ANA), no ano de 2017, aproximadamente 12% da população brasileira era atendida por solução individual do tipo fossa séptica, 18% da população se enquadrava na situação em que os esgotos são coletados, mas não eram tratados, e 27% era desprovida de atendimento, ou seja, não havia coleta nem tratamento de esgoto (ANA, 2017). Os dados demonstram que a

universalização do saneamento básico no Brasil ainda não é uma realidade e que se deve ter o adequado gerenciamento dos ricos microbiológicos para o uso seguro da água.

Os efluentes gerados em localidades com sistemas completos de esgotamento sanitário são encaminhados para as estações de tratamento de esgoto (ETE), nas quais passam por diversas operações unitárias que removem matéria orgânica, nutrientes e patógenos, com níveis de remoção variados, conforme a tecnologia adotada. Os processos mais encontrados no país são os constituídos de: lagoa anaeróbia seguida de lagoa facultativa, conhecidos como sistema australiano e que somam 364 ETE's, seguida do tratamento por apenas reator anaeróbio de alta taxa com 328 unidades, logo após tem-se os tanques sépticos associados a filtros anaeróbios, com 215 unidades. Os sistemas de tratamentos menos usados são os constituídos de apenas lagoas facultativas, com 203 unidades e na última posição estão os reatores anaeróbios seguidos de filtros biológicos, com 177 unidades identificadas, conforme apresentado na Figura 3.1. O sistema australiano é mais representativo na Região Sudeste, enquanto os reatores anaeróbios predominam nas regiões Nordeste, Sul e Centro-Oeste (ANA, 2017). Nota-se que a maioria dos sistemas de tratamento focam na remoção de matéria orgânica.

Figura 3.1 – Tratamentos mais utilizados no Brasil por quantidade de ETE's



Fonte: Adaptado de ANA (2017)

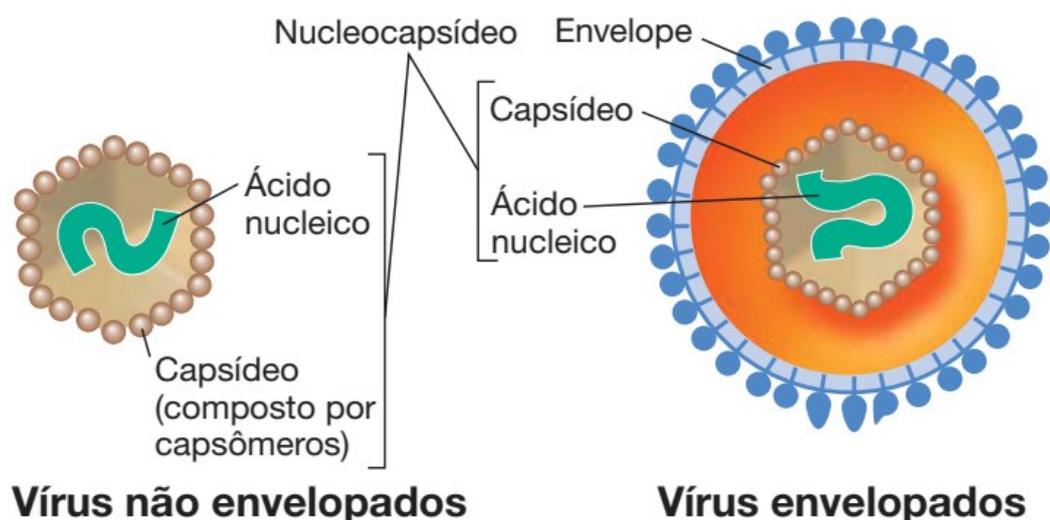
Os efluentes tratados são lançados em corpos d'água ou dispostos no solo, o que resulta em reúso indireto. Há a possibilidade realizar o reúso direto do esgoto tratado para usos não

potáveis e no cultivo de plantas. O lodo gerado no processo de tratamento também pode ser utilizado como adubo na agricultura. Deve-se assim ter o controle microbiológico destes subprodutos. Porém, em relação ao efluente tratado, o risco é controlado por um indicador bacteriológico (coliformes totais e *E. coli*). No entanto, esse indicador tem sido questionado uma vez que alguns vírus são mais resistentes aos agentes desinfetantes como o cloro e a ultravioleta (LI *et al.*, 2009). Ressalta-se que a nível nacional não há o estabelecimento de um indicador de remoção de microrganismo como padrão de lançamento a ser atendido, apenas os estados de Ceará, Pernambuco, Bahia e Rio Grande do Sul que empregam a remoção de coliformes termotolerantes como parâmetro de qualidade e somente os estados de Ceará, Minas Gerais e São Paulo possuem leis específicas para o reúso de efluentes tratados (MORAIS; SANTOS, 2019; MINAS GERAIS, 2020).

3.1.1 Vírus

Vírus são parasitas obrigatórios, desta maneira, necessitam de células hospedeiras para se replicarem. São classificados conforme o tipo de material genético que carregam que pode ser RNA (ácido ribonucleico) ou DNA (ácido desoxirribonucleico), assim como pela presença ou ausência de uma membrana lipoprotéica exterior, denominados de vírus envelopados e vírus não-envelopados, respectivamente (Figura 3.2).

Figura 3.2 - Vírus não-envelopado e envelopado

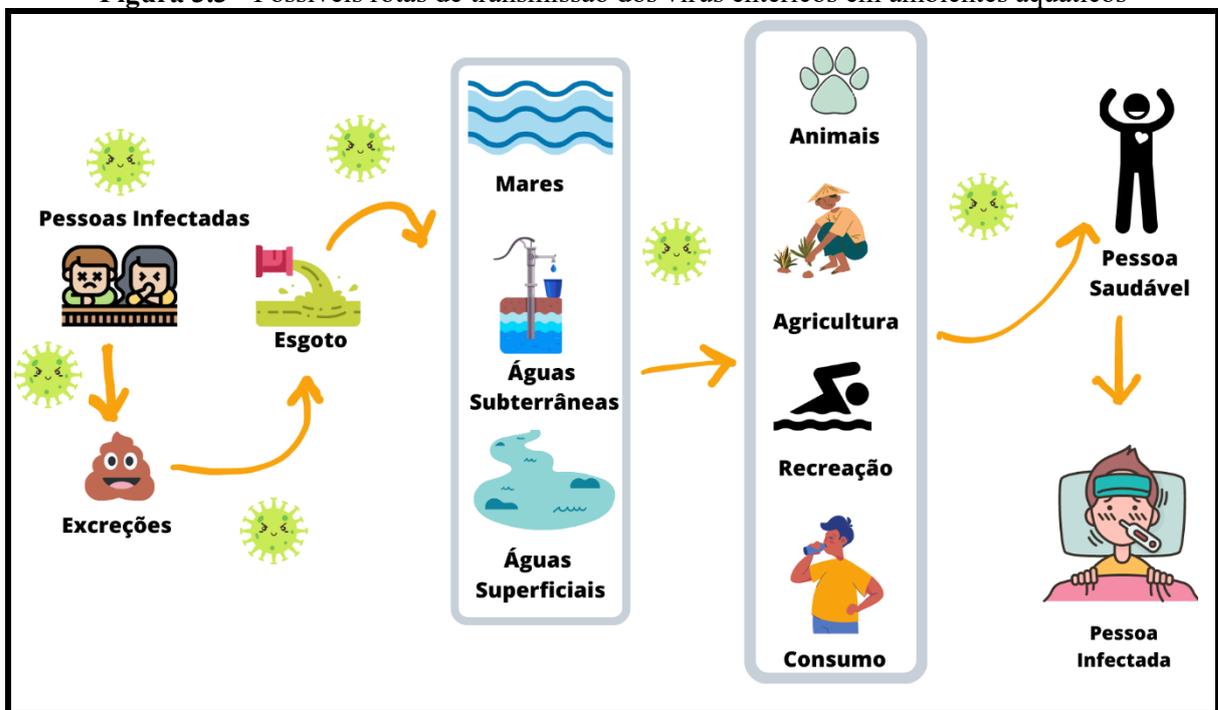


Fonte: (MADIGAN *et al.*, 2016)

No âmbito da virologia ambiental, diversos estudos de ocorrência e quantificação de vírus no ambiente possuem como foco o grupo denominado de vírus entéricos, que é a terminologia

utilizada para designar os grupos virais presentes no trato gastrointestinal humano e que podem disseminar doenças de rota fecal-oral (PRADO; MIAGOSTOVICH, 2014). São vírus de simetria icosaédrica, não-envelopados e altamente resistentes às condições desfavoráveis do meio ambiente (CORPUZ *et al.*, 2020), por exemplo, alguns vírus entéricos apresentam resistência a cloração e a desinfecção por ultravioleta (UV). Além da rota fecal-oral, esses vírus podem ser transmitidos pelo contato com pessoas infectadas, por meio de animais (zoonoses) e/ou objetos contaminados (fômites). A Figura 3.3 apresenta um esquema com as possíveis rotas de transmissão de vírus entéricos em ambientes aquáticos.

Figura 3.3 - Possíveis rotas de transmissão dos vírus entéricos em ambientes aquáticos



Fonte: Autor (2022).

Os principais vírus entéricos humanos estudados e encontrados na literatura são membros de seis famílias: *Picornaviridae*, *Caliciviridae*, *Hepeviridae*, *Reoviridae*, *Astroviridae*, todos vírus de RNA, e *Adenoviridae* dentro da família de vírus de DNA (RUSINOL;GIRONES, 2017). Essas famílias de vírus apresentam relação com doenças de veiculação hídrica, infecções e com surtos ou casos esporádicos com ampla gama de sintomas de gastroenterite leve a grave a meningite, doença respiratória, conjuntivite, miocardite, paralisia ou hepatite. A presença desses vírus no ambiente, além de indicar a contaminação por fezes humana, permite ainda identificar a prevalência de uma doença em uma área ou comunidade. Destaca-se que uma pessoa infectada é capaz de excretar entre 10^5 e 10^{12} partículas de vírus por grama de fezes

(GERBA, 2000). A Tabela 3.1 apresenta os principais vírus encontrados em ambientes aquáticos e as doenças relacionadas.

Tabela 3.1 – Vírus humano encontrados no ambiente aquático

Gênero	Tipo de Genoma	Nome Popular	Doenças
<i>Enterovírus (EV)</i>		Poliovírus (PV)	Paralisia, meningite, febre
	RNA de fita simples	Coxsackie vírus A, B	Herpangina, meningites, doenças respiratórias, doenças das mãos, pés e bocas, miocardites, anomalias no coração, pleurodinia, diabetes, doenças cutâneas
		Echovírus	Meningite, febre, doença respiratória, doenças cutâneas, gastroenterite
<i>Hepatovírus</i>	RNA de fita simples	Vírus da Hepatite A (HVA)	Hepatite
<i>Reovírus</i>	RNA segmentado de fita dupla	Reovírus humano	Desconhecido
<i>Rotavírus</i>	RNA segmentado de fita dupla	Rotavírus humano (RV)	Gastroenterites
<i>Norovírus</i>	RNA de fita simples	Norovírus humano (NoV)	Gastroenterites
<i>Sapovírus</i>	RNA de fita simples	Sapovírus humano	Gastroenterites
<i>Hepevírus</i>	RNA de fita simples	Vírus da Hepatite E (HEV)	Hepatite
<i>Mamastrovírus</i>	RNA de fita simples	Astrovírus Humano	Gastroenterites
<i>Coronavírus</i>	RNA de fita simples	Coronavírus humano	Gastroenterites, doenças respiratórias, SARS
<i>Orthomuxovírus</i>	RNA segmentado de fita simples	Orthomuxovírus humano	Influenza, doenças respiratórias
<i>Parvovírus</i>	DNA de fita simples	Parvovírus humano	Gastroenterites
<i>Mastadenovírus</i>	DNA de fita dupla	Adenovírus humano (HAdV)	Gastroenterites, doenças respiratórias, conjuntivite
<i>Polyomavírus</i>	DNA de fita dupla	Polyomavírus (JCPyV)	Leucoencefalopatia multifocal progressiva, doenças do trato urinário
<i>Circovírus</i>	DNA de fita simples	Vírus do Torque Teno (TTV)	Desconhecido/hepatites

Fonte: adaptado de BOSCH *et al.* (2008).

Os adenovírus humanos (HAdV) pertencem a família *Adenoviridae* e o gênero Mastadenovirus contém todos os serotipos humanos. Com tamanho entre 80 e 90 nm e genoma constituído de DNA de fita dupla, esses vírus podem causar diversas doenças, tais como infecções respiratórias e oculares, gastroenterites, encefalites, pneumonias e infecções no trato respiratório e intestinal

(SINCLAIR; JONES; GERBA, 2009). Devido às altas frequências de detecção dos HAdV em diversos tipos de ecossistemas aquáticos, a ausência de sazonalidade e a sua resistência aos processos de tratamento de água e esgoto, esses agentes patogênicos têm sido considerados como bons indicadores para avaliar a contaminação viral humana no ambiente. Porém, não são modelos adequados para vírus de RNA e vírus envelopados (YE *et al.*, 2016; WIGGINTON; YE; ELLENBERG, 2015).

Os rotavírus A (RVA) são vírus não-envelopados de RNA de fita dupla do gênero Rotavírus, pertencentes a família *Reoviridae* e são responsáveis por severas doenças diarreicas em crianças e jovens no mundo (LINHARES *et al.*, 2011). Apresentam resistência a desinfecção por ultravioleta, atribuída pelo tipo de genoma e por uma tripla camada de proteína que constitui o capsídeo desses vírus (LI *et al.*, 2009). Estão associados a transmissão por uso recreacional da água (SINCLAIR; JONES; GERBA, 2009). VIEIRA *et al.* (2012) estudaram a ocorrência de vírus entéricos na lagoa Rodrigo de Freitas, na cidade do Rio de Janeiro, Brasil, e constataram que RVA possuía maior prevalência entre os vírus alvos da pesquisa.

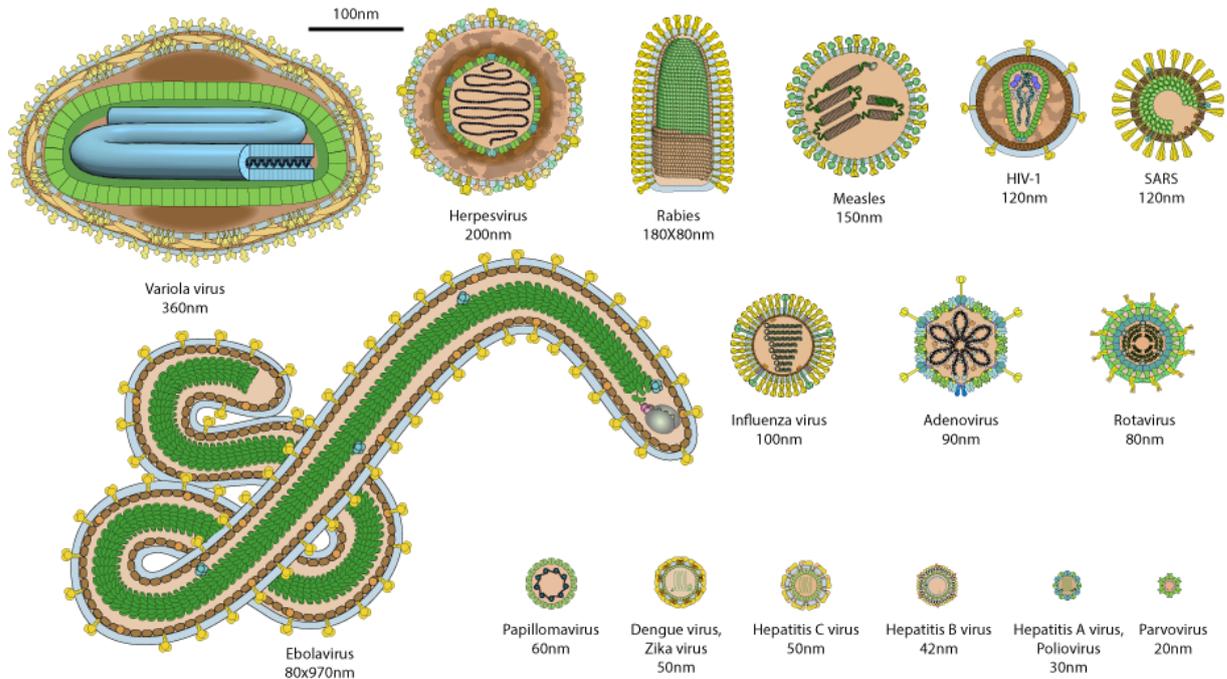
Os enterovírus (EV) são pequenos vírus de RNA não-envelopados pertencentes à família *Picornaviridae*. Incluem as espécies poliovírus, coxsackievirus A e B, echovírus e 49 outros tipos enumerados de 68 a 121 agrupados em quatro espécies taxonômicas EV-A a EV D (BISSEUX *et al.*, 2020). Estão relacionados a frequente causas de meningites assépticas e a doenças que afetam o sistema nervoso, o que pode resultar em paralisia.

Norovírus (NoV) são vírus de RNA de fita simples que podem ser subdivididos em 29 grupos genéticos entre cinco genogrupos (8 em GI, 17 em GII e 1 em GIV e GV). Os NoV GI e GII são comumente associados a doenças humanas (ZHENG *et al.*, 2006). Assim como os adenovírus, os norovírus são reportados como responsáveis por doenças atribuída ao uso recreacional da água (SINCLAIR; JONES; GERBA, 2009), o que destaca a importância do monitoramento dos vírus no ambiente aquático, bem como sua remoção por meio do tratamento de efluentes, pois, uma vez que tratados, os esgotos são reutilizados de forma indireta quando lançados em corpos hídricos de múltiplos usos. O norovírus humano é responsável por mais de 90% dos casos de gastroenterite epidêmica não bacteriana e atribuível a 18% dos pacientes com gastroenterite aguda em todo o mundo (AHMED *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2017).

Vírus da hepatite A (HAV) é um vírus de RNA de fita simples, não-envelopado e de diâmetro entre 27 e 24 nm, pertencente ao gênero *Hepatovirus* da família dos *Piconavírus* (PRADO *et*

al., 2012). São responsáveis pela hepatite A, doença comumente associada a transmissão fecal-oral, bem como pelo contato direto de pessoa – pessoa ou por ingestão de alimentos e água contaminada. A Figura 3.4 apresenta os tamanhos de alguns vírus humanos.

Figura 3.4 - Tamanhos dos vírus humano.



Fonte: (SIB SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS, 2021).

3.1.2 Vírus e os sistemas de tratamento de esgoto

A concentração de vírus entéricos no esgoto é variável, sendo apontada na literatura entre 10 e 10^{10} cópias de genoma por litro (cg/l) no esgoto bruto e entre 10^3 e 10^9 cg/l no efluente tratado, conforme apresentado na Tabela 3.2. Observa-se que valores elevados de vírus podem ser encontrados no lodo oriundo do processo de tratamento. Reporta-se que 20 a 80% dos vírus entéricos presentes no esgoto bruto são removidos por meio do tratamento convencional biológico, o que permite que uma carga viral significativa seja disseminada nos corpos hídricos (PRADO; MIAGOSTOVICH, 2014). Ressalta-se que apesar de 80% de remoção aparentar ser um valor elevado, a quantidade de microrganismos presente nos esgotos é de potência de base 10, portanto, para a remoção ser significativa necessita ser superior a 99%.

