



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Natália Maria Lanzarini

Diversidade genética de vírus em lixiviados de resíduos sólidos e análise de risco ocupacional

Rio de Janeiro

2021

Natália Maria Lanzarini

Diversidade genética de vírus em lixiviados de resíduos sólidos e análise de risco ocupacional

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Toxicologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Josino Costa Moreira.

Coorientadoras: Prof.^a Dra Marize Pereira Miagostovich e Prof.^a Dra Camille Ferreira Mannarino.

Rio de Janeiro

2021

Título do trabalho em inglês: Genetic diversity of viruses in solid waste leachate and occupational risk analysis.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da ENSP/Fiocruz

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Catálogo na fonte
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde
Biblioteca de Saúde Pública

L297d Lanzarini, Natália Maria.
Diversidade genética de vírus em lixiviados de resíduos sólidos e análise de risco ocupacional / Natália Maria Lanzarini. — 2021.
113 f. : il. color. ; graf. ; mapas ; tab.

Orientador: Josino Costa Moreira.
Coorientadoras: Marize Pereira Miagostovich e Camille Ferreira Mannarino.

Tese (doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2021.

1. Vírus. 2. Líquido Percolado. 3. Rotavirus. 4. Adenovírus Humanos. 5. Medição de Risco. 6. Riscos Ocupacionais. 7. Limpeza Urbana. 8. Categorias de Trabalhadores. I. Título.

CDD – 23.ed. – 363.7284

Natália Maria Lanzarini

Diversidade genética de vírus em lixiviados de resíduos sólidos e análise de risco ocupacional

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Toxicologia Ambiental.

Aprovada em: 01 de junho de 2021.

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Carmen Baur Vieira
Universidade Federal Fluminense - Instituto Biomédico

Prof.^a Dr.^a Bianca Ramalho Quintaes
Companhia Municipal de Limpeza Urbana - Centro de Pesquisas Aplicadas

Prof.^a Dr.^a Maria Inês Zaloni Sato
Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

Prof. Dr. Jaime Lopes da Mota Oliveira
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof.^a Dr.^a Marize Pereira Miagostovich (Coorientadora)
Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Oswaldo Cruz

Prof.^a Dr.^a Camille Ferreira Mannarino (Coorientadora)
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof. Dr. Josino Costa Moreira (Orientador)
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Rio de Janeiro

2021

Dedico esta tese aos trabalhadores de resíduos sólidos e sua invisibilidade social.

AGRADECIMENTOS

À Escola Nacional de Saúde Pública e ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente pela oportunidade de cursar o doutorado na instituição e pelo apoio financeiro. Agradeço aos atuais e ex-coordenadores que estiveram presentes durante esses quatro anos: Andrea Sobral e André Perissé, Liliane Teixeira e Ariane Larentis. Agradeço também o suporte de Selma Ribeiro e Marcia Gonçalves da secretaria do programa e aos professores das disciplinas pelos aprendizados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos (Código de Financiamento 001) e ao edital PRINT-CAPES pelo estágio de doutorado sanduíche no *Laboratory of Hygiene and Environmental Virology*, da Universidade de Pisa, Itália.

Aos meus orientadores, Dr. Josino Moreira, Dr^a Marize Miagostovich e Dr^a Camille Mannarino por simplesmente serem quem são. Palavras não expressam a gratidão. Neste trabalho multidisciplinar, ter oportunidade de ser orientada por vocês é um privilégio. Foram tantos aprendizados! Obrigada por sempre estarem presentes, mesmo quando estive na Itália, pelas palavras acolhedoras e ensinamentos.

Aos membros da banca, Dr^a Carmen Baur, Dr^a Bianca Quintaes, Dra Maria Inês Sato e Dr. Jaime Oliveira, assim como os suplentes Dr^a Adriana Correa e Dr. Paulo Barrocas por aceitarem o convite para participar desta tese de doutorado.

Aos professores do *Laboratory of Hygiene and Environmental Virology*, da Universidade de Pisa, Itália: minha supervisora Dr^a Annalaura Carducci, Dr. Marco Verani e a pós-doutoranda Dr^a Ileana Fiderigi, por me acolherem no laboratório e por todo aprendizado, presencial e à distância, mesmo com a pandemia.