Tabela 3.2 – Concentração dos vírus nos sistemas de tratamentos

Vírus	Concentração		
	Afluente (CG/L)	Efluente (CG/L)	Lodo (CG/kg de sólido seco)
HEV	$7,80 \times 10^3 - 5,80 \times 10^8$	$4,00 \times 10^3 - 1,00 \times 10^4$	-
RoV	$1,00 \times 10^1 - 6,31 \times 10^4$	$1,01 \times 10^3 - 4,47 \times 10^6$	$8,00 \times 10^3 - 8,00 \times 10^{5a}$ cg/l
HAdV	$5 \times 10^4 - 3,30 \times 10^{10}$	$9,12 \times 10^6 - 3,72 \times 10^7$ (Efluente secundário)	$1,80 \times 10^4 - 1,2 \times 10^{9a}$ cg/l
		$7,76 \times 10^3 - 7,60 \times 10^9$	$9,40 \times 10^9 - 3,90 \times 10^{11b}$
NoV GI	$1,9 \times 10^9 - 9,30 \times 10^9$	$5,50 \times 10^4 - 7,59 \times 10^5$ (Efluente secundário)	$9,10 \times 10^7 - 6,90 \times 10^{9c}$
		$1,55 \times 10^3 - 2 \times 10^9$	$5,00 \times 10^{7c}$
NoV GII	$1,48 \times 10^5 - 2,60 \times 10^9$	$1,41 \times 10^4 - 9,90 \times 10^8$	$1,60 \times 10^4$ a $4,90 \times 10^{5a}$ cg/l
			$1,5 \times 10^{8c}$
HAV	$1,2 \times 10^5 - 8,90 \times 10^5$	$1,70 \times 10^5 - 3,90 \times 10^5$	$3,10 \times 10^5 - 5,20 \times 10^{5d}$ cg/l
EV	$3,80 \times 10^8 - 2,40 \times 10^9$	$5,50 \times 10^7 - 1,60 \times 10^9$	$5,47 \times 10^7 - 1,15 \times 10^{8a}$
			$5,66 \times 10^6 - 1,44 \times 10^{7d}$
			$1,44 \times 10^7 - 2,40 \times 10^{8b}$
			$2,60 \times 10^7 - 7,60 \times 10^{7c}$

Fonte: adaptado de CORPUZ *et al.* (2020). a – Lodo primário; b – Lodo adensado; c – Lodo digerido anaerobiamente; d – Lodos ativados; e – Lodo anaeróbio.

Além dos vírus entéricos, foi demonstrado que diversos vírus que não estão presentes no trato gastrointestinal humano podem ser encontrados no esgoto, tais como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da influenza, vírus da dengue, zika vírus e o SARV-CoV-2 (MCCALL *et al.*, 2020). A recente pandemia da COVID-19 (*Coronavirus Disease 2019*), causada pelo SARV-CoV-2, um vírus envelopado de RNA de fita simples pertencente à família *Coronaviridae*, trouxe à tona o pouco conhecimento a respeito da presença, ocorrência e persistência dos vírus envelopados no meio ambiente. Apesar de tidos muitas vezes como vírus de baixas concentrações nas excretas humanas e de rápida inativação em ambientes aquáticos, diversas evidências têm demonstrado que para os vírus envelopados humanos, estas afirmações nem sempre estão corretas (YE *et al.*, 2016). Estes tipos de vírus foram responsáveis

por surtos recentes que causaram muitas mortes, como os recentes surtos de Ebola, da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) e da gripe aviária (H5N1) (WIGGINTON;YE; ELLENBERG, 2015).

Tanto o vírus integro do SARS-CoV-2 quanto o seu RNA viral são eliminados nos excrementos corporais, incluindo vômitos, escarros e fezes, que são posteriormente encaminhados aos sistemas de esgotamento sanitário (AMOA; KUMARI; BUX, 2020). Embora se acredite que a principal via de transmissão da COVID-19 seja por meio da inalação de gotícula em suspensão no ar e pela contaminação via fômites através das mãos, as evidências atualmente disponíveis indicam a necessidade de uma melhor compreensão do papel das águas residuárias como fontes potenciais de dados epidemiológicos e como fator de risco para a saúde pública (KITAJIMA *et al.*, 2020), inclusive pelo potencial do vírus de causar uma pandemia zoonótica. Desta forma, faz-se importante limitar a propagação da COVID-19.

O monitoramento no esgoto e o estudo da remoção deste por meio das estações de tratamento, tomam-se ferramentas fundamentais de controle epidemiológico. Estudos realizados na Austrália, China, Itália e Espanha reportam a presença do SARS-CoV-2 no esgoto bruto em concentrações que variam entre 10^4 e 10^6 cg/l (AHMED *et al.*, 2020; LA ROSA *et al.*, 2020; RANDAZZO *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2021). A maioria dos estudos realizados sobre a ocorrência e quantificação do SARS-CoV-2 foram feitos no esgoto bruto, o que torna escassos os dados de quantificação em relação ao efluente tratado e ao lodo oriundo do processo de tratamento (SINGER; WRAY, 2020). A maioria dos estudos são de sistema de tratamento do tipo lodos ativados, sendo do nosso conhecimento, os estudos realizado em sistema de tratamento do tipo Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) executados por KUMAR *et al.* (2021) e ESPINOSA *et al.* (2022). São escassos os estudos de concentração de SARS-CoV-2 em biossólidos, sendo assim lacunas do conhecimento.

Além de um indicador de risco microbiológico, a identificação e quantificação dos vírus presente no esgoto bruto permitem a aplicação da epidemiologia por meio do esgoto, termo derivado da expressão em inglês *wastewater-based epidemiology* (WBE), apresentando-se como uma ferramenta útil de vigilância sanitária e ambiental, na qual, é possível a antecipação de surtos, monitorar distribuição geográfica das doenças e o comportamento dos casos, inclusive, possíveis subnotificações, uma vez que os vírus são excretados tanto pela população sintomática como também pela assintomática.

Esta capacidade de monitoramento dos vírus no ambiente se dá devido aos vírus não serem metabolicamente ativos fora de um hospedeiro suscetível e sua persistência é tipicamente determinada pelo período em que sua camada externa permanece intacta. A recente pandemia de COVID-19 causada pelo SARV-CoV-2 deu destaque ao uso da ferramenta de WBE para monitoramento dos casos em diversos países como Austrália, Itália e Brasil (AHMED *et al.*, 2020; LA ROSA *et al.*, 2020; CHERNICHARO *et al.*, 2020; MOTA *et al.*, 2021).

Quanto à remoção de microrganismos patogênicos nos sistemas de tratamento de esgotos, são diversos os fatores que podem contribuir para sua remoção, tais como operações unitárias adotadas, ocorrência de predação, tempo de detenção hidráulica, luz solar, oxigênio dissolvido e formação de biofilme e desinfecção. Ressalta-se que as ETEs são dimensionadas com a finalidade de remover sólidos suspensos, matéria orgânica e nutrientes, quando não são seguidas de uma etapa de desinfecção.

Os vírus podem ser entendidos como finas partículas coloidais em suspensão, o que torna suscetível a interações com sólidos presentes no ambiente por meio de atração ou repulsão eletrostáticas através de forças atrativas de London-Van der Waals e interações na dupla camada elétrica (CAO *et al.*, 2010). Desta forma, os vírus podem ser facilmente adsorvidos nos sólidos suspensos presentes nos efluentes domésticos. Quando agregado a sólidos maiores, estes microrganismos podem ser removidos por sedimentação (VERBYLA; MIHELICIC, 2015), que pode ser potencializado pelos processos de coagulação e decantação, melhorando a qualidade microbiológica do efluente tratado. BHATT; ARORA e PRAJAPATI (2020) destacam que a sedimentação não é suficiente para garantir a completa remoção dos vírus.

ZHOU *et al.* (2015) notaram uma redução de enterovírus, rotavírus e norovírus de 0,1 a 0,3 logaritmos após o gradeamento fino e uma redução adicional de 1,4-1,7 log após a fase de sedimentação das águas residuais em um sistema anaeróbio-anóxico-óxico (A2O).

Em sistema do tipo lagoas de estabilização, os mecanismos responsáveis pela inativação dos vírus são: luz solar, pH, adsorção e predação (VERBYLA; MIHELICIC, 2015).

Os danos causados aos microrganismos devido à luz solar em sistemas de lagoas de estabilização podem ser classificados como mecanismos diretos ou indiretos. Mecanismos diretos estão relacionados a radiação UVB com comprimento de onda entre 280 e 320 nm e causam a adsorção de fótons pelo vírus seguida de dano ao capsídeo e ao material genético,

enquanto os mecanismos indiretos são governados pela radiação UVB (320 – 400 nm) e/ou pelo comprimento de ondas visível (<500 nm) que ativam moléculas sensibilizadoras presente no meio, tais como o oxigênio dissolvido, ácidos húmicos e restos de algas. Desta maneira, a interação de moléculas fotossensibilizadoras e fótons resultam na formação de radicais reativos e intermediários que levam à destruição do vírus (DAVIES-COLLEY *et al.*, 2000; VERBYLA; MIHELICIC, 2015).

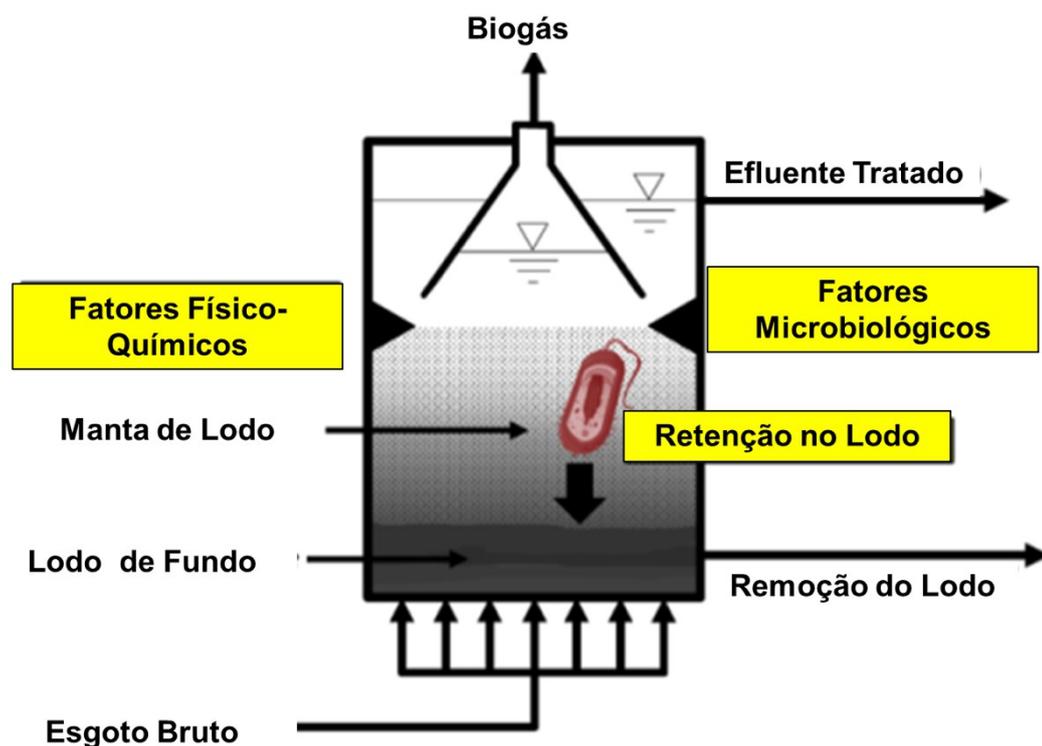
As microalgas possuem capacidade de alterar o pH das águas residuárias ao longo do dia e da profundidade, resultando em um ambiente alcalino durante a fotossíntese, na presença de radiação luminosa, ou ácido quando a respiração é superior a produção de oxigênio (VON SPERLING, 2017). A elevação do oxigênio dissolvido e do pH alcalino mediada por microalgas é prejudicial a vários patógenos presentes nas águas residuais. Uma hipótese existente é que a mudança do pH do esgoto para condições alcalinas ou ácidas podem desempenhar um papel na inativação do vírus, alterando a carga geral do vírus, impactando as proteínas estruturais e aumentando os processos de adsorção (BHATT; ARORA; PRAJAPATI, 2020).

Outro mecanismo de remoção de vírus em lagoas de estabilização é a adsorção na biomassa algal seguida de sedimentação. A agregação dos vírus ao material em suspensão pode ocorrer devido a interações eletrostáticas ou pela presença de substâncias poliméricas extracelulares de nominadas de exopolissacarídeos (EPS) (BHATT; ARORA; PRAJAPATI, 2020). A interação entre vírus e a superfície das microalgas podem variar conforme a presença de íons e alterações do pH. SYMONDS, *et al.* (2014) compararam dois sistemas de tratamento de águas residuais em termos de eficiência de remoção de vírus: 1) lagoa facultativa seguida de duas lagoas de maturação em série 2) reator UASB seguido de lagoa de duas lagoas de maturação. Os pesquisadores concluíram que nas lagoas de tratamento, a remoção de vírus estava relacionada aos sólidos de pequenas dimensões e que desta maneira é improvável que a sedimentação seja o principal mecanismo de remoção de vírus nesse tipo de sistema.

A predação de vírus em lagoas de estabilização ocorre devido à presença de organismos de nível trófico superior (VERBYLA; MIHELICIC, 2015). Esta interação pode auxiliar na remoção de vírus que estão presos no EPS microalgal ou aderidos pelas interações eletrostáticas (BHATT; ARORA; PRAJAPATI, 2020).

Em reatores do tipo UASB, a retenção de patógenos no lodo pode ocorrer devido a filtração física, proveniente da passagem do esgoto por uma manta espessa de lodo ou pela fixação por substâncias poliméricas extracelulares produzidas organismos presentes nos grânulos do lodo de reator, porém este assunto tem sido pouco estudado (OAKLEY; VON SPERLING; VERBYLA, 2017; CHERNICHARO, 2016; METCALF;EDDY AECOM, 2014). Dados na literatura a respeito dos processos de retenção de microrganismos no lodo de reatores UASB são escassos, assumindo-se similares ao que ocorrem nos processos de retenção de biomassa, que inclui (CHERNICHARO, 2016; METCALF;EDDY AECOM, 2014): a fixação de microrganismos a outros ou aos sólidos orgânicos; floculação devido ao crescimento bacteriano; retenção intersticial; adsorção de microrganismos por partículas coloidais devido a forças físico-químicas e difusão pela estrutura granular. Na Figura 3.5 são apresentados os principais mecanismo de remoção de microrganismos em reatores UASB.

Figura 3.5 - Tamanhos dos vírus humano



Fonte: adaptado de OAKLEY; VON SPERLING; VERBYLA (2017).

VERBYLA (2015) estudou os principais fatores que afetam a remoção de patógenos em reatores UASB em escala real no Brasil por meio da quantificação de adenovírus humano pela técnica de qPCR em amostras de esgoto bruto, efluente tratado, manta de lodo e lodo

sedimentado. Destaca-se que as amostras foram centrifugadas por 10 minutos para segregar o pellet (sólidos maiores e sedimentáveis) do sobrenadante (fase líquida e sólidos não sedimentáveis). Foi constatado que a concentração dos vírus no sobrenadante do efluente e da manta de lodo eram semelhantes, porém, as concentrações encontradas no pellet das amostras da manta de lodo foram superiores em 1 log quando comparadas ao pellet do efluente tratado, indicando que os vírus estavam volumetricamente concentrados no lodo. VERBYLA (2015) também constatou que as concentrações de adenovírus por peso seco de sólidos na manta de lodo e no lodo excedente foram semelhantes, o que indicou que a retenção no lodo e a remoção do lodo excedente pode ser um mecanismo para a remoção de adenovírus em Reatores UASB.

Existem poucos estudos que relatam o impacto das condições físico-químicas e microbiológicas na inativação de vírus em reatores UASB. Presume-se que os fatores que são mais relevantes para a remoção e inativação de patógenos nesses sistemas são semelhantes aos fatores responsáveis pela remoção de patógenos em digestores usados para tratar lodo primário e biológico de outros sistemas de tratamento de águas residuais (OAKLEY; VON SPERLING; VERBYLA, 2017).

As condições operacionais dos reatores do tipo UASB podem influenciar na efetividade de remoção de patógenos. Fatores como a ocorrência de sobrecarga hidráulica, elevada velocidade de ascensão, excesso de lodo e perda de sólidos devido à produção de gás podem levar ao aumento da carga de sólidos no efluente tratado, o que possivelmente aumentará a carga de patógenos no efluente final (OAKLEY; VON SPERLING; VERBYLA, 2017). Portanto, é imprescindível que os projetos de tratamento de esgoto sejam idealizados de maneira a evitar curtos-circuitos e condições operacionais não favoráveis. No Brasil, a norma 12.209/2011 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2011) traz recomendações para atendimento de condições hidráulicas adequadas em reatores UASB. Adicionalmente, destaca-se a necessidade de treinamento constante dos operadores das estações e/ou automatização das ETE's para garantir condições propícias a remoção de patógenos. A Tabela 3.3 apresentam os principais parâmetros adotados para projetos de reatores UASB.

Como tratamento avançado para a remoção de patógenos, pode-se utilizar membranas de baixa pressão (microfiltração e ultrafiltração) e membranas de alta pressão (nanofiltração e osmose reversa). A remoção dos microrganismos se baseia na exclusão das partículas virais em função

da porosidade do material e na repulsão eletrostática devido as cargas superficiais da membrana e dos vírus.

Nota-se que em todos os níveis de tratamento de esgoto haverá redução na concentração de vírus no efluente final. Desta maneira, a associação de tecnologias de com a finalidade de se obter múltiplas barreiras com o objetivo de melhorar a qualidade microbiológica do efluente pode ser uma solução para garantir a saúde ambiental.

Tabela 3.3 – Principais parâmetros para projetos de reatores UASB

Fator	Impacto
Velocidade de ascensão	Baixa velocidade de ascensão contribuem para o aumento de remoção de patógenos
Temperatura	Temperatura elevada favorece a remoção de patógenos
Retenção na camada de lodo	O bom desenvolvimento da manta de lodo favorece a remoção de patógenos
Remoção do lodo	A periodicidade da remoção do lodo excedente favorece a remoção de patógenos
Sobrecarga hidráulica	Sobrecargas dificultam a remoção de microrganismos patogênicos
Excesso de lodo acumulado	O acúmulo excessivo de lodo favorece a perda de sólidos no efluente, o que afeta negativamente a remoção de patógenos
Produção de gás	O excesso na produção de gás pode favorecer a perda de sólidos e impactar a remoção de microrganismos

Fonte: adaptado de OAKLEY; VON SPERLING; VERBYLA (2017).

3.2 Virologia Ambiental no Brasil e Minas Gerais

A virologia ambiental é um campo de pesquisa extenso que possui interfaces com políticas públicas das áreas de saneamento, ecossistemas aquáticos, gestão costeira, vigilância sanitária e epidemiologia (MACHADO *et al.*, 2013). Os primeiros estudos em virologia ambiental tiveram início na década de 1940 com pesquisas para detecção de poliovírus em ambientes aquáticos, o que identificou a rota de transmissão fecal-oral da poliomielite, até então tida com uma doença de transmissão pela via respiratória (METCALF *et al.* 1995).

Na década de 1950, um primeiro surto de hepatite transmitido pela água foi relatado como resultado de contaminação por águas residuais do sistema de tratamento de água em Nova Delhi (Índia). Este surto afetou cerca de 230.000 pessoas e foi causado pelo vírus da hepatite E (HEV), e seu agente etiológico foi identificado anos após o episódio (BOSCH, 1998). METCALF *et al.* 1995 definem os anos 80s como início de uma nova era para a virologia ambiental, a qual inclui: (a) o reconhecimento de vírus da hepatite E (HEV) como um vírus entérico com capacidade de transmissão pela água; (b) adaptação de cepas do vírus da hepatite A (HAV) para se replicar em culturas de células e o desenvolvimento de ensaios sensíveis para o antígeno HAV; (c) desenvolvimento de métodos para a concentração de HAV da água; (d) reconhecimento do envolvimento do HAV em epidemias de veiculação hídrica; (e) pesquisas soropidemiológicas de surtos de gastroenterite não bacteriana mostrando a causa por vírus pequenos e arredondados, como calicivírus, incluindo o vírus de Norwalk; (f) demonstração do envolvimento de rotavírus humanos em diarreia infantil; (g) recuperação de novos tipos de adenovírus entéricos, calicivírus e astrovírus de crianças que sofrem de gastroenterite aguda; e (h) o reconhecimento de que surtos de hepatite e gastroenterite podem ser causados pela transmissão de vírus entéricos no meio ambiente.

No Brasil, o início da virologia ambiental é marcado pelo desenvolvimento de metodologias para recuperação de enterovírus de ambientes aquáticos no início da década de 1970, realizadas nas praias da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro. Este fato põe o Brasil como pioneiro na vigilância ambiental de vírus na América Latina (MIAGOSTOVICH; VIEIRA, 2017). Nos anos posteriores, destacam-se o uso da técnica de monitoramento para a identificação de possível surto causado pelo vírus da Hepatite A em um centro de pesquisa no Rio de Janeiro e a demonstração pioneira da ocorrência de rotavírus A em córregos poluídos na cidade de São Paulo (PRADO; MIAGOSTOVICH, 2014).

Na década de 2010, os estudos se voltaram para a ocorrência, quantificação e remoção de vírus entéricos no esgoto assim como em técnicas de concentração dos vírus. Destaca-se que as pesquisas de vírus em esgotos no país estão centralizadas nos estados de Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina, focadas principalmente em lodos ativados, sendo raros estudos fora desse eixo.

Em Minas Gerais, é do nosso conhecimento apenas dois estudos de ocorrência e quantificação de vírus entéricos realizados por ASSIS (2016) e ESPINOSA *et al.* (2022).

ASSIS (2016) estudou a remoção de adenovírus humano e rotavírus A em um sistema de tratamento de esgotos por lodos ativados na cidade de Juiz de Fora e a otimização do protocolo de concentração viral pelo método de floculação com de leite desnatado.

ESPINOSA *et al.* (2022) estudaram a ocorrência de adenovírus no esgoto de Belo Horizonte e a remoção destes microrganismos pelo sistema de tratamento constituído de reator UASB seguido de lagoas de alta taxa em escala piloto.

A atual década de 2020 é marcada pelo monitoramento do novo coronavírus (SARS-CoV-2) em corpos d'água e no esgoto. Na literatura científica brasileira, destacam-se as cidades de Niterói, São Paulo e Belo Horizonte (CHERNICHARO *et al.*, 2020; MOTA *et al.*, 2021; PRADO *et al.*, 2020; PRADO *et al.*, 2021; CLARO *et al.*, 2021; ESPINOSA *et al.*, 2022). Em Minas Gerais, apenas o estudo de ESPINOSA *et al.* (2022) avaliou a remoção do vírus da COVID-19 em um sistema de tratamento do tipo reator UASB seguido de lagoas de alta taxa em escala piloto.

Nota-se que há carência de estudos sobre a ocorrência de vírus entéricos no esgoto do Estado de Minas Gerais. Não há estudos que avaliem vírus de grande importância epidemiológicas, tais como norovírus e rotavírus A. Estudos que avaliam a ocorrência de vírus no lodo são escassos, o que torna o tema relevante para novas pesquisas.

Na Tabela 3.4 são apresentados os estudos mais recentes sobre a ocorrência de vírus nos esgotos brasileiros.

Tabela 3.4 – Principais estudos recentes sobre a ocorrência de vírus nos esgotos Brasileiros

Título	Autor
Molecular detection of hepatitis A virus in urban sewage in Rio de Janeiro, Brazil	VILLAR <i>et al.</i> (2007)
Pesquisa de vírus entéricos humanos em amostras de lodo da estação de tratamento de esgoto (sistema insular) de Florianópolis, SC: padronização e avaliação de técnicas moleculares e de cultura celular na detecção e viabilidade viral	SCHLINDWEIN (2009)
Molecular detection, quantification, and characterization of human polyomavirus JC from wastewater in Rio De Janeiro, Brazil	FUMIAN <i>et al.</i> (2010)
One-year environmental surveillance of rotavirus specie A (RVA) genotypes in circulation after the introduction of the Rotarix vaccine in Rio de Janeiro	FUMIAN <i>et al.</i> (2011)
Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants, Water Research,	PRADO <i>et al.</i> (2011)
Monitoring the hepatitis A virus in urban wastewater from Rio de Janeiro, Brazil	PRADO <i>et al.</i> (2012)
Detection of enteric viruses in activated sludge by feasible concentration methods	PRADO <i>et al.</i> (2014)
Otimização do método de floculação orgânica de concentração viral para avaliação do impacto de tratamento por lodo ativado na estação de tratamento de esgoto Barbosa Lage, Juiz de Fora-Minas Gerais	ASSIS (2016)
Performance of wastewater reclamation systems in enteric vírus removal	PRADO <i>et al.</i> (2019)
Noroviruses in raw sewage, secondary effluents and reclaimed water produced by sand-anthracite filters and membrane bioreactor/reverse osmosis system	PRADO <i>et al.</i> (2019)
Sewage monitoring as an epidemiological surveillance tool to control covid-19: a case study in the city of Belo Horizonte	CHERNICHARO <i>et al.</i> (2020)
Preliminary results of SARS-cov-2 detection in sewerage system in Niterói municipality, Rio de Janeiro, Brazil	PRADO <i>et al.</i> (2020)
Wastewater-based epidemiology as a useful tool to track SARS-cov-2 and support public health policies at municipal level in Brazil	PRADO <i>et al.</i> (2021)
Assessing spatial distribution of COVID-19 prevalence in Brazil using decentralised sewage monitoring	MOTA <i>et al.</i> (2021)
Long-term monitoring of SARS-COV-2 RNA in wastewater in Brazil: A more responsive and economical approach	CLARO <i>et al.</i> (2021)
Reduction and liquid-solid partitioning of SARS-cov-2 and adenovirus throughout the different stages of a pilot-scale wastewater treatment plant	ESPINOSA <i>et al.</i> (2022)

3.3 Métodos de detecção viral

A pesquisa e quantificação de vírus de interesse epidemiológico no ambiente tem ganhado destaque nas últimas décadas como ferramenta para reconhecimento de endemias e antecipação de surtos de uma doença. Este monitoramento teve notória visibilidade com a recente pandemia da COVID-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2, no qual os pesquisadores avaliaram o nível de contaminação da população pelo novo coronavírus. Desta maneira, a quantificação de vírus no esgoto tem papel relevante para a determinação do nível de risco associado à difusão de vírus pela água, a avaliação da eficiência da desinfecção como medida de controle dos vírus lançados em ambientes aquáticos e a vigilância sobre a extensão de difusão de vírus em uma população (BARCELO, 2020).

A pesquisa de vírus nas matrizes ambientais consiste nas seguintes etapas: concentração dos vírus e purificação da amostra, isolamento viral utilizando cultura de células e a detecção de ácidos nucléicos virais por técnicas moleculares (PRADO, 2011).

O cultivo celular é um procedimento laborioso, envolvendo crescimento de células específicas para cada tipo de patógeno e possuem como desvantagens a baixa sensibilidade, elevado tempo de incubação, o crescimento de microrganismo não alvos no meio de cultura e a ocorrência de falsos negativos (YATES, 2017). Métodos de cultura celular são capazes medir a viabilidade e infectividade dos vírus, porém muitos deles não são passíveis de cultivo. A Tabela 3.5 apresenta um resumo com as principais vantagens desvantagens do método de cultura.

Tabela 3.5 – Vantagens e desvantagens do método de cultura

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> • Inferir a viabilidade dos vírus • É possível utilizar os dados obtidos para avaliação quantitativa do risco microbiológico 	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa sensibilidade • Microrganismo não alvos podem crescer no meio (ex: fungos) • Tempo de cultura elevado • Possibilidade de ocorrer falsos negativos com microrganismos na forma viável, mas não culturável

Fonte: YATES (2017).

Métodos moleculares se baseiam na detecção e quantificação do material genético (DNA ou RNA) presente no meio. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma das mais poderosas

tecnologias em biologia molecular e comumente utilizada na detecção de patógenos na água (LAW *et al.*, 2014). Devido a elevada sensibilidade e especificidade, a técnica de qPCR é a mais utilizada para detecção de quantificação de vírus de RNA. Entretanto, deve-se salientar que uma das principais desvantagens dessa técnica é a impossibilidade de inferir a viabilidade viral. FRANCY *et al.* (2011) encontraram uma relação de enterovírus infecciosos para qPCR de 10,7:1 no esgoto bruto. GERBA; BETANCOURT e KITAJIMA (2017) recomendam a proporção de detecção de vírus infeccioso por meio de cultura para vírions (conforme detectado por qPCR) deve ser considerada menor que 1:10.

O funcionamento da PCR consiste na amplificação de uma sequência específica de DNA alvo em um processo cíclico de três etapas: desnaturalização, anelamento e extensão para atingir amplificação da sequência alvo (MANDAL *et al.*, 2011). Outras variações da PCR, como PCR multiplex permitem a detecção simultânea de vários organismos-alvo codificando genes específicos de diversos patógenos na amostra em uma única reação. O método PCR tem a vantagem de análise rápida. no entanto requer primers precisos e mistura de reação ideal para evitar o risco de falso positivo e resultados negativos (LAW *et al.*, 2014; GIRONES *et al.*, 2010). Ainda, a análise por meio da PCR pode ser afetada pela alta dispersão das partículas viras nos ambientes aquáticos e pela presença de inibidores naturais que afetam a reação de amplificação de ácidos nucleicos (GUZMÁN *et al.*, 2007; ROCK *et al.*, 2010). Para a quantificação de RNA, uma etapa adicional ao processo de qPCR é a transcriptase reversa (RT), na qual o RNA é utilizado para sintetizar DNA complementar para dar início ao processo de qPCR.

A RT-qPCR é baseada no ciclo de quantificação (Ct). Esse valor geralmente é obtido pela definição de uma faixa de ciclo de linha de base, abaixo da qual a amplificação não é registrada, para estabelecer uma linha limiar que, ao cruzar as curvas de amplificação, gera valores de Cq. O Cq é inversamente proporcional à concentração inicial do modelo. As amostras são quantificadas comparando seus valores de Ct em relação às curvas padrão específicas do ensaio. As curvas padrão são construídas usando uma série de diluição de materiais de controle padrão, tipicamente de quatro a seis pontos de diluição de 10 vezes com pelo menos três réplicas por ponto e um número definido de moléculas-alvo (BIVIN *et al.*, 2021).

A curva padrão é criada plotando os valores de Cq resultantes em relação às quantidades de cópia do gene (GC) transformada em log dos genes padrões, ajustando uma linha de tendência

linear aos dados ($y = mx + b$). A precisão dos dados quantitativos é fortemente influenciada pela qualidade da curva padrão, refletida por sua inclinação (m), eficiência de PCR, linearidade (valor r^2) e interceptação y (b) (BUSTIN *et al.*, 2009; BIVIN *et al.*, 2021). A eficiência da PCR pode ser calculada a partir da inclinação (m) da linha de tendência, com 100% de eficiência (duplicação do produto da PCR após cada ciclo) caracterizada por uma inclinação de -3,32. Embora eficiências de amplificação entre 90% e 110% sejam consideradas aceitáveis (BUSTIN *et al.*, 2009).

Devido a presença de ácidos húmicos nas amostras de esgoto, é possível haver inibição no processo durante a aplicação da técnica de qPCR, limitando a quantificação dos genes nas amostras. De formar a verificar se há inibição e quantificá-la são utilizados controles positivos que consistem na inserção de uma concentração conhecida de um vírus não presente na amostra, sendo o percentual de recuperação a diferença entre o valor inoculado e a concentração final. Estes vírus podem ser de origem animal, bacteriófagos ou humanos e devem apresentar características físico-químicas similares aos vírus pesquisados. Outra estratégia muito utilizada para garantir que resultados falso-negativos não estejam sendo obtidos é diluir os ácidos nucléicos antes das etapas de amplificação para avaliar a presença de inibidores potenciais que podem afetar a precisão da quantificação (GIRONES *et al.* 2010). A Tabela 3.6 apresenta os prós e contras do uso de métodos moleculares.

Devido à baixa concentração dos vírus no meio aquoso, faz-se necessário a concentração viral cujas técnicas mais utilizadas incluem precipitação pelo método do polietileno glicol (PEG), ultrafiltração, membrana eletronegativa e ultracentrifugação, após a qual a detecção e quantificação do material genético é feita em amostras de águas residuais através de reação em cadeia de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR) (SANGKHAM, 2021).

O método VIRADEL, que usa membranas ou filtros carregados, é mais comumente usado para concentração de vírus em amostras ambientais de água. VIRADEL depende principalmente da carga iônica do filtro e das partículas virais. Em termos gerais, o vírus será adsorvido no filtro de coleta sob condições específicas de pH e força iônica, seguido de eluição viral usando tampão de eluição apropriado (HAMZA; BIBBY, 2019). Os tampões mais comumente usados para eluição viral da matriz são soluções alcalinas de extrato de carne bovina e glicina/NaOH. Uma grande vantagem do procedimento VIRADEL é que os filtros podem ser aplicados para a recuperação simultânea de vírus, bactérias e parasitas de amostras de água (ALI *et al.*, 2004;

HARAMOTO *et al.*, 2011; POLACZYK *et al.*, 2007). A desvantagem de usar o método VIRADEL é que os filtros podem ser obstruídos por amostras de água com alta turbidez. Portanto, etapas de pré-filtragem ou clarificação da amostra podem ser usadas, mas isso deverá ser validado para evitar a perda viral antes da etapa de adsorção (HAMZA; BIBBY, 2019).

Tabela 3.6 – Vantagens e desvantagens dos métodos moleculares

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> • Pode ser utilizado em patógenos não passíveis de cultura • Fornecem informações sobre as características filogenéticas do grupo estudado • Facilita o monitoramento e remoção de microrganismos nas estações de tratamento de esgoto • Possui elevada sensibilidade e em geral, é possível quantificar microrganismos que estão abaixo do limite de detecção de outras técnicas 	<ul style="list-style-type: none"> • Não é possível verificar a infecciosidade dos patógenos • Os protocolos utilizados precisam ser aprimorados e padronizados. • A presença de inibidores pode afetar a análise • Mais rápido que os métodos de cultura

Fonte: GIRONES *et al.* (2010).

Membranas de nitrato de celulose com carga negativa são amplamente utilizadas devido à sua disponibilidade em vários diâmetros, tamanhos de poros, configurações e composições. O vírus se liga ao filtro por forças eletrostáticas. Para aumentar a ligação eletrostática do vírus ao filtro, o pH da água amostras é ajustada para 3,5 e cátions multivalentes (por exemplo, $MgCl_2$, $AlCl_3$) também podem ser adicionados (WALLIS; MELNICK, 1967). Atualmente este método é amplamente utilizado para recuperação de vírus de águas superficiais, bem como de esgoto efluente de tratamento e amostras de esgoto bruto diluído (HAMZA; BIBBY, 2019). Além disso, quando um número significativo de vírus é esperado em uma amostra, a enumeração dos vírus adsorvidos pode ser obtida diretamente com cultura de células sem a necessidade de uma etapa de eluição (PAPAVENTSIS *et al.*, 2005). A taxa de recuperação por meio de membrana carregada negativamente depende da matriz utilizada e tipo de vírus (HAMZA; BIBBY, 2019). HAMZA *et al.* (2009) relataram taxas de recuperação de 21,3% a 100% para poliomavírus, adenovírus, echovírus, e norovírus em águas de rio.

Filtros eletropositivos são capazes de concentrar vírus sem pré-condicionamento da amostra. A eficiência de recuperação de a membrana carregada positivamente é influenciada pelo pH, o tipo de água, compostos orgânicos e turbidez (IKNER *et al.*, 2012).

A ultrafiltração é uma alternativa ao uso do método de adsorção–eluição, uma vez que se baseia na exclusão de tamanho ao invés das interações eletrostáticas entre vírus e a superfícies dos filtros carregadas negativa ou positivamente (IKNER *et al.*, 2012). A ultrafiltração pode ser feita passando a amostra de água através de capilares, membranas ou fibras ocas, com níveis de corte de peso molecular de 30–100 kDa (HAMZA; BIBBY, 2019). A pré-filtragem de amostras de água é necessária para remover sólidos suspensos para limitar a colmatação do filtro.

A ultracentrifugação não é amplamente utilizada na análise viral de amostras de água ambientais devido ao alto custo de capital e à portabilidade do instrumento que limitam seu uso direto nos locais de amostragem (HAMZA; BIBBY, 2019).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da área de estudo e plano de amostragem

O estudo foi realizado no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em parceria com a Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA). Está localizado na Estação de Tratamento de Esgotos do Arrudas (ETE Arrudas), no município de Belo Horizonte, Minas Gerais (coordenadas 19°53'42" S e 43°52'42" W). A ETE Arrudas possui vazão média de 2,3 m³/e atende uma população estimada de 1,4 milhões de habitantes dos municípios de Belo Horizonte e Contagem. Após o tratamento preliminar composto de gradeamento e caixa de areia, uma pequena vazão é desviada para o CePTS para alimentação da planta experimental.

O presente estudo analisou a redução viral em um sistema compacto de tratamento do tipo UASB de vazão de 80 m³/dia instalado no interior do CePTS, conforme as informações apresentadas na tabela 4.1. A configuração do reator é apresentada na figura 4.1. Além do reator, foi monitorado o decaimento dos vírus entéricos e do SARS-CoV-2 no leito de secagem por 8 semanas, a partir de um descarte inicial de 3 m³ de lodo do anaeróbio

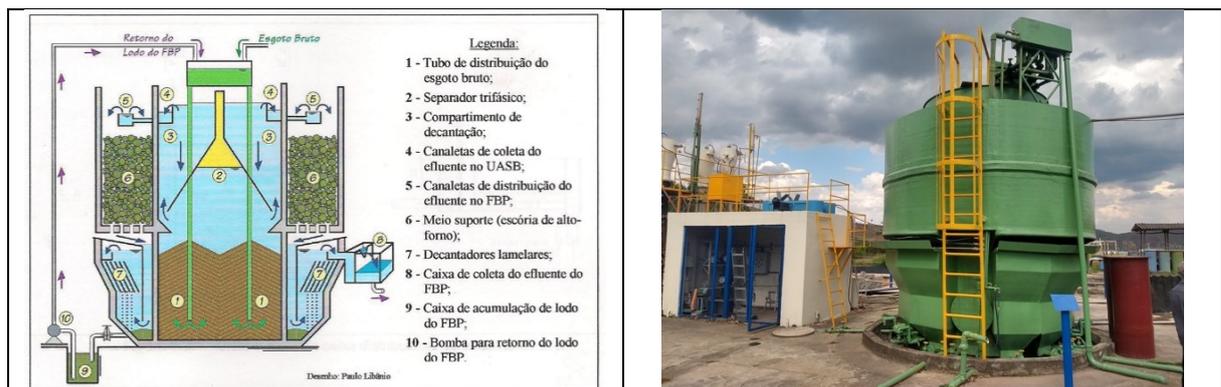
A amostragem realizada variou conforme o tipo de material coletado. Todos os frascos utilizados foram esterilizados por meio da limpeza por hipoclorito, seguido da aplicação de ácido clorídrico, enxágue com água destilada e secagem em estufa a 170°C por 1 hora. As amostras foram mantidas refrigeradas em isopor com gelo reutilizável na temperatura de 4°C até a chegada ao laboratório. As amostragens ocorreram da seguinte maneira:

- Esgoto Bruto: Amostra composta a cada 30 min durante 2 horas;
- Esgoto Tratado: Amostra composta a cada 30 min durante 2 horas;
- Escuma: Amostra simples;
- Lodo UASB: Amostra simples;
- Leito de secagem: Amostra composta, 6-8 pontos de forma randomizada, total de 500g.