À Companhia Municipal de Limpeza Urbana (COMLURB) pela parceria indispensável para a realização dessa tese, ao suporte de todos os membros do Laboratório de Microbiologia nas coletas e aos garis da COMLURB, Ruy Magalhães, André Henriques e Anderson Lima.

À Ciclus Ambiental, operadora da CTR Rio, por concretizar essa colaboração e abrir as portas para que pudéssemos realizar coletas e poder realizar a pesquisa.

Aos colegas servidores e alunos do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA/IOC/Fiocruz). Obrigada por todo o aprendizado durante esses quatro anos de doutorado. Nossa família LVCA cresceu e não cabe nesses agradecimentos e todos vocês são muito especiais. Um agradecimento especial à minha querida aluna de iniciação científica, Rafaela Marinho, um abraço virtual para a maravilhosa amiga Lorena, aos servidores Fernando César Ferreira e Maria da Penha Xavier (Dadade) e à pós-doutoranda e amiga desde que eu era IC, Tatiana Prado.

Ao Laboratório do Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental (DSSA/ENSP) e ao Laboratório de Toxicologia Ambiental (CESTEH/ENSP) pelo apoio nas análises físico-químicas e por nos agregar brevemente.

Ao Centro de Tecnologia da Indústria Química e Têxtil (SENAI CETIQT) pela parceria, mesmo no meio da pandemia, e ao pós-doutorando bioinformata Lucas Freitas do Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo (IOC/Fiocruz) pelo apoio nas análises de metagenoma viral.

Aos grupos Bolsistas CAPES e Doutorandos na Itália e à técnica Francisca das Chagas da Linha Direta da CAPES, pelo suporte durante o período de doutorado-sanduíche.

Aos companheiros de doutorado da ENSP, minha querida turma onde pude conhecer pessoas tão especiais: Adriana Pereira, Bruna Pagliari, Carla de Souza e Denise Alves, compartilhamos tantas histórias.

Ao meu marido Jorlan Fernandes por me apoiar em tudo, aos meus pais Wilson e Vergínia e aos meus queridos irmãos Juliana, Cássia, Cíntia, Tomás, Vítor e Pedro. Meus sobrinhos e afilhados amados são a certeza que o amor e o sorriso sempre devem estar presentes no nosso dia a dia, mesmo à distância e com tantos acontecimentos que enfrentamos no Brasil e no mundo.

Às grandes amigas que construí na Fiocruz: Alexandre dos Santos, Juliana Guimarães, Gentil Bentes, Juliana Melgaço, Fabiana Melgaço, Noemi Gardinali, Lyana Capobianco, Priscila Born e Ana Carolina Fonseca.

Por estar viva e poder fazer ciência e compartilhar conhecimento.

Entrei na Fiocruz em 2011, como aluna de iniciação científica, e, em 2021, finalizo o doutorado agradecendo a todos que fizeram parte de minha formação e também aqueles que acompanharam todo processo, sejam os colegas, amigos ou a família.

Esta tese está no âmbito das atividades da Fiocruz como Centro Colaborador da OPAS/OMS em Saúde Pública e Ambiental.

Antes deste vírus, a humanidade já estava ameaçada de asfixia.