Tabela 4.1 – Dados do reator compacto.

Reator UASB		
Informação	Valor	Unidade
Vazão	80	m ³ /dia
Equivalente populacional	640	hab
Diâmetro interno	2,5	m
Altura útil	5	m
Diâmetro do reator	2,5	m
Altura útil do reator	4,8	m ³
Volume total do reator	22,0	m ³
Volume total de digestão	12,1	m ³
Volume de cada câmara de digestão	4,0	m ³
Volume total de decantação	10	m ³
Volume de cada câmara de decantação	3,3	m ³
nº de compartimentos no reator	3	unidades

Figura 4.1 – Reator utilizado no experimento (apenas o reator UASB)



4.2 Caracterização físico-química do efluente

Para caracterização das amostras de esgoto bruto e tratado, foram realizadas análises de Demanda Química de Oxigênio (DQO), medição de pH, Sólidos Suspensos Totais, Sólidos Suspensos Voláteis. Em relação ao lodo, foram realizadas as análises de DQO, pH, Sólidos Totais e Sólidos Voláteis.

A fim de avaliar a influência de condições operacionais na estabilidade e desempenho do reator, foram realizadas as análises de sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) do afluente, efluente, lodo e espuma do reator, segundo a metodologia do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012), assim como as demais análises realizadas nesse estudo. Para as análises de DQO foi utilizado o método de oxidação

da matéria orgânica por uma mistura em ebulição de dicromato de potássio e ácido sulfúrico, a 150 °C por duas horas.

4.3 Quantificação de vírus por meio da técnica RT-qPCR

4.3.1 Concentração viral por meio de membranas eletronegativas

Para a concentração dos vírus foi utilizada a metodologia descrita por AHMED *et al.* (2020b) para as amostras de esgoto bruto. De forma resumida, a metodologia de concentração viral consiste em adicionar uma solução de cloreto de magnésio (2,5 M MgCl) em uma quantidade suficiente para a concentração final seja de 25mM. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e filtradas por meio de membranas eletronegativas estéreis de celulose tamanho de poro de 0,45 µm e diâmetro de 47 mm (HAWG047S6; Merck Millipore, Ltd., Sydney, Austrália) inseridas em um aparato de filtração previamente lavado com hipoclorito de sódio (1-1,25%) seguido por ácido clorídrico (HCl 0,1N) e, posteriormente, autoclavado (121°C durante 15 minutos). O volume de esgoto bruto filtrado variou entre 50 e 100 ml. Ao finalizar a filtração, as membranas eletronegativas foram inseridas em um tubo de 2,0 ml e armazenadas em freezer -20°C. Devido as características físicas do lodo e da espuma, estas não foram submetidas a nenhuma etapa de concentração viral e alíquotas de 0,5g foram submetidas à extração do material genético.

4.3.2 Extração do RNA Viral

Inicialmente, as membranas eletronegativas, o lodo e a espuma foram lisados de forma mecânica em máxima velocidade por 10 minutos no bead beater. Posteriormente, o tubo foi centrifugado a 13.000 x g e durante 1 minuto e o sobrenadante transferido para um tubo limpo onde o DNA e o RNA foram extraídos e purificados extraído por meio do kit AllPrep® PowerViral®DNA/RNA (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Na última etapa do processo de extração, a membrana foi eluída em 100 µL de água livre de DNase e RNase. A concentração do material genético extraído (fsRNA e dsRNA) foi quantificada em espectrofotômetro Nanodrop Lite (Thermofisher).

Figura 4.2 – Kit de filtração



4.3.3 Detecção e quantificação dos vírus por PCR quantitativo (qPCR)

A detecção e quantificação dos vírus em amostras de esgoto foi realizada pela técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), em tempo real para estimar o número de cópias presentes nas amostras. A Tabela 4.2 apresenta a sequência dos pares de iniciadores e a região alvo, além do tamanho do fragmento amplificado.

4.3.3.1 Preparação da Reação de RT-qPCR

a. Elaboração da Curva Padrão

A curva padrão para o SARS-CoV-2 foi elaborada utilizando 2019-nCoV_N_Positive Control fornecido pela IDT (IDT, 2020) e para o rotavírus A e norovírus GI foram customizados blocos gênicos sintéticos (GBlocks, IDT) de acordo com o vírus de referência do banco do NCBI. Diluições seriadas log 10 foram realizadas em triplicata, variaram entre 10^1 e 10^7 . Os parâmetros da reação de qPCR aceitáveis estão de acordo com o MIQE guideline (DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797). As figuras 4.3 a 4.5 apresentam as curvas padrões utilizadas no estudo.

Figura 4.3 – Curva padrão SARS-CoV-2.

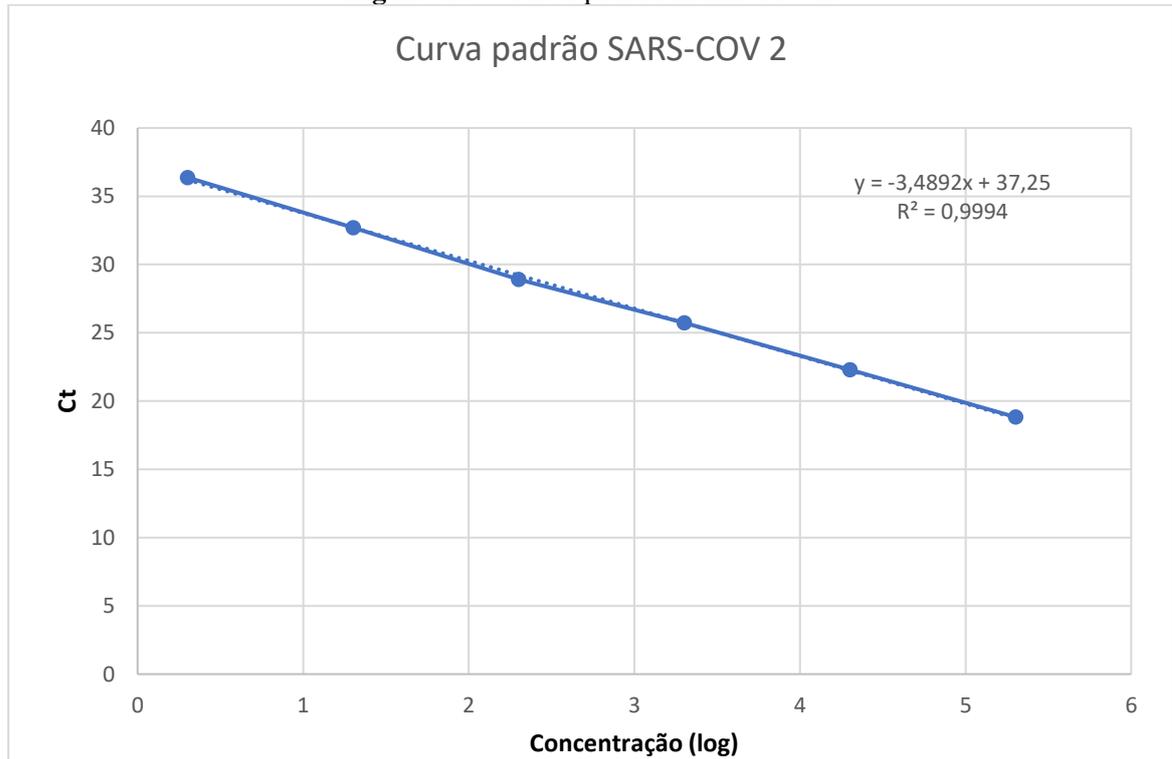


Figura 4.4 – Curva padrão Rotavírus.

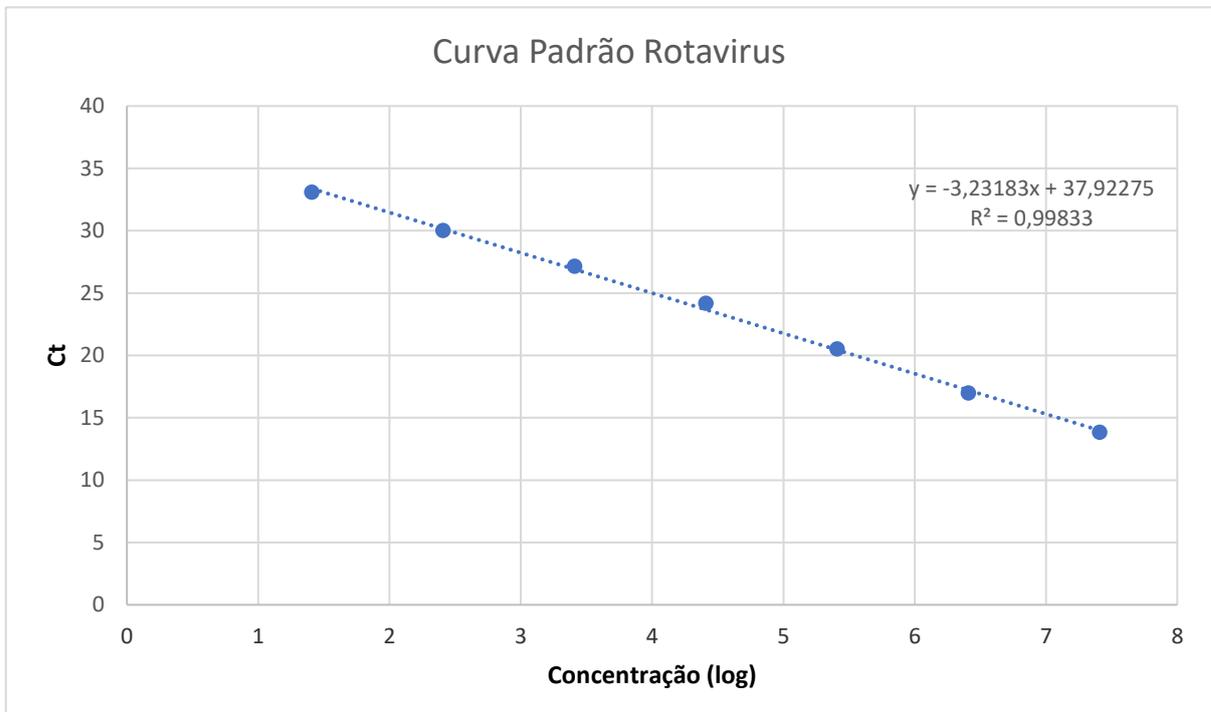
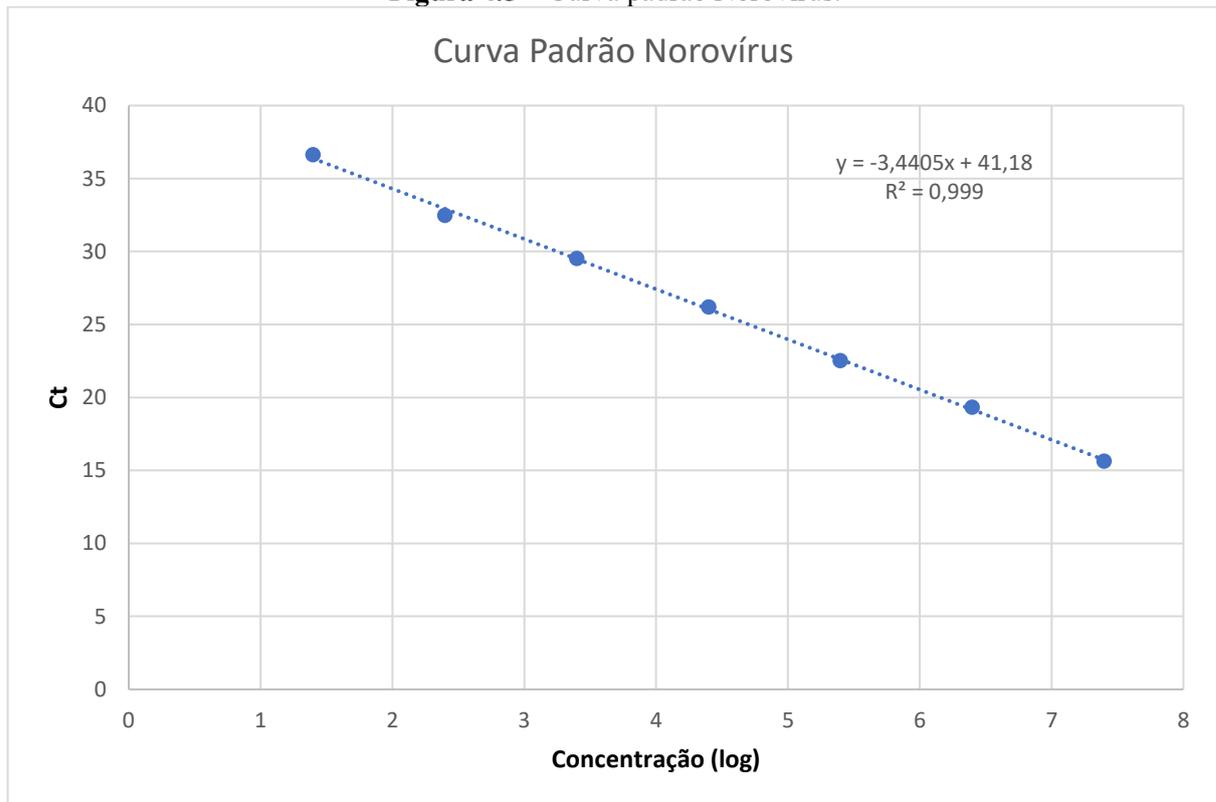


Figura 4.5 – Curva padrão Norovírus.

b. Procedimentos para a amplificação do gene alvo

Os pares de iniciadores utilizados na presente pesquisa estão listados na Tabela 4.2. A identificação e quantificação do SARS-CoV-2 seguiu o protocolo da IDT e utilizou o reagente o *MasterMix Itaq Universal Probes One Step Kit* (Biorad). Para os outros vírus foi utilizado o kit *Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit* (Applied Biosystems™). Os reagentes utilizados na reação e suas respectivas concentrações estão detalhados na Tabela 4.3, sendo as concentrações utilizadas sugeridas pelo fabricante. O volume total de cada reação foi de 20 µl e cada amostra foi realizada em duplicata. Para avaliar o efeito inibitório da matriz ambiental, as mesmas amostras foram submetidas a diluição 1:10 e novamente submetidas a quantificação em duplicata. Em todas as placas foram inseridos controles negativos para avaliar a reação inespecífica entre os primers ou contaminação.

Tabela 4.2 – RT-qPCR iniciadores utilizados no presente estudo.

Vírus alvo	Região alvo	Pares de Iniciadores	Sequência (5'-3')	Tamanho (bp)	Referência (NCBI)
SARS-CoV-2	Nucleocapsídeo (N1)	2019-nCoV-F	GACCCCAAATCAGCGAAAT	72	NC_045512.2
		2019-nCoV-R	TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG		
		Probe	FAM- ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC- BHQ		
Rotavírus grupo A	(NSP3) gene	RV-F	ACCCTCTATGAGCACAATA	73	HM627561.1
		RV-R	GGTCACATAACGCCCTA		
Norovírus GI	RdRp region	NoVGI-F	CAGGCCATGTTCCGCTGGATG	98	NC_001959.2
		NoVGI-F	GTAAATGATGATGGCGTCTAAGG		

Tabela 4.3 – Reação química da qPCR e condições de amplificação.

Reagente	SARS-CoV-2	Rotavírus A	Norovírus
Água ultrapura	3,0 ul	4,04 ul	4,04 ul
Master Mix	10 ul	10 ul	10 ul
Iniciador F	500 nM	500 nM	500 nM
Iniciador R	500 nM	500 nM	500 nM
Sonda	125 nM	NA	NA
Transcriptase reversa	0,5	0,16 ul	0,16 ul
Amostra RNA	5 ul	5 ul	5 ul
Condições de amplificação			
Transcrição Reversa	50 °C por 10 min	48 °C por 30 min	48 °C por 30 min
Ativação da polimerase e Desnaturação do DNA	95 °C por 2 min	95 °C por 10 min	95 °C por 10 min
Número de ciclos	45	40	40
Desnaturação	95 °C por 10 s	95 °C por 10 s	95 °C por 10 s
Anelamento	55 °C por 30s	52 °C por 20s	43 °C por 20s
Extensão		60 °C por 1 min	60 °C por 1 min
Curva de Melting	NA	95 °C por 15s	95 °C por 15s
		60 °C por 15s	60 °C por 15s
		95 °C por 15s	95 °C por 15s

NA Não aplicável

O limite de quantificação (LOQ) foi definido como a menor diluição padrão dentro da faixa linear da curva padrão com os valores de 2, 3 e 25 cópias/reação para SARS-CoV-2, rotavírus A e norovírus, respectivamente. A concentração amostral foi considerada 'inferior ao limite de detecção' (<LOD) se não observado aumento da fluorescência após 40 ciclos. Para amostras

compostas cujo valor médio de Cq foi inferior a 40 e maior do que o Cq correspondente do LOQ, a amostra composta foi categorizada como "positiva, mas abaixo do LOQ". Foi observada inibição significativa das amostras de esgoto bruto, lodo e espuma. O teste de inibição foi feito diluindo as amostras negativas na proporção de 1:10.

4.4 Balanço de massa

Para o balanço de massa se utilizou da média geométrica das concentrações de vírus e da vazão de entrada.

$$\text{Média Geométrica da Concentração: } \bar{C}_{L;S} = \sqrt[n]{C_1 * C_2 * C_3 * \dots * C_n} \quad (\text{Equação 6.1})$$

Onde: $\bar{C}_{L;S}$: concentração média de vírus no esgoto bruto, efluente ou lodo;

C: concentração de vírus na amostra de esgoto bruto, efluente ou lodo;

$$\text{Carga Diária de Vírus: } \bar{L}_{L;S} = \bar{C}_{L;S} * \bar{Q}_{L;S} \quad (\text{Equação 6.2})$$

Onde: $\bar{L}_{L;S}$: é a carga diária de vírus no bruto, efluente ou lodo (cópias de genes/dia);

A vazão média de projeto do reator é 80 m³ por dia. A média de produção de lodo excedente do reator considerada foi de 0,1 m³ por dia. Para o estudo, considerou-se o descarte teórico do lodo excedente após 63 dias do início do experimento.

4.5 Análise estatística dos dados

Utilizou-se o software Microsoft Excel para realizar a estatística descritiva. Foi realizado o teste ANOVA e Mann–Whitney U-test para avaliar diferença estatística entre entrada e saída da concentração de vírus e o teste de SPEARMAN para avaliação de correlação entre a concentração de vírus e parâmetros físico-químicos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características dos efluentes amostrados

A tabela 5.1 apresenta as características físico-químicas do esgoto bruto e do efluente do reator UASB. O valor médio de DQO afluente ao reator UASB foi de 424 mg.L⁻¹, concentração abaixo dos valores médios reportados por VON SPERLING (2007), que são de 600 mg/L. Em relação aos sólidos suspensos totais (SST), a concentração média encontrada foi de 295 mg.L⁻¹, comparando-se aos valores típicos de efluentes domésticos (120 - 360 mg SST.L⁻¹) (METCALF E EDDY, 2014).

Para o efluente tratado, os valores médios de DQO e SST medidos foram de 133 mg.L⁻¹ e 47 mg.L⁻¹, respectivamente. O resultado apresentou uma média de remoção da carga orgânica de 68,66%, valor dentro da faixa de remoção de DQO usualmente esperada para reatores UASB, variando entre 45% e 85% (CHERNICHARO et al., 1999). Para o efluente de reator UASB, a faixa de concentração de SST varia de 40 a 140 mg.L⁻¹ (CHERNICHARO, 2016), o que demonstra que o reator utilizado para o estudo atende aos requisitos de eficiência encontrados na literatura.

Tabela 5.1 – Características físico-químicas do esgoto bruto e do efluente do reator UASB (n = 9 amostras).

	Esgoto Bruto			Efluente UASB		
	Média	Desvio Padrão	Máximo /Mínimo	Média	Desvio Padrão	Máximo /Mínimo
SST (mg/L)	295	165	630 / 40	47	28	83 / 20
DQO (mg/L)	424	138	672 / 265	133	35	190 / 77
pH	7,42	0,18	7,62 / 7,13	7,19	0,12	7,40 / 7,05
Temperatura (°C)	25,95	1,28	27,5 / 23,90	26,10	1,05	27,60 / 24,70

Considerando que as legislações atuais para lançamento de efluentes tratados são as resoluções CONAMA 430/2011 e COPAM 01/2008 para o estado de Minas Gerais, as concentrações máximas permitidas de DQO e SST são 180 mg.L⁻¹ e 150 mg.L⁻¹, respectivamente ou remoção mínima de 55% de DQO para esgotos sanitários (MORAES; SANTOS, 2019), o que demonstra que o sistema atendeu os padrões de lançamento vigentes durante o período de estudo.

Quanto à temperatura e o pH, nota-se que a variação dos dois parâmetros foi pequena durante o período do experimento para ambos os efluentes. O pH se manteve neutro durante a operação do sistema.

Em relação ao lodo do compartimento de digestão, a concentração média de sólidos totais (ST) foi de 56.566 mg/L, o que corresponde a 5,7% de sólidos. Os valores máximos e mínimos foram de 69.267 mg/L (6,92% g/g) e 37.273 mg/L (3,73 % g/g), respectivamente. A relação média STV/ST encontrada foi de 0,58. Os dados apresentados estão próximos com os valores descritos por ANDREOLI *et al.* (2007) para lodos anaeróbios. A temperatura e o pH tiveram médias de 25,40 °C e 7,13, respectivamente e foram próximos aos valores encontrados para a fase líquida. A Tabela 5.2 apresenta um resumo das características do lodo.

Tabela 5.2 – Características do lodo do reator UASB (n = 9 amostras).

Lodo UASB			
	Média	Desvio Padrão	Máximo /Mínimo
ST (mg/L)	56.566	8.799,87	69.267/ 39.273
STV (mg/L)	33.105	10.445,28	47.030 / 10.217
STF (mg/L)	21.366	5.714,96	34.700 / 14.437
DQO (mg/L)	51.187	13.731,59	69.437 / 25.637
pH	7,13	0,23	7,38 / 6,78
Temperatura (°C)	25,40	1,84	27.70 / 22,20

5.2 Concentração de SARS-CoV-2 no esgoto

A Tabela 5.3 apresenta os resultados de amplificação do SARS-CoV-2 para cada tipo de amostra utilizada no experimento. Observa-se que para o esgoto bruto um percentual de 67% (6/9) das amostras coletadas apresentou resultados positivos para o vírus, enquanto as demais matrizes apresentaram amplificação em 67% (6/9) para efluente do reator UASB, 90% (8/9) para o lodo e 67% (6/9) para a espuma. Estudos reportam frequência positiva de 13,3 a 100% nos esgotos domésticos durante a epidemia do novo coronavírus (AHMED *et al.*, 2020a; DOHLA *et al.*, 2020; LA ROSA *et al.*, 2020a; SHARIF *et al.*, 2020; SHERCHAN *et al.*, 2020; O.AMAHMID *et al.*, 2020). Em esgotos tratados pela tecnologia UASB, a taxa de amplificação reportada na literatura é de 100% (KUMAR *et al.*, 2021).

Poucos estudos avaliaram a presença do SARS-CoV-2 no lodo das estações de tratamento de esgoto, sendo do nosso conhecimento, pesquisas realizadas com lodo primário e secundário de lodos ativados (PECCIA *et al.*, 2020; KOCAMEMI *et al.*, 2020). Todos os experimentos obtiveram taxa de positividade de 100% de SARS-CoV-2 nas amostras. BALBOA *et al.* (2021)

associam a maior razão de amostras de lodo amplificadas quando comparado com as de esgotos brutos e tratados a afinidade e ao tempo de detenção dos sólidos.

Quanto a espuma, destaca-se que não foram encontrados estudos sobre a ocorrência de vírus em espuma/sobrenadantes.

Tabela 5.3 – Resultados da amplificação das amostras para o SARS-CoV-2.

Amostra	Data	E. Bruto	UASB	Lodo	Escuma
1	23/09/2020	-	+	-	-
2	30/09/2020	+	-	+	+
3	08/10/2020	-	+	+	+
4	13/10/2020	+	+	+	+
5	21/10/2020	+	-	+	+
6	28/10/2020	-	-	+	-
7	11/11/2020	+	+	+	+
8	19/11/2020	+	+	+	+
9	25/11/2020	+	+	+	-

Para o esgoto bruto, a média geométrica das concentrações de vírus encontradas foi de $1,09 \times 10^4$ de cópias de genes (cg)/litro, variando entre $2,00 \times 10^3$ a $3,76 \times 10^4$ cg/l. PRADO et al. (2021) reportaram valores entre $2,5 \times 10^1$ e $1,25 \times 10^5$ cg/l quantificados no esgoto bruto do município de Niterói, no estado do Rio de Janeiro, durante os meses de abril e agosto de 2020. Mota *et al.* (2021) reportou concentrações do novo coronavírus entre $5,6 \times 10^1$ e $2,9 \times 10^5$ cg/l no esgoto da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais. A nível internacional, os valores encontrados do SARS-CoV-2 em esgoto bruto variam entre 60 e 10^7 cópias/litro (GIACOBBO et al., 2021). ESPINOSA *et al.* (2022), em um estudo experimental realizado no CePTS, em Belo Horizonte, encontrou o valor médio de concentração de $1,20 \times 10^5$ cg/l, valor superior à média encontrada neste trabalho. Desta forma, observa-se que os valores achados no afluente a estação de tratamento estão próximos aos reportados em publicações nacionais e internacionais. A diferença entre os valores reportados pode estar relacionada com interferências nas amostras, inibição na análise de RT-qPCR, nível de infecção da população, metodologia de concentração e período em que a pesquisa foi realizada. A Tabela 5.4 apresenta o resumo das concentrações de SARS-CoV-2 nas matrizes estudadas.

Em relação ao efluente do reator UASB, a concentração média geométrica encontrada no reator foi de $2,39 \times 10^3$ cópias/litro com valores máximos e mínimos de $6,34 \times 10^3$ e $6,73 \times 10^2$

cópias/litro, respectivamente. A redução do RNA viral foi de aproximadamente 0,66 log₁₀. A diferença entre as amostras não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Estudos sobre a ocorrência e remoção de vírus em reatores UASB são escassos, em relação ao vírus da COVID-19, são do nosso conhecimento apenas os trabalhos de KUMAR *et al.* (2021) e ESPINOSA *et al.* (2022). KUMAR *et al.* (2021) encontraram valores afluente e efluente em reator do tipo UASB da ordem de $3,5 \times 10^3$ e $1,8 \times 10^3$ cópias/litro, respectivamente, com taxa de remoção do vírus SARS-CoV-2 superior a 1,3 log₁₀, valor este acima do resultado encontrado neste estudo. Destaca-se que o estudo considerou que as amostras abaixo do limite de detecção (LOD) teriam valor de $1,7 \times 10^2$ cópias/litro. Desta maneira, KUMAR *et al.* (2021) considerou a diferença entre o LOD e o valor máximo medido em um dia para estimar a remoção. Em um cálculo similar para os dados do monitoramento do presente trabalho, no dia 25/11/2020 as concentrações para o esgoto bruto e tratado foram de $2,7 \times 10^4$ e $9,40 \times 10^2$ cópias/litro, respectivamente, o que resulta em uma remoção de 1,44 log₁₀, valor superior ao encontrado pelos autores. ESPINOSA *et al.* (2022) calcularam a remoção do SARS-CoV-2 em reator UASB em 0,18 log₁₀. Os autores avaliaram o pós-tratamento do efluente por lagoas de alta taxa e obtiveram 0,9 log₁₀ de remoção global do vírus. O valor de remoção nesta pesquisa mostra-se superior ao encontrado por ESPINOSA *et al.* (2022), considerando apenas o reator UASB.

Tabela 5.4 – Concentração de SARS-CoV-2 no esgoto.

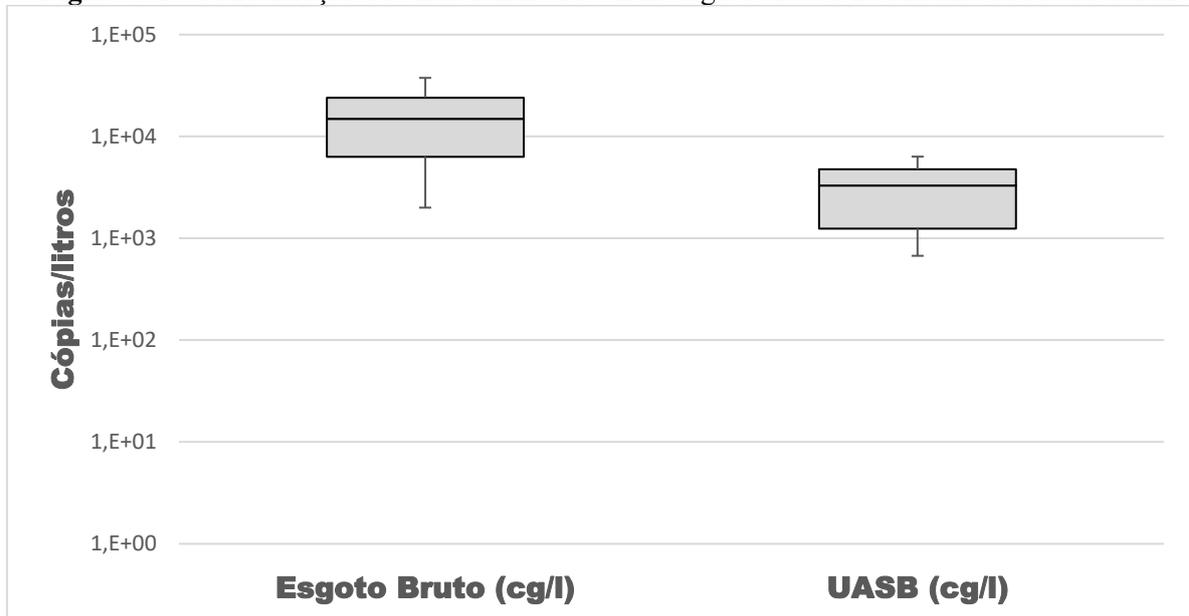
	SARS-CoV-2				
	Média	Média Geo	Desvio Padrão	Máximo	Mínimo
Esgoto Bruto (cg/L)	$1,67 \times 10^4$	$1,09 \times 10^4$	$1,37 \times 10^4$	$3,76 \times 10^4$	$2,00 \times 10^3$
Efluente UASB (cg/L)	$3,24 \times 10^3$	$2,39 \times 10^3$	$2,32 \times 10^3$	$6,34 \times 10^3$	$6,73 \times 10^2$
Lodo UASB (cg/g)	$5,26 \times 10^4$	$4,49 \times 10^4$	$2,29 \times 10^4$	$8,98 \times 10^4$	$7,84 \times 10^3$
Escuma (cg/g)	$1,82 \times 10^4$	$1,49 \times 10^4$	$8,24 \times 10^3$	$2,39 \times 10^4$	$2,67 \times 10^3$

Poucos estudos avaliaram a remoção do vírus SARS-CoV-2 em estações de tratamento de esgoto e grande parte está focada em sistema do tipo de lodos ativados (CASTRO, 2021). O resultado dos estudos sugere que o tratamento biológico possui baixa eficiência de remoção de vírus da COVID-19 (<1 log). A Figura 5.1 apresenta os valores encontrados para o esgoto bruto e reator UASB nesta pesquisa no formato de boxplot. Nota-se que as concentrações de SARS-CoV-2 no esgoto bruto é superior a encontrada no efluente tratado, indicando uma redução da carga viral.

Acerca do lodo do reator UASB, o intervalo de valores encontra foi de $7,84 \times 10^3$ a $8,98 \times 10^4$ cópias/gramas com valor médio de $4,02 \times 10^4$ cg/gramas. ANDREOLI *et al.* (2007) informaram

que a faixa de concentração de vírus no lodo pode variar entre 10 e 10^6 vírus por grama de massa seca. Há poucos estudos que avaliaram a concentração do vírus da COVID-19 no lodo gerado em sistemas de tratamento de esgotos. A maioria dos estudos está voltada para a fase líquida, sendo do nosso conhecimento apenas dois estudos que avaliaram a concentração de vírus no lodo primário realizado por PECCIA *et al.* (2020) e avaliação da ocorrência em lodo primário e de lodos ativados realizado por KOCAMEMI *et al.* (2020), porém, as concentrações são dadas em cópias/litro. Os valores encontrados pelos autores estão entre $1,17 \times 10^4$ a $4,6 \times 10^8$ cópias/l. Multiplicando a média geométrica da concentração de vírus pela média de sólidos totais do lodo temos o valor de $2,21 \times 10^6$ cópias/litro.

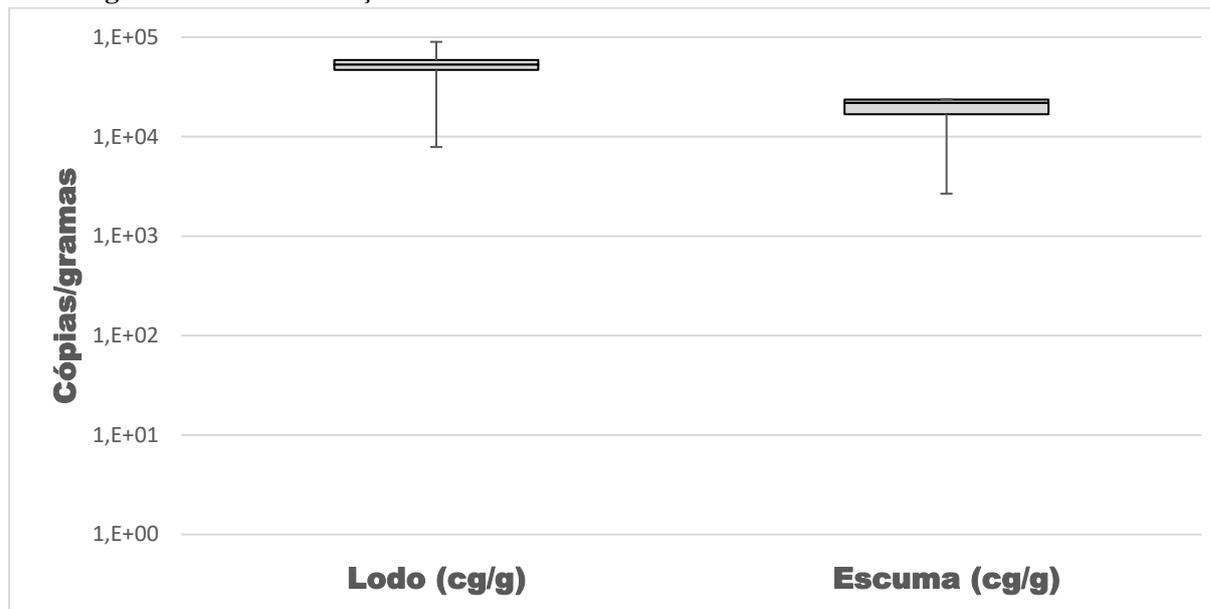
Figura 5.1 - Concentração do vírus SARS-CoV-2 no esgoto bruto e no efluente do reator UASB.



Quanto à espuma, foram encontradas concentrações entre $2,37 \times 10^3$ a $2,39 \times 10^4$ cg/gST, com média geométrica de $1,24 \times 10^4$ cg/gST. Observou-se que o valor ficou abaixo do encontrado para o lodo, porém, de mesma ordem (10^4). Não foram encontrados estudos que façam referência à concentração de vírus nesta matriz, não existindo valores comparativos. A Figura 5.2 apresenta o gráfico de boxplot para o lodo e espuma.

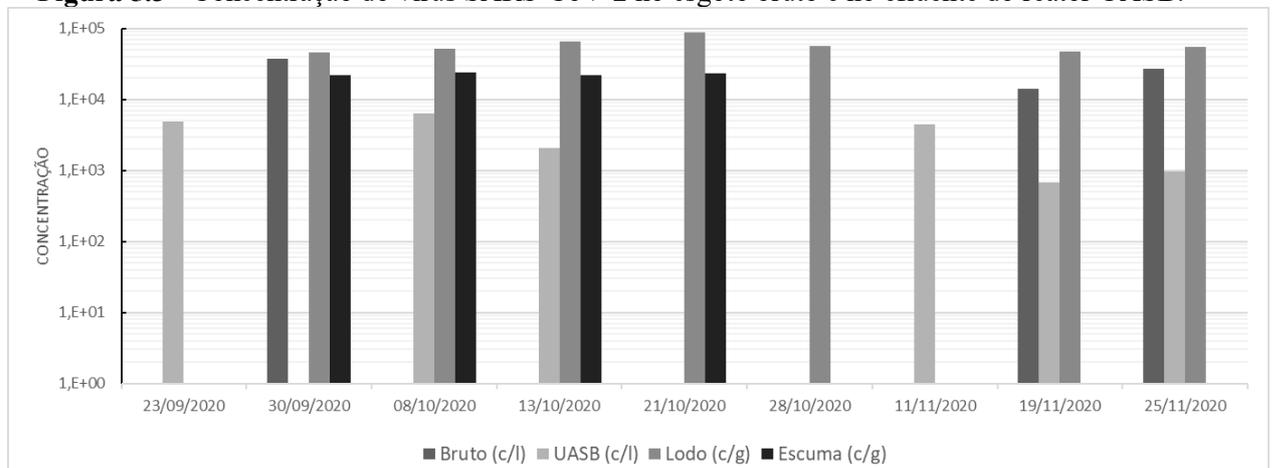
Foi analisada a correlação entre a concentração de vírus presente no esgoto bruto, tratado, lodo e espuma por meio das correlações de Pearson e Spearman. Não foi encontrada correlação entre a concentração de SARS-CoV-2 e os parâmetros físico-químicos em nenhuma das matrizes estudadas ($p > 0,05$).

Figura 5.2 - Concentração do vírus SARS-CoV-2 no lodo do reator UASB e na Escuma.