Achille Mbembe, 2020.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo descrever a ocorrência e diversidade genética de vírus em lixiviados de resíduos sólidos de caminhões de coleta e aterro sanitário a fim de determinar o risco de desenvolvimento de doenças gastrointestinais em trabalhadores de limpeza urbana no município do Rio de Janeiro pela exposição a esses vírus. Inicialmente, um estudo de contaminação artificial estabeleceu a associação do método de ultracentrifugação com o kit de extração *QIAamp Fast DNA Stool mini kit*[®] como a metodologia mais eficaz para recuperação de vírus nesta matriz. A seguir, de março a dezembro/2019, realizou-se a coleta de amostras de lixiviado de caminhão da Estação de Transferência de Resíduos (ETR Jacarepaguá) e de aterro sanitário da Central de Tratamento de Resíduos (CTR Rio). Com o objetivo de se avaliar a diversidade genética viral, realizou-se o sequenciamento de nova geração pelo sistema *Illumina* em um *pool* de cada matriz. A análise utilizando o programa *VirSorter* revelou 46 famílias virais no lixiviado, com diferença significativa no lixiviado de caminhão quando comparado com o aterro sanitário. Posteriormente, com o objetivo de se avaliar o risco de contaminação por vírus humanos, investigou-se a ocorrência e concentração de rotavírus espécie A (RVA) e de adenovírus humano (HAdV), utilizando sistema *TaqMan* de PCR em tempo real (qPCR) com e sem tratamento prévio com propídio monoazida (PMA). Ambos, RVA e HAdV foram detectados por qPCR em 100% (9/9) no lixiviado de caminhão, enquanto no aterro a taxa de detecção foi de 31% (4/13) e 85% (11/13), respectivamente. As concentrações por qPCR e/ou PMA-qPCR variaram de $4,11 \times 10^3$ a $3,39 \times 10^7$ cópias de genoma (CG) 100 ml^{-1} para RVA e de $8,31 \times 10^1$ a $6,68 \times 10^7$ CG 100 ml^{-1} para HAdV. Não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações de RVA e HAdV nas amostras tratadas e não tratadas com PMA nos lixiviados. Ensaios de infecciosidade de HAdV em células de adenocarcinoma de pulmão humano A549 foram realizados a fim de avaliar quantitativamente o risco microbiológico dos trabalhadores da limpeza urbana, obtendo um TCID_{50} que variou de 17 a 667 $\text{TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$. Em um cenário de trabalhadores de caminhão utilizando luvas de proteção, com base no mecanismo de ingestão inadvertida de lixiviado a probabilidade de desenvolver gastroenterite variou de 33% pelo contato mão-boca e de 58% por respingos diretos dentro cavidade oral. A não utilização de luvas aumentou esta probabilidade para 67% pelo contato mão-boca. Este é um estudo pioneiro que demonstra os vírus como importantes contaminantes desta matriz e levanta novas questões sobre o risco ocupacional desta classe de trabalhadores.

Palavras-chave: vírus; lixiviado de resíduos sólidos; rotavírus; adenovírus humano; análise de risco.

ABSTRACT

This study aimed to describe the occurrence and genetic diversity of viruses in solid waste leachate from collection trucks and landfills in order to determine the risk of developing gastrointestinal disease in urban cleaning workers in the municipality of Rio de Janeiro due to exposure to these viruses. Initially, an artificial contamination study established the association of the ultracentrifugation method with the QIAamp Fast DNA Stool mini kit[®] extraction kit as the most effective methodology for virus recovery in these matrices. Then, from March to December/2019, leachate samples were collected from a truck at the Waste Transfer Station (ETR Jacarepaguá) and from the sanitary landfill of the Waste Treatment Center (CTR Rio). In order to assess viral genetic diversity, next-generation sequencing was performed by the Illumina system in a pool of each matrix. The analysis using the VirSorter program revealed 46 viral families in the leachate, with a significant difference in the truck leachate when compared to the landfill. Subsequently, in order to assess the risk of contamination by human viruses, the occurrence and concentration of rotavirus species A (RVA) and human adenovirus (HAdV) were investigated using the TaqMan real-time PCR system (qPCR) with and without prior treatment with propidium monoazide (PMA). Both RVA and HAdV were detected by qPCR at 100% (9/9) in truck leachate, while in the landfill the detection rate was 31% (4/13) and 85% (11/13), respectively. The concentrations by qPCR and/or PMA-qPCR ranged from 4.11×10^3 to 3.39×10^7 genome copies (CG) 100 ml^{-1} for RVA and from 8.31×10^1 to 6.68×10^7 CG 100 ml^{-1} for HAdV. No significant differences were found between the concentrations of RVA and HAdV in samples treated and not treated with PMA in the leachates. HAdV infectivity assays in A549 human lung adenocarcinoma cells were performed in order to quantitatively assess the microbiological risk of urban cleaning workers, obtaining a TCID₅₀ ranging from 17 to 667 TCID₅₀ ml^{-1} . In a scenario of truck workers wearing protective gloves, based on the mechanism of inadvertent ingestion of leachate, the probability of developing gastroenteritis ranged from 33% for hand-mouth contact and 58% for direct splash into the oral cavity. Not wearing gloves increased this probability to 67% for hand-to-mouth contact. This is a pioneering study that demonstrates viruses as important contaminants of this matrix and raises new questions about the occupational risk of this class of workers.