A figura 5.3 apresenta as concentrações dos vírus SARS-CoV-2 ao longo das coletas. Nota-se que o vírus não foi amplificado em todas as amostras, o que pode indicar baixas concentrações ou inibição na análise de qPCR.

Figura 5.3 - Concentração do vírus SARS-CoV-2 no esgoto bruto e no efluente do reator UASB.



Utilizando-se das médias geométricas da concentração de SARS-CoV-2, foi realizado o balanço diário de cópias de SARS-CoV-2 que entram no reator UASB, conforme apresentado na Tabela 5.5. Observou-se que houve redução de 78% em relação ao esgoto bruto. Notou-se que 29% dos vírus foram removidos por meio do descarte do lodo, o que pode indicar maior afinidade do vírus pela fração sólida.

Pode-se presumir que o restante dos vírus continuou retido na manta permanente no reator devido aos mecanismos de filtração e adsorção, bem como podem ter sofrido predação, decaimento natural, inativação ou desnaturados devido as condições físico-químicas do meio. Esta fração foi denominada de decaimento para fins de cálculo. Foi desconsiderada a espuma devido à baixa taxa de formação.

Apesar da baixa contribuição da espuma para remoção de microrganismo, deve-se alertar para os cuidados com o manejo e descarte do material de maneira a evitar o contato direto do trabalhador, uma vez que ainda não há consenso sobre a possibilidade de infecção humana por meio da rota fecal-oral pelo novo coronavírus.

Ressalta-se que apesar da presença do SARS-CoV-2 no esgoto, avaliada por meio da técnica RT-qPCR, não foi possível diferenciar entre vírus ativos e inativos, sem possibilidade de inferir a infectividade dos vírus nas matrizes. Vírus com envelopes lipídicos geralmente perdem a infectividade em ambientes aquosos. A gripe aviária H5N1, por exemplo, reduz 1 log de concentração em aproximadamente 100 dias em temperatura ambiente em água destilada e o SARS-CoV necessita de 9 dias para a mesma redução em meio de cultura em temperatura ambiente (WIGGINTON; YE; ELLENBERG, 2015).

Tabela 5.5 – Balanço do SARS-CoV-2 no reator UASB.

SARS-CoV-2			
	Vazão (m³/dia)	Cópias/dia	%
Esgoto Bruto	80,00	8,72 x 10 ⁸	100,00
Efluente UASB	80,00	1,91 x 10 ⁸	21,95
Lodo UASB	0,10	2,54 x 10 ⁸	29,14
Decaimento	-	4,26 x 10 ⁸	48,90
Remoção Efluente (log)		0,66	78,05

5.3 Concentração de rotavírus no esgoto

A Tabela 5.6 apresenta os resultados da amplificação do rotavírus para as matrizes utilizadas no estudo. Verifica-se a presença do material genético em 100% das amostras de esgoto bruto, tratado e da espuma, porém, apenas 88,9% (8/9) das amostras de lodo amplificaram. No Brasil, FUMIAN *et al.* (2011) avaliaram a concentração de rotavírus no afluente de uma estação de tratamento de esgoto na região metropolitana do Rio de Janeiro e reportaram a detecção de

RVA em 100% das amostras, não identificando variação sazonal, o que o diferenciou das publicações internacionais que apontam maior ocorrência deste vírus no inverno. Porém, destacou que não houve um inverno rigorosos e nem ampla variação de temperatura em relação as estações do ano. Em contrapartida, ASSIS (2016) realizou monitoramento em uma ETE em Juiz de Fora, Minas Gerais, e detectou RVA em 58,3% das amostras de esgoto bruto avaliadas e identificou avaliação sazonal entre períodos seco e úmido.

Tabela 5.6 – Resultados da amplificação das amostras para o Rotavírus A.

Amostra	Data	E. Bruto	UASB	Lodo	Escuma
1	23/09/2020	+	+	+	+
2	30/09/2020	+	+	+	+
3	08/10/2020	+	+	+	+
4	13/10/2020	+	+	+	+
5	21/10/2020	+	+	+	+
6	28/10/2020	+	+	+	+
7	11/11/2020	+	+	-	+
8	19/11/2020	+	+	+	+
9	25/11/2020	+	+	+	+

Devido ao curto período de realização do estudo, não foi possível identificar sazonalidade neste trabalho, porém, cabe ressaltar que a pesquisa ocorreu no período pré-chuvoso, havendo pancadas isoladas que somaram 200 mm de chuva. O que pode ter contribuído para a elevada frequência do rotavírus no esgoto de Belo Horizonte.

Em relação as amostras de lodo, a amostra de número 7 pode ter apresentado inibição devido a presença de contaminantes, como substâncias húmicas. SCHLINDIWEIN *et al.* (2010).

Em relação a quantificação do vírus, o esgoto bruto apresentou média geométrica de $1,29 \times 10^4$ de cópias de genes (cg)/litro do vírus rotavírus. A concentração variou entre a mínima de $9,09 \times 10^3$ cg/l a máxima de $4,64 \times 10^4$ cg/l. FUMIAN *et al.* (2011) encontraram concentrações de $2,40 \times 10^5$ a $1,16 \times 10^7$ cg/l nos esgotos do Rio de Janeiro. ASSIS (2016) detectou RVA na concentração de $7,82 \times 10^5$ a $4,93 \times 10^7$ cg/L, valores superiores ao encontrado neste estudo.

No efluente, a concentração média geométrica de rotavírus foi de $8,33 \times 10^3$ cg/l, o que corresponde a uma remoção de 46,13% ou 0,27 log₁₀. Esta redução não é estatisticamente significativa ($p > 0,05$). A eficiência média de remoção sugere baixa capacidade do reator do tipo UASB de remover vírus, o que colabora com os trabalhos de PRADO *et al.* (2011) e

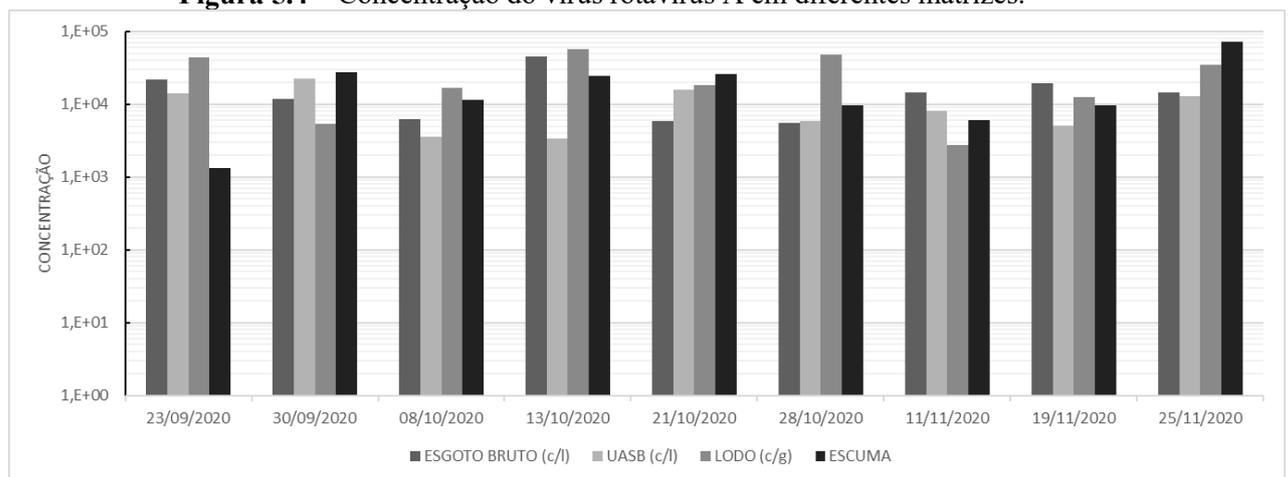
SYMONDS *et al.* (2014). A Tabela 5.7 apresenta a estatística descritiva dos dados das amostras para o rotavírus.

Tabela 5.7 – Estatística descritiva das amostras para o Rotavírus A.

	Rotavírus				
	Média	Média Geo	Desvio Padrão	Máximo	Mínimo
Esgoto Bruto (cg/L)	$1,89 \times 10^4$	$1,70 \times 10^4$	$1,10 \times 10^4$	$4,64 \times 10^4$	$9,09 \times 10^3$
Efluente UASB (cg/L)	$1,08 \times 10^4$	$9,14 \times 10^3$	$6,65 \times 10^3$	$2,34 \times 10^4$	$4,65 \times 10^3$
Lodo UASB (cg/g)	$4,28 \times 10^4$	$4,20 \times 10^4$	$9,11 \times 10^3$	$5,91 \times 10^4$	$3,35 \times 10^4$
Escuma (cg/g)	$2,51 \times 10^4$	$2,10 \times 10^4$	$1,96 \times 10^3$	$7,46 \times 10^4$	$1,30 \times 10^4$

Em comparação a outros processos de tratamento, estudos apontam a remoção entre 0,2 e 1,53 logs em lodos ativados (PRADO *et al.*, 2019; SANO *et al.*, 2016). Valores superiores de remoção foram encontrados em sistemas de tratamento de ultrafiltração com redução de 4,6 a 7,0 logs (QIU *et al.*, 2015). SYMONDS *et al.* (2014) observaram que os rotavírus em efluentes de reator UASB estão associados a partículas menores que 180 micrômetros, o que dificulta a remoção por sedimentação. Os autores sugerem que a formação de grânulos na manta de lodo bem como a ruptura deste influenciam a concentração de vírus no esgoto tratado. GUITIERREZ e NGUYEN (2012) descreveram a alta capacidade dos rotavírus A de se agregarem em sólidos suspenso. Tal fato, pode contribuir para baixa remoção de rotavírus.

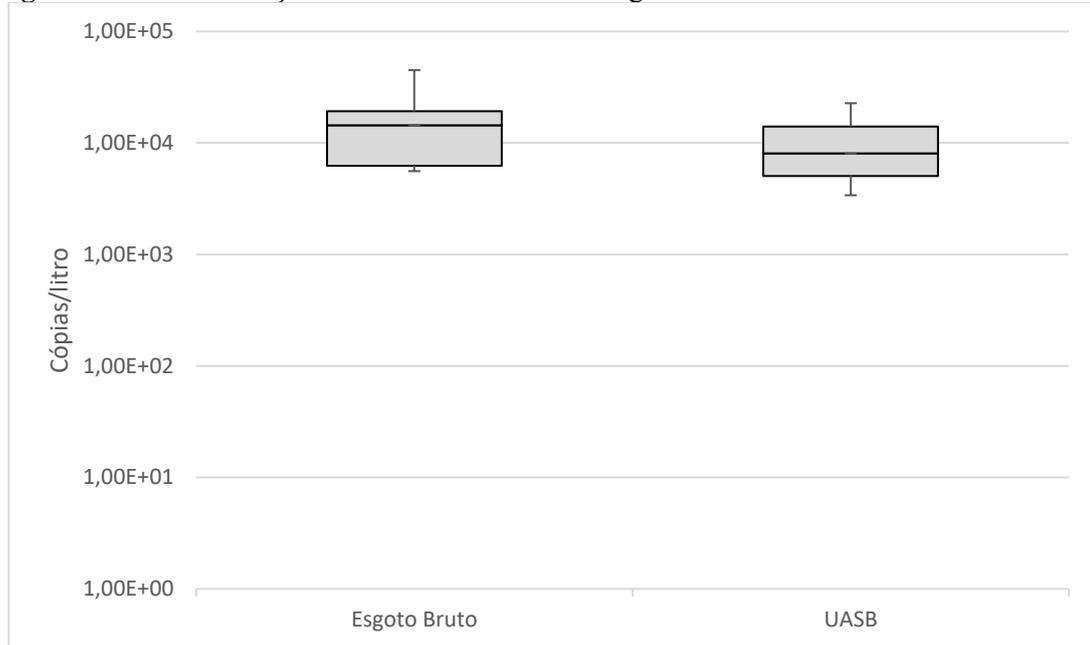
Figura 5.4 – Concentração do vírus rotavírus A em diferentes matrizes.



Em relação ao lodo do reator, a concentração média de rotavírus no lodo foi de $4,20 \times 10^4$ cg/l com valores máximos e mínimos de $5,91 \times 10^4$ cg/g e $3,35 \times 10^4$ cg/g, respectivamente. SCHLINDIWEIN *et al.* (2010) detectaram a presença de rotavirus A em 33% das amostras de lodo no Rio de Janeiro. PRADO *et al.* (2014b) obtiveram 50% das amostras de lodo de uma

estação de lodos ativados da cidade de Rio de Janeiro com concentração variando de 8×10^3 a 8×10^5 cg/l. A média estimada em volume de lodo neste trabalho foi de $2,30 \times 10^6$ cg/l, o que foi superior aos valores da literatura. Há poucos estudos que avaliam a presença de rotavírus no lodo de esgoto, sendo do nosso conhecimento, este o primeiro trabalho de quantificação de rotavírus no esgoto de Belo Horizonte. A figura 5.6 apresenta o diagrama de caixa para o lodo e da espuma. Nota-se que a variação da concentração de rotavírus por grama de lodo foi pequena.

Figura 5.5 – Concentração do vírus rotavírus A no esgoto bruto e no efluente do reator UASB.



A espuma apresentou valores de concentração de rotavírus por gama de matéria seca similar ao encontrado no lodo. Tal fato pode ter relação com perda de sólidos pelo efluente. Não há estudos que buscaram a ocorrência deste vírus nesta matriz, o que dificulta a comparação. Destaca-se a presença dos vírus em 100% das amostras.

Figura 5.6 – Concentração do vírus rotavírus A no lodo e no espuma do reator UASB.

Foi analisada a correlação entre a concentração de vírus presente no esgoto bruto, tratado, lodo e espuma por meio das correlações de Pearson e Spearman. Encontrou-se correlação linear significativa pelo método de Pearson entre os rotavírus presentes no lodo e do efluente do UASB ($r=0,749$ e $p<0,05$). Em relação ao teste de Spearman, houve correlação não-paramétrica entre a concentração de rotavírus e SARS-CoV-2 no lodo ($r=0,821$ e $p<0,05$), o que pode indicar afinidade dos vírus pelos sólidos presente no substrato. A matriz de correlação é apresentada na Tabela 5.8, em que traz os valores dos coeficientes de correlação (r) para as concentrações dos vírus SARS-CoV-2 e o Rotavírus presentes em cada matriz analisada.

Similar ao SARS-CoV-2, foi realizado o balanço de massa no reator UASB para o rotavírus A, conforme apresentado na Tabela 5.9, houve redução de 46,24% da concentração do vírus presente no efluente em relação ao esgoto bruto. Nota-se que o valor de rotavírus que deixa o reator por meio do descarte do lodo é inferior ao encontrado para o vírus da COVID-19. Estudos apontam que os vírus envelopados apresentam afinidade pela fase sólida. Os rotavírus estão associados às partículas finas e em suspensão (SYMONDS *et al.*, 2014; GUITIERREZ; NGUYEN, 2012), o que pode ter contribuído para uma menor concentração no lodo.

Tabela 5.8 – Matriz de correlação entre SARS-CoV-2 e Rotavírus.

		SARS-CoV-2 B.	SARS-CoV-2 U.	SARS-CoV-2 L.	SARS-CoV-2 E ₁ .	Rotavirus B.	Rotavirus U.	Rotavirus L.	Rotavirus E.
SARS-CoV-2 B.	Pearson's r	—							
	Spearman's rho	—							
SARS-CoV-2 U.	Pearson's r	-0.207	—						
	Spearman's rho	0.000	—						
SARS-CoV-2 L.	Pearson's r	-0.717	-0.062	—					
	Spearman's rho	-0.800	0.400	—					
SARS-CoV-2 E ₁ .	Pearson's r	-0.036	0.705	0.429	—				
	Spearman's rho	-0.100	0.800	0.300	—				
Rotavirus B.	Pearson's r	-0.462	-0.274	0.028	-0.008	—			
	Spearman's rho	-0.429	-0.257	-0.036	-0.725	—			
Rotavirus U.	Pearson's r	0.649	-0.021	0.128	0.359	-0.390	—		
	Spearman's rho	0.657	-0.143	-0.071	-0.086	-0.351	—		
Rotavirus L.	Pearson's r	-0.606	0.170	0.301	0.362	0.749*	-0.360	—	
	Spearman's rho	-0.700	0.600	0.821*	0.300	0.383	-0.167	—	
Rotavirus E.	Pearson's r	-0.374	0.147	0.344	0.016	0.358	0.281	0.457	—
	Spearman's rho	-0.429	0.086	0.143	-0.143	0.360	0.317	0.476	—

Note. * p < .05, ** p < .01, *** p < .001

Tabela 5.9 – Balanço de Massa do Rotavírus A no reator UASB.

	Rotavírus		
	Vazão (m ³ /dia)	Cópias/dia	%
Esgoto Bruto	80,00	1,36 x 10 ⁹	100,00
Efluente UASB	80,00	7,31 x 10 ⁸	53,76
Lodo UASB	0,10	2,20 x 10 ⁶	16,95
Decaimento	-	6,26 x 10 ⁸	29,29
Remoção Efluente (log)		0,27	46,24

5.4 Ocorrência de norovírus no esgoto

Os resultados encontrados demonstram a ocorrência de norovírus no esgoto bruto em 44% das amostras (4/9), 56% das amostras de efluente tratado (5/9), 22 % (2/9) das amostras de lodo e 55% das amostras de espuma (5/9), conforme Tabela 5.10.

Todas as amostras apresentaram concentrações abaixo do limite de quantificação, o que pode indicar a baixa prevalência da doença na região estudada e resulta em poucos genes excretados no esgoto. Porém, devido a especificidade do prime utilizado, todos os Ct abaixo de 40 foram considerados positivos (Tabela 5.11).

Tabela 5.10 – Amostras positivas para norovírus.

Amostra	Data	E. Bruto	UASB	Lodo	Escuma	LEITO DE SECAGEM
1	23/09/2020	-	+	-	-	-
2	30/09/2020	-	-	+	-	+
3	08/10/2020	-	+	-	+	-
4	13/10/2020	+	-	-	+	-
5	21/10/2020	+	+	-	+	-
6	28/10/2020	-	-	-	-	-
7	11/11/2020	+	+	-	-	-
8	19/11/2020	-	-	+	+	-
9	25/11/2020	+	+	-	+	-

PRADO *et al.* (2019b) avaliaram a ocorrência de norovírus em quatro estações de tratamento na cidade de São Paulo. Os pesquisadores encontraram taxa de prevalência de 83,3 a 100% das amostras para o esgoto bruto. Após o tratamento por lodos ativados, o efluente tratado apresentou positividade entre 25 e 91% das amostras. A eficiência de remoção neste tratamento variou entre 0,3 e 0,8 log10. As estações possuíam sistema de reúso constituído de tratamento terciário, das quais 2 estações possuíam filtros de areia e carvão, 1 estação tinha tratamento por coagulação seguida de filtração e outra estação com tratamento por membranas. Todos os sistemas possuíam cloração. A água de reúso apresentou faixa de positividade entre 0 e 66% das amostras. Os piores resultados foram originados do tratamento por filtros de areia e carvão. A quantificação de norovírus após o processo de cloração indicou a resistência destes vírus ao processo de cloração.

A resistência dos norovírus aos processos de desinfecção também é demonstrada por QIU *et al* (2015) que avaliaram a remoção dos vírus após a estação de tratamento constituída de lodos ativados com desinfecção por ultravioleta (UV). O resultado global foi de menos de 2 log10 de remoção do patógeno.

Tabela 5.11 – Valores de Ct das amostras para norovírus.

Coleta	Data	ESGOTO BRUTO	UASB	LODO	ESCUMA
		Ct	Ct	Ct	Ct
1	23/09/2020		38,50		
2	30/09/2020			39,87	
3	08/10/2020		37,96		39,77
4	13/10/2020	37,97			39,60
5	21/10/2020	38,00	35,75		39,60
6	28/10/2020				
7	11/11/2020	37,24	39,17		
8	19/11/2020			37,48	39,11
9	25/11/2020	39,43	37,94		39,59

Destaca-se que os norovírus são responsáveis por causar surtos globais de gastroenterites de veiculação hídrica e alimentar. Em um estudo realizado no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, por BARLETTA (2011) demonstrou a ocorrência do vírus 9,17% em amostrar de fezes de crianças entre 0 e 12 anos de idade oriundas de atendimento ambulatoriais ou internações entre os anos de 2008 e 2009. Para o primeiro ano, o vírus apresentou sazonalidade com tendência de ocorrência na estação seca. Cabe destacar, que os esgotos não tratados que apresentam a incidência destes patógenos, colaboram para a contaminação do meio ambiente e favorecem a proliferação de doenças. O estudo realizado por SARMENTO (2020) demonstrou que moluscos bivalves cultivados em águas que apresentam a presença de norovírus podem favorecer a contaminação de consumidores por meio da ingestão destes organismos, que devido ao mecanismo de alimentação por filtração que eles possuem, as partículas virais presentes no meio podem se concentrar em seus tecidos.

No Brasil, estudos que avaliam a presença destes patógenos no esgoto são escassos. Além do estudo anterior, pode-se citar os estudos realizados por FUMIAN *et al.* (2013) e VICTORIA *et al.* (2010) que avaliaram a presença de norovírus nos esgotos da cidade do Rio de Janeiro. Ressalta-se que este é primeiro estudo que avalia a ocorrência de norovírus no esgoto em Minas Gerais.

Os norovírus são estáveis no ambiente, e tem uma dose infecciosa de 50% (ID50) variando entre 18 e 10³ cópias de genoma (LOPMAN *et al.*, 2012; VINJÉ, 2015). A facilidade com que os norovírus são transmitidos e a baixa dose infecciosa necessária para estabelecer uma infecção resultam em surtos extensos.

Estudos investigativos sobre a ocorrência, quantificação e remoção de norovírus no esgoto e nos ambientes aquáticos devem ser realizados para que possam contribuir para a vigilância ambiental das doenças gastrointestinais bem como entender os mecanismos de remoção destes vírus nas ETE's.

5.5 Decaimento de rotavírus no leito de secagem

Leito de secagem é uma tecnologia de baixo custo e de vasto uso no Brasil para remoção de umidade do lodo digerido, principalmente em estações de pequeno e médio porte. São constituídos de paredes de contenção e fundo drenante que cola o percolado e redireciona para o sistema de tratamento. A remoção de umidade ocorre de forma natural pela evaporação e pela drenagem da fase líquida. A NBR 12.209 (ABNT, 2011) recomenda a taxa de aplicação de 15 kg SST/m² de área de leito, número mínimo de 2 unidades e distância menor de 10 metros para transporte do material no interior do leito.

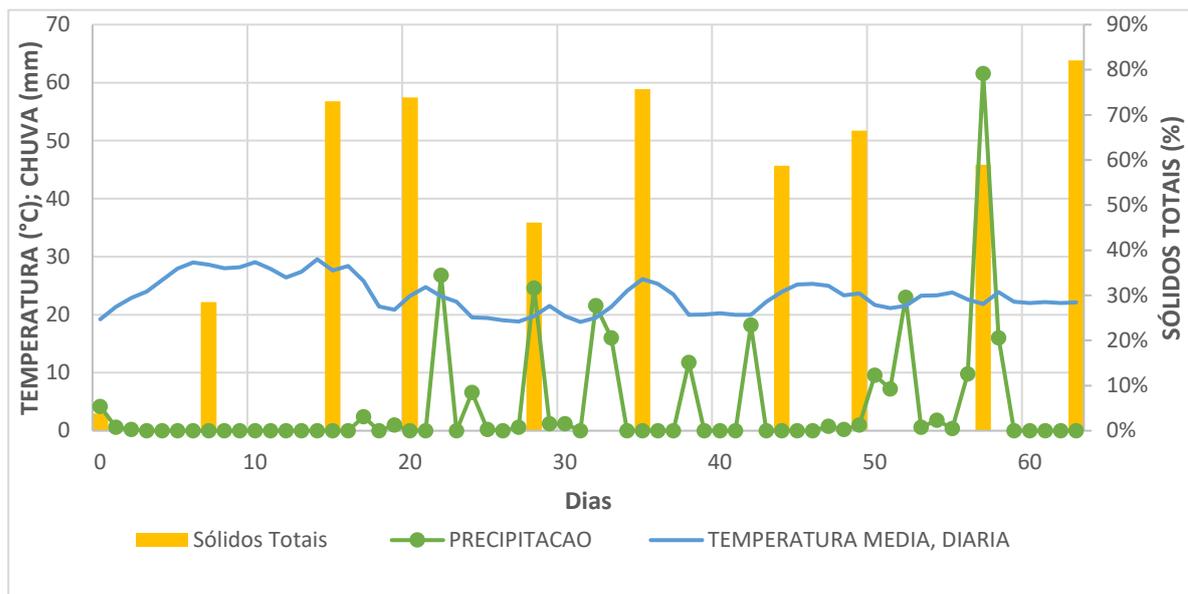
Para o experimento, foram desaguados 3 metros cúbicos do lodo de fundo do reator UASB e avaliou-se a ocorrência do rotavírus A durante o período de 63 dias. (Figura 5.7). Ao final do experimento, a umidade final do lodo atingiu de 15%.

Figura 5.7 – Vista do leito de secagem imediatamente após o desague do lodo (à esquerda) e após 63 dias de secagem (à direita).



Conforme dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2020), temperatura média diária variou de 20 °C a 30 °C com média de 25 °C durante o período de amostragem. A máxima precipitação diária registrada foi de 60 mm. Nota-se que no período foram registrados poucos dias de chuva que somam 200 mm. A Figura 5.8 mostra os dados climatológicos e a concentração de sólidos totais no lodo desaguado no leito de secagem.

Figura 5.8 – Variação de temperatura, precipitação e sólidos totais observadas durante o período de estudo.



Na Tabela 5.12 são apresentadas as amostras de lodo no leito de secagem e os respectivos Ct's durante os 63 dias de experimento. Destaca-se que as concentrações estiveram abaixo do limite de quantificação de rotavírus, porém, devido à especificidade do prime utilizado, todas as amostras com valores inferiores à 40 ciclos foram consideradas positivas. Assim, observou-se que durante todo o monitoramento do leito secagem, o lodo desaguado apresentou a presença de rotavírus A. Os valores de Ct variaram entre 36,16 e 39,29 ciclos, com valor médio de 36,80 e desvio padrão de 1,09. Apesar de não ser possível inferir a infecciosidade do vírus presente no lodo, ele se mostrou persistente no meio.

A literatura indica que os rotavírus A são estáveis em ambientes com baixa e alta umidade relativa com variação do pH entre 3 e 9 (SATTAR *et al.*, 1984). Em um experimento realizado com água da torneira mantida a 4°C, não houve queda significativa da concentração do vírus mesmo após 64 dias, enquanto em 20°C o título foi reduzido em cerca de 2 log₁₀ no mesmo período. Embora a perda de infectividade do vírus tenha sido mais rápida na água de rio mantida a 20°C, levou cerca de 10 dias para uma redução de 2log₁₀ no título da placa do vírus

(RAPHAEL *et al.*, 1985). ABAD *et al.* (1994) avaliou a sobrevivência dos rotavírus A em superfícies porosas (papel e algodão) e não porosas (alumínio, porcelana de porcelana de papel higiênico, azulejo envidraçado, látex e poliestireno) em duas temperaturas diferentes (4°C e 20°C) demonstrando que eles podem persistir por longos períodos (60 dias) nesses tipos de materiais em ambas as temperaturas).

Tabela 5.12 – Presença de rotavírus no leito de secagem após desague do lodo.

Amostra	Data	Presença RVA	Ct
1	23/09/2020	+	36,55
2	30/09/2020	+	36,26
3	08/10/2020	+	35,80
4	13/10/2020	+	36,78
5	21/10/2020	+	36,22
6	28/10/2020	+	35,77
7	06/11/2020	+	37,75
8	11/11/2020	+	39,29
9	19/11/2020	+	36,16
10	25/11/2020	+	37,49

LIMA (2010) avaliou o tratamento do lodo digerido com e sem adição de cal em estufas. A autora verificou que os rotavírus não apresentaram tendência de decaimento independente da redução umidade, adição de cal, forma de disposição nas células de desague e períodos de revolvimento. Ainda, destaca a resistência dos rotavírus na condição de elevação do pH acima de 12 durante 7 dias. O presente trabalho colabora com a hipótese de que os rotavírus persistem no ambiente por longo período, mesmo em condições desfavoráveis.

Estudos sobre decaimento de vírus em leitos de secagem são escassos. Muitos estudos são focados em indicadores bacteriológicos que possuem comportamento diferente. LOPES *et al.* (2020) estudaram o decaimento de adenovírus em leito de secagem por 90 dias nos períodos seco e chuvoso. Constataram a persistência do vírus durante todo o monitoramento, indiferente da estação do ano, o que demonstra a estabilidade do adenovírus no ambiente. Em um estudo futuro, os dois vírus poderão ser comparados para avaliar qual dos microrganismos poderão ser um indicador viral de qualidade sanitária do lodo.

6 CONCLUSÕES

O objetivo geral desta pesquisa é avaliar a ocorrência dos vírus entéricos rotavírus e norovírus bem como o SARS-CoV-2 em uma estação de esgoto do tipo UASB na cidade de Belo Horizonte no período de setembro a novembro de 2020. Após a realização do estudo, seguem as conclusões:

- foi observada a presença dos vírus SARS-CoV-2, rotavírus A e norovírus no esgoto bruto coletado na Região Metropolitana de Belo Horizonte, com taxa de amplificação de 67%, 100% e 44% nas amostras, respectivamente. O que indica a circulação dos vírus e a ocorrência de pessoas contaminadas no período do experimento.
- as concentrações de SARS-CoV-2 observadas no esgoto bruto estavam dentro dos valores reportados na literatura nacional e internacional, porém inferiores aos valores médios de estudos realizados na Região Metropolitana de Belo Horizonte. Essa diferença pode ser devida aos períodos de realização dos estudos. Enquanto as concentrações de rotavírus A e norovírus no esgoto bruto foram inferiores ao reportado na literatura, o que pode indicar a baixa circulação do vírus no período do estudo;
- em relação ao esgoto tratado, as taxas de amostras positivas foram de 67%, 100% e 56% para SARS-CoV-2, rotavírus A e norovírus, respectivamente. Foi observada a redução média de média de 0,66 log₁₀ de SARS-CoV-2 no reator UASB, valor superior ao estudo realizado em Belo Horizonte, porém inferior ao reportado na literatura internacional. Enquanto a remoção de rotavírus A foi de 0,27 log₁₀. O resultado encontrado indica que o reator UASB apresenta baixa eficiência na remoção de vírus, mas pode ser utilizado como etapa anterior a outros sistemas;
- não foi possível diferenciar entre vírus ativos e inativos, sem possibilidade de inferir a infecciosidade dos vírus nas matrizes;
- no lodo de fundo do reator UASB as concentrações de taxa de positividade das amostras para o SARS-CoV-2 e rotavírus foi de 89% para ambos os vírus enquanto foi observada a presença de norovírus em 22% das amostras de lodo. Os vírus deixaram o reator por meio do descarte de lodo na proporção de 29,14% e 16,95% para o novo coronavírus e rotavírus, respectivamente, o que pode indicar uma maior afinidade do SARS-CoV-2 ao lodo quando comparado ao rotavírus A. As concentrações de norovírus foram abaixo do limite de quantificação, não sendo possível estimar a saída no sistema;

- foi detectada a ocorrência de vírus na espuma com taxa de positividade das amostras foram 67%, 100% e 56% para o SARS-CoV-2, rotavírus A e norovírus, respectivamente. Devido a baixa velocidade de formação da espuma, a remoção de vírus por meio da remoção do material é insignificante, porém, deve-se ter cuidado no descarte do material devido a presença de vírus e outros microrganismos;
- Foi avaliada a persistência do rotavírus A no lodo de descarte do reator UASB após o desague no leito de secagem. Constatou-se que o vírus estava presente em 100% das amostras após 2 meses de acompanhamento. Não foi possível verificar o decaimento, pois a concentração dos microrganismos estava abaixo do limite de quantificação, assim, apenas foi possível avaliar a presença ou ausência do vírus. O resultado pode indicar que o rotavírus A possui elevada persistência no meio ambiente.

7 RECOMENDAÇÕES

- Avaliar a viabilidade dos vírus após o tratamento por meio de técnicas de cultivo;
- Avaliar a concentração dos vírus conforme a granulometria do lodo e o impacto do tamanho das partículas na remoção dos vírus;
- Avaliar a viabilidade de rotavírus A durante o período de secagem em leito de pedra, por um período superior a 60 dias com uso da técnica de extração por PEG;
- Comparar o decaimento de adenovírus e rotavírus no leito de secagem.

REFERÊNCIAS

- ABAD, F. X.; PINTO, R. M.; BOSCH, A. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Applied and environmental microbiology*, v. 60, n. 10, p. 3704-3710, 1994.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. NBR 12.209: Elaboração de projetos hidráulico-sanitários de estações de tratamento de esgotos sanitários. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Rio de Janeiro, RJ. 2011.
- AHMED, S. M.; HALL, A. J.; ROBINSON, A. E.; VERHOEF, L.; PREMKUMAR, P.; PARASHAR, U. D.; ... LOPMAN, B. A. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 14, n. 8, p. 725–730, 2014. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70767-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70767-4)>.
- AHMED, WARISH et al. First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Science of the Total Environment*, v. 728, p. 138764, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764>>.
- ALI, M. A.; AL-HERRAWY, A. Z.; EL-HAWAARY, S. E. Detection of enteric viruses, Giardia and Cryptosporidium in two different types of drinking water treatment facilities. *Water Research*, v. 38, n. 18, p. 3931-3939, 2004.
- AMAHMID, O.; YOUSSEF EL GUAMRI; YOUNESS RAKIBI, SAADIA OUIZAT, MOHAMED YAZIDI, BOUCHRA RAZOKI, KHADIJA KAID RASSOU, SOUAD ASMAMA, KHADIJA BOUHOUM & DRISS BELGHYTI (2021): Occurrence of SARS-CoV-2 in excreta, sewage, and environment: epidemiological significance and potential risks, *International Journal of Environmental Health Research*, DOI: 10.1080/09603123.2021.1901865
- AMOAH, I. D.; KUMARI, S.; BUX, F.. Coronaviruses in wastewater processes: Source, fate and potential risks. *Environment International*, v. 143, n. July, p. 105962, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105962>>.
- ANA - AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. Atlas Esgotos: despoluição de bacias hidrográficas. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental, 2017.
- ANDREOLI, CLEVERSON VITORIO; VON SPERLING, MARCOS; FERNANDES, FERNANDO. Sludge Treatment and Disposal. IWA Publishing. 2007. <https://doi.org/10.2166/9781780402130>
- APHA, 2012. Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater, 22nd Ed.: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Washington, DC.
- ASSIS, Andrêssa Silvino Ferreira. Otimização Do Método De Flocculação Orgânica De Concentração Viral Para Avaliação Do Impacto De Tratamento Por Lodo Ativado Na Estação De Tratamento De Esgoto Barbosa Lage, Juiz De Fora-Minas Gerais. Tese. Universidade Federal de Juiz de Fora.
- AW, T. 2018. Environmental Aspects and Features of Critical Pathogen Groups. In: J.B. Rose and B. JiménezCisneros, (eds) Global Water Pathogen Project. Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO. <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.2>

BARLETTA, V. H. Detecção e caracterização molecular de norovírus associados a casos de doença diarréica aguda infantil. Dissertação. Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora: 2011.

BARCELO, D. An environmental and health perspective for COVID-19 outbreak: meteorology and air quality influence, sewage epidemiology indicator, hospitals disinfection, drug therapies and recommendations. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 8, n. 4, p. 104006, 2020.

BALBOA S, MAURICIO-IGLESIAS M, RODRÍGUEZ S, MARTÍNEZ-LAMAS L, VASALLO FJ, REGUEIRO B, LEMA JM 2020. The fate of SARS-CoV-2 in wastewater treatment plants points out the sludge line as a suitable spot for incidence monitoring. doi:10.1101/2020.05.25.20112706.

BHATT, A.; ARORA, P.; PRAJAPATI, S. K. Occurrence, fates and potential treatment approaches for removal of viruses from wastewater: A review with emphasis on SARS-CoV-2, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Volume 8, Issue 5, 2020, 104429. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104429>.

BISSEUX, M.; DEBROAS, D.; MIRAND, A.; ARCHIMBAUD, C.; PEIGUE-LAFEUILLE, H.; BAILLY, J. L.; HENQUELL, C. Monitoring of enterovirus diversity in wastewater by ultra-deep sequencing: An effective complementary tool for clinical enterovirus surveillance. *Water Research*, v. 169, 2020.

BIVINS, A.; KAYA, D.; BIBBY, K.; SIMPSON, S. L.; BUSTIN, S. A.; SHANKS, O. C.; AHMED, W. Variability in RT-qPCR assay parameters indicates unreliable SARS-CoV-2 RNA quantification for wastewater surveillance. *Water Research*, v. 203, p. 117516, 2021.

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

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CAO, H.; TSAI, F. T. C.; RUSCH, K. A. Salinity and soluble organic matter on virus sorption in sand and soil columns. *Groundwater*, v. 48, n. 1, p. 42-52, 2010.

CASTRO, G. B. et al. Global occurrence of SARS-CoV-2 in environmental aquatic matrices and its implications for sanitation and vulnerabilities in Brazil and developing countries. *International Journal of Environmental Health Research*, p. 1-40, 2021., DOI: 10.1080/09603123.2021.1949437

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION 2020. Center for Disease Control and Prevention. 2019–Novel coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR panel primers and probes. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html> (accessed 12 May, 2021)

CHERNICHARO, C. A. D. L.; ARAÚJO, J. C.; MOTA FILHO, C. R.; BRESSANI-RIBEIRO, T.; CHAMHUM-SILVA, L.; LEAL, C. D.; ... AYRIMORAES, S. Sewage monitoring as a surveillance epidemiological tool for COVID-19 control: a case study in the city of Belo Horizonte. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 26, p. 691-699, 2021.

CHERNICHARO, C.A. DE L. Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias. Reatores Anaeróbios, 2nd ed. DESA-UFMG, Belo Horizonte, 2016.

CHERNICHARO, C. A. L. ; HAANDEL, A. V. ; AISSÉ, M. M. ; CAVALCANTI, P. F. F. . Reatores anaeróbios de manta de lodo. In: PROSAB/ABES. (Org.). Tratamento de esgotos

sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo. 1 ed. Rio de Janeiro: PROSAB/ABES, 1999, v. 1, p. 155-197.

CLARO, I. C. M.; CABRAL, A. D.; AUGUSTO, M. R.; DURAN, A. F. A.; GRACIOSA, M. C. P.; FONSECA, F. L. A.; ...; DE FREITAS BUENO, R. Long-term monitoring of SARS-COV-2 RNA in wastewater in Brazil: A more responsive and economical approach. *Water Research*, v. 203, p. 117534, 2021.

CORPUZ, M. V. A., BUONERBA, A., VIGLIOTTA, G., ZARRA, T., BALLESTEROS JR, F., CAMPIGLIA, P., ... NADDEO, V. Viruses in wastewater: occurrence, abundance and detection methods. *Science of the Total Environment*, v. 745, p. 140910, 2020.

DA SILVA, M., VICTORIA, M. AND MIAGOSTOVICH, M. 2016. Rotavirus and Astroviruses. In: J.B. Rose and B. JiménezCisneros, (eds) *Global Water Pathogen Project*. Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO. <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.18>

DAVIS-COLLEY, R. J.; DONNISON, A. M.; SPEED, D. J. Towards a mechanistic understanding of pond disinfection. *Water Science and Technology*, v. 42, n. 10-11, p. 149-158, 2000. doi: <https://doi.org/10.2166/wst.2000.0630>

DOHLA, M., WILBRING, G., SCHULTE, B., KÜMMERER, B.M., DIEGMANN, C., SIB, E., et al., 2020. SARS-CoV-2 in Environmental Samples of Quarantined Households. *medRxiv*, 2020.05.28.20114041

ESPINOSA, M. F.; VERBYLA, M. E.; VASSALLE, L.; LEAL, C.; LEROY-FREITAS, D.; MACHADO, E.; FERNANDES, L.; ROSA-MACHADO, A. T.; CALABRIA, J.; CHERNICHARO C.; MOTA FILHO, C. R. Reduction and liquid-solid partitioning of SARS-CoV-2 and adenovirus throughout the different stages of a pilot-scale wastewater treatment plant. *Water research*, p. 118069, 2022. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118069>

FEACHEM, RICHARD G. et al. *Environmental Classification of Excreta- related Infections. Sanitation and disease: health aspects of excreta and wastewater management*, 1983.

FUMIAN TM, LEITE JPG, ROSE TL, PRADO T, MIAGOSTOVICH MP. One year environmental surveillance of rotavirus specie A (RVA) genotypes in circulation after the introduction of the Rotarix vaccine in Rio de Janeiro, Brazil. *Water Res* 2011; 45:5755-63.

GERBA, C. P. Assessment of enteric pathogen shedding by bathers during recreational activity and its impact on water quality. *Quantitative Microbiology*, 2000.

GIACOBBO, A., RODRIGUES, M. A. S., FERREIRA, J. Z., BERNARDES, A. M., & DE PINHO, M. N. (2021). A critical review on SARS-CoV-2 infectivity in water and wastewater. What do we know?. *Science of The Total Environment*, 774, 145721.

GUTIERREZ, L., NGUYEN, T.H. Interactions between Rotavirus and Suwannee River Organic Matter: Aggregation, Deposition, and Adhesion Force Measurement. *Environmental Science and Technology*, v.46 (16), p. 8705-8713, 2012.

GUZMÁN, C.; JOFRE, J.; BLANCH, A. R.; LUCENA, F. Development of a feasible method to extract somatic coliphages from sludge, soil and treated biowaste. *Journal of virological methods*, v. 144, n. 1-2, p. 41-48, 2007.

HAMZA, I. A.; JURZIK, L.; STANG, A.; SURE, K.; ÜBERLA, K.; WILHELM, M. Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. *Water Research*, v. 43, n. 10, p. 2657-2668, 2009.

- HAMZA, I. A.; BIBBY, K. Critical issues in application of molecular methods to environmental virology. *Journal of virological methods*, v. 266, p. 11-24, 2019.
- HARAMOTO, EIJI; YAMADA, KAORU; NISHIDA, KEI. Prevalence of protozoa, viruses, coliphages and indicator bacteria in groundwater and river water in the Kathmandu Valley, Nepal. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 105, n. 12, p. 711-716, 2011.
- IKNER, L.A.; GERBA, C.P.; BRIGHT, K. R. Concentration and recovery of viruses from water: a comprehensive review. *Food and Environmental Virology*, v. 4, n. 2, p. 41-67, 2012.
- KITAJIMA, M.; AHMED, W., BIBBY, K., CARDUCCI, A.; GERBA, C. P.; HAMILTON, K. A.; ... ROSE, J. B. SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs. *Science of the Total Environment*, v. 739, p. 139076, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139076>>.
- KOCAMEMI, B. A., KURT, H., SAIT, A., SARAC, F., SAATCI, A. M., & PAKDEMIRLI, B. (2020). SARS-CoV-2 detection in Istanbul wastewater treatment plant sludges. *MedRxiv*.
- KUMAR, M.; KURODA, K.; PATEL, A. K.; PATEL, N.; BHATTACHARYA, P.; JOSHI, M.; JOSHI, C. G. Decay of SARS-CoV-2 RNA along the wastewater treatment outfitted with Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) system evaluated through two sample concentration techniques. *Science of the Total Environment*, v. 754, p. 142329, 2021.
- LA ROSA, Giuseppina et al. First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. *Science of the Total Environment*, v. 736, p. 139652, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139652>>.
- LAW, J.W.; AB MUTALIB, N.S.; CHAN, K.G.; LEE, L.H. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: Principles, applications, advantages and limitations. *Front. Microbiol.* 2014, 5, 770
- LI, D.; GU, A. Z.; HE, M.; SHI, H. C.; YANG, W. UV inactivation and resistance of rotavirus evaluated by integrated cell culture and real-time RT-PCR assay. *Water Research*, v. 43, n. 13, p. 3261–3269, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2009.03.044>>.
- LIMA, M. R.P. Uso de estufa agrícola para secagem e higienização de lodo de esgoto. Tese. Universidade de São Paulo: São Paulo, 2010.
- LINHARES, A. C.; STUPKA, J. A.; CIAPPONI, A.; BARDACH, A. E.; GLUJOVSKY, D.; ARUJ, P. K.; ...; COLINDRES, R. Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: Systematic review and meta-analysis. *Reviews in Medical Virology*, v. 21, n. 2, p. 89-109, 2011.
- LOPMAN et al., 2012 B. Lopman, P. Gastañaduy, G.W. Park, A.J. Hall, U.D. Parashar, J. Vinjé Environmental transmission of norovirus gastroenteritis *Curr. Opin. Virol.*, 2 (2012), pp. 96-102
- MADIGAN, Michael T. et al. *Microbiologia de Brock*. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- MCCALL, C.; WU, H.; MIYANI, B.; XAGORARAKI, I. Identification of multiple potential viral diseases in a large urban center using wastewater surveillance. *Water Research*, v. 184, p. 116160, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116160>>.
- MACHADO, C. J. S.; MIAGOSTOVICH, M. P.; LEITE, J. P. G.; VILANI, R. M. Promoção da relação saúde-saneamento-cidade por meio da Virologia Ambiental. *Rev Inform Leg* 50(199):321–345

- MANDAL, P.K.; BISWAS, A.K.; CHOI, K.; PAL, U.K. Methods for rapid detection of foodborne pathogens: An overview. *Am. J. Food. Technol.* 2011, 6, 8–102.
- METCALF & EDDY (2014) *Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery*. 5th Edition, McGraw-Hill, New York.
- METCALF, T.G.; MELNICK, J.L.; ESTES, M.K. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology – A trip of over 50 years. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 461-487
- MIAGOSTOVICH M.P., VIEIRA C.B. *Environmental Virology. Human Virology in Latin America: From Biology to Control*. Springer, 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54567-7_6
- MINAS GERAIS. DELIBERAÇÃO NORMATIVA CERH-MG Nº 65, DE 18 DE JUNHO DE 2020. Estabelece diretrizes, modalidades e procedimentos para o reúso direto e água não potável, proveniente de Estações de Tratamento de Esgotos Sanitários (ETE) de sistemas públicos e privados e dá outras providências.
- MORAIS, N. W. S.; SANTOS, A. B. Dos. Análise dos padrões de lançamento de efluentes em corpos hídricos e de reúso de águas residuárias de diversos estados do Brasil. *Revista DAE*, 2019.
- MOTA, C. R.; BRESSANI-RIBEIRO, T.; ARAÚJO, J. C.; LEAL, C. D.; LEROY-FREITAS, D.; MACHADO, E. C.;...CHERNICHARO, C. A. Assessing spatial distribution of COVID-19 prevalence in Brazil using decentralised sewage monitoring. *Water research*, v. 202, p. 117388, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117388>.
- OAKLEY, S., VON SPERLING, M., VERBYLA, M. Anaerobic Sludge Blanket Reactors. In: J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros, (eds) *Global Water Pathogen Project*. Lansing, MI, UNESCO, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.61>.
- OSUOLALE, OLAYINKA; OKOH, ANTHONY. Human enteric bacteria and viruses in five wastewater treatment plants in the Eastern Cape, South Africa, *Journal of Infection and Public Health*, Volume 10, Issue 5, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.11.012>.
- PAPAVENTSIS, D.; SIAFAKAS, N.; MARKOULATOS, P.; PAPAGEORGIOU, G. T.; KOURTIS, C.; CHATZICHRISTOU, E.;...LEVIDIOTOU, S. Membrane adsorption with direct cell culture combined with reverse transcription-PCR as a fast method for identifying enteroviruses from sewage. *Applied and environmental microbiology*, v. 71, n. 1, p. 72-79, 2005.
- PECCIA, J., ZULLI, A., BRACKNEY, D.E. et al. Measurement of SARS-CoV-2 RNA in wastewater tracks community infection dynamics. *Nat Biotechnol* 38, 1164–1167 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0684-z>
- PRADO, T. Ocorrência de rotavírus, adenovírus, norovírus e vírus da hepatite A em estações de tratamento de esgoto no Rio de Janeiro e avaliação de metodologias de recuperação viral em lodo de esgoto. 2011. Tese de Doutorado.
- PRADO, T.; SILVA, D. M.; Wilma C. Guilayn, Tatiana L. Rose, Ana Maria C. Gaspar, Marize P. Miagostovich, Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants, *Water Research*, Volume 45, Issue 3, 2011, Pages 1287-1297, ISSN 0043-1354, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.012>.
- PRADO, T.; FUMIAN, T. M.; MIAGOSTOVICH, M. P.; GASPAR, A. M. C. Monitoring the hepatitis A virus in urban wastewater from Rio de Janeiro, Brazil. *Transactions of the Royal*

Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 106, n. 2, p. 104–109, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.10.005>>.

PRADO, T., GASPAR, A.M.C., MIAGOSTOVICH, M.P., 2014. Detection of enteric viruses in activated sludge by feasible concentration methods. *Braz. J. Microbiol.* 45, 343–349. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000100049>

PRADO, T.; MIAGOSTOVICH, M. P. Virologia ambiental e saneamento no Brasil: uma revisão narrativa. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 30, p. 1367-1378, 2014.

PRADO, T.; DE CASTRO BRUNI, A.; BARBOSA, M. R. F.; GARCIA, S. C.; DE JESUS MELO, A. M.; SATO, M. I. Z. Performance of wastewater reclamation systems in enteric virus removal, *Sci. Total Environ.* 678 (2019) 33–42, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.435>

PRADO, T.; DE CASTRO BRUNI, A.; BARBOSA, M. R. F.; GARCIA, S. C.; DE JESUS MELO, A. M.; SATO, M. I. Z. Noroviruses in raw sewage, secondary effluents and reclaimed water produced by sand-anthracite filters and membrane bioreactor/reverse osmosis system, *Science of The Total Environment*, Volume 646, 2019, Pages 427-437, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.301>.

PRADO, T.; FUMIAN, T. M.; MANNARINO, C. F.; MARANHÃO, A. G.; SIQUEIRA, M. M.; MIAGOSTOVICH, M. P. Preliminary results of SARS-CoV-2 detection in sewerage system in Niterói municipality, Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 115, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/0074-02760200196>>.

PRADO, T.; FUMIAN, T. M.; MANNARINO, C. F.; RESENDE, P. C.; MOTTA, F. C.; EPPINGHAUS, A. L. F.; ...; MIAGOSTOVICH, M. P. Wastewater-based epidemiology as a useful tool to track SARS-CoV-2 and support public health policies at municipal level in Brazil. *Water research*, v. 191, p. 116810, 2021. DOI 10.1016/j.watres.2021.116810

POLACZYK, AMY L.; ROBERTS, JACQUELINE M.; HILL, VINCENT R. Evaluation of 1MDS electropositive microfilters for simultaneous recovery of multiple microbe classes from tap water. *Journal of Microbiological Methods*, v. 68, n. 2, p. 260-266, 2007.

QIU, Yuanyuan et al. Assessment of human virus removal during municipal wastewater treatment in Edmonton, Canada. *Journal of Applied Microbiology*, v. 119, n. 6, p. 1729-1739, 2015.

RANDAZZO, W.; TRUCHADO, P.; CUEVAS-FERRANDO, E.; SIMÓN, P.; ALLENDE, A.; SÁNCHEZ, G. SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Research*, v. 181, 2020.

RAPHAEL, Roderick A.; SATTAR, Syed A.; SPRINGTHORPE, V. Susan. Long-term survival of human rotavirus in raw and treated river water. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 31, n. 2, p. 124-128, 1985

ROCK, C.; ALUM, A.; ABBASZADEGAN, M.. PCR inhibitor levels in concentrates of biosolid samples predicted by a new method based on excitation-emission matrix spectroscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 24, p. 8102-8109, 2010.

RUSINOL, M.; GIRONES, R. Summary of excreted and waterborne viruses. *Glob. Water Pathog. Proj*, 2017.

SANGKHAM, S., A review on detection of SARS-CoV-2 RNA in wastewater in light of the current knowledge of treatment process for removal of viral particles, *Journal of Environmental Management* (2021),doi: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113563>.

- SANO, DAISUKE et al. Risk management of viral infectious diseases in wastewater reclamation and reuse. *Environment International*, v. 91, p. 220-229, 2016.
- SARMENTO, S. K. Detecção e caracterização dos norovírus em moluscos bivalves da cidade de Arraial do Cabo, RJ. 2020. Tese de Doutorado.
- SATTAR, SYED A. et al. Effect of relative humidity on the airborne survival of rotavirus SA11. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 47, n. 4, p. 879-881, 1984.
- SHARIF, S., IKRAM, A., KHURSHID, A., SALMAN, M., MEHMOOD, N., ARSHAD, Y., et al., 2020. Detection of SARS-Coronavirus-2 in Wastewater, Using the Existing Environmental Surveillance Network: an Epidemiological Gateway to an Early Warning for COVID- 19 in Communities. medRxiv, 2020.06.03.20121426.
- SIB SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS. ViralZone. Disponível em: <<https://viralzone.expasy.org/5216>>. Acesso em: 26 jan. 2021.
- SINCLAIR, R. G.; JONES, E. L.; GERBA, C.P. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: A review. *Journal of applied microbiology*, v. 107, n. 6, p. 1769-1780, 2009.
- SINGER, A. C.; WRAY, R. Detection and survival of SARS in human stool, urine, wastewater and sludge. Preprints, 2020.
- SNS. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos. Ministério do Desenvolvimento Regional, v. 24, n. 1, 2019.
- SCHLINDWEIN, A. D. et al. Detection of enteric viruses in sewage sludge and treated wastewater effluent. *Water Science and Technology*, v. 61, n. 2, p. 537-544, 2010.
- SCHLINDWEIN, A. D. Pesquisa de vírus entéricos humanos em amostras de lodo da estação de tratamento de esgoto (sistema insular) de Florianópolis, SC: padronização e avaliação de técnicas moleculares e de cultura celular na detecção e viabilidade viral. 2009.
- SYMONDS, E.M.; VERBYLA, M.E.; LUKASIK, J.O.; KAFLE, R.C.; BREITBART, M. ; MIHELICIC, J.R. A case study of enteric virus removal and insights into the associated risk of water reuse for two wastewater treatment pond systems in Bolivia, *Water Research*, Volume 65, 2014, 257-270. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.032>.
- TEIXEIRA, D. M.; SPADA, P. K. D. P.; MORAIS, L. L. C. D. S.; FUMIAN, T. M.; DE LIMA, I. C. G.; OLIVEIRA, D. D. S.; ... GABBAY, Y. B. Norovirus genogroups I and II in environmental water samples from Belém city, Northern Brazil. *Journal of Water and Health*, v. 15, n. 1, p. 163–174, 2017.
- VERBYLA, M. E. Pathogen removal in natural wastewater treatment and resource recovery systems: solutions for small cities in an urbanizing world. University of South Florida, 2015. Disponível em: <http://scholarcommons.usf.edu/etd/6044>
- VERBYLA, M. E.; MIHELICIC, J. R. A review of virus removal in wastewater treatment pond systems. *Water Research*, v. 71, n. 860, p. 107–124, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.12.031>>.
- VICTORIA, Matías et al. One year monitoring of norovirus in a sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Water and Health*, v. 8, n. 1, p. 158-165, 2010.
- VIEIRA, C. B.; MENDES, A. C. D. O.; GUIMARÃES, F. R.; FUMIAN, T. M.; LEITE, J. P. G.; GASPAR, A. M. C.; MIAGOSTOVICH, M. P. Detection of enteric viruses in recreational waters of an urban lagoon in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, p. 778-784, 2012.

- VINJÉ, J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *Journal of clinical microbiology*, v. 53, n. 2, p. 373-381, 2015.
- VON SPERLING, MARCOS. *Wastewater Characteristics, Treatment and Disposal*. IWA Publishing. 2007. <<https://doi.org/10.2166/9781780402086>>.
- VON SPERLING, MARCOS. *Lagoas de estabilização*. 3ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2017.
- WALLIS, C.; MELNICK, J.L. Concentration of enteroviruses on membrane filters. *Journal of Virology*, v. 1, n. 3, p. 472-477, 1967.
- WHO. Diarrhoeal disease: Key facts. Who, 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>>.
- WHO. The Weekly Epidemiological Record (WER). *Weekly Epidemiological Record*, 2018.
- WHO; UNICEF. *Progress on household drinking water, sanitation and hygiene 2000-2020: five years into the SDGs*. Geneva: 2021.
- WIGGINTON, K. R.; YE, Y.; ELLENBERG, R. M. Emerging investigators series: the source and fate of pandemic viruses in the urban water cycle. *Environmental Science: Water Research & Technology*, v. 1, n. 6, p. 735-746, 2015.
- YE, Y.; ELLENBERG, R. M.; GRAHAM, K. E.; WIGGINTON, K. R. Survivability, partitioning, and recovery of enveloped viruses in untreated municipal wastewater. *Environmental science & technology*, v. 50, n. 10, p. 5077-5085, 2016.
- YATES, M. Persistence of pathogenic microorganisms in fecal wastes and wastewater matrices: An introduction and overview of data considerations. *Global Water Pathogens Project*. Part, v. 4, 2017.
- ZHANG, D.; ZHANG, X.; YANG, Y.; HUANG, X.; JIANG, J., LI, M., ... QU, J. SARS-CoV-2 spillover into hospital outdoor environments. *Journal of Hazardous Materials Letters*, v. 2, p. 100027, 2021.
- ZHENG, D. P.; ANDO, T.; FANKHAUSER, R. L.; BEARD, R. S.; GLASS, R. I.; MONROE, S. S. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, v. 346, n. 2, p. 312-323, 2006.
- ZHOU, J.; WANG, X. C.; JI, Z.; XU, L.; YU, Z. Source identification of bacterial and viral pathogens and their survival/fading in the process of wastewater treatment, reclamation, and environmental reuse. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 31, n. 1, p. 109-120, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1770-5>.