Keywords: viruses; solid waste leachate; rotavirus; human adenovirus; risk analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estrutura de um aterro sanitário de resíduos sólidos urbanos.....	22
Figura 2 -	Efeitos na saúde e no meio ambiente provenientes de lixões a céu aberto, vazadouros e aterros controlados.....	23
Figura 3 -	Processos para tratamento de lixiviados.....	33
Figura 4 -	Vírus no ambiente.....	35
Figura 5 -	Estrutura do rotavírus.....	36
Figura 6 -	Estrutura do adenovírus.....	38
Figura 7 -	Etapas de análise do metagenoma viral.....	43
Figura 8 -	Fluxograma da metodologia desenvolvida nesta tese de doutorado.....	47
Figura 9 -	Área de planejamento 4 em amarelo atendida pela Estação de Transferência de Resíduos (ETR) Jacarepaguá (IPP, 2012).....	48
Figura 10 -	Central de Tratamento de Resíduos (CTR Rio), localizado em Seropédica.....	49
Figura 11 -	Coleta de lixiviado de aterro sanitário.....	51
Figura 12 -	Coleta de lixiviado diretamente da bacia do caminhão de coleta de resíduos sólidos.....	53
Figura 13 -	Dendrograma contendo as três sequências de 245 pb do gene hexon do adenovírus humano (HAdV) (4122, 4135 e 4293) com as 54 sequências de protótipos do ICTV.....	68
Figura 14 -	Proporção de vírus presentes em lixiviado de resíduos sólidos proveniente de caminhão e de aterro sanitário.....	70
Figura 15 -	Mapa de calor da diversidade genética viral do lixiviado de caminhão e de aterro sanitário.....	71

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 16 -	Distribuição de adenovírus humano (HAdV) e rotavírus espécie A (RVA) em cópias genômicas por 100 ml (GC 100 ml ⁻¹); coliformes totais (TC) e <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) em Número Mais Provável por 100 ml (NMP 100 ml ⁻¹) em lixiviado de caminhão e de aterro sanitário.....	74
Figura 17 -	Análise de regressão entre diferentes métodos de detecção de rotavírus espécie A (RVA).....	75
Figura 18 -	Análise de regressão entre diferentes métodos de detecção de adenovírus humano (HAdV).....	77
Figura 19 -	Dendrograma baseado na sequência parcial de 379 pb do gene VP6 de rotavírus espécie A (RVA) de seis amostras de lixiviado de caminhão.....	78
Figura 20 -	Diversidade genética de adenovírus humano (HAdV) por grupo em lixiviado de caminhão e de aterro sanitário.....	79
Figura 21 -	Probabilidade diária de doença gastrointestinal para trabalhadores de caminhão, atribuível à ingestão oral inadvertida de lixiviado de caminhão.....	82
Figura 22 -	Análise de sensibilidade da probabilidade de doença (P _{doença}) pela ingestão inadvertida de lixiviado de caminhão.....	83
Quadro 1 -	Total de resíduos domiciliares coletados em 2019, de acordo com a Área de Planejamento (AP).....	24
Quadro 2 -	Caracterização do lixiviado fresco de caminhão em <i>Kasba Tadla</i> , Marrocos.....	26
Quadro 3 -	Características físico-químicas do lixiviado de 25 aterros brasileiros.....	27
Quadro 4 -	Características físico-químicas do lixiviado de acordo com a idade de um aterro norte-americano.....	28
Quadro 5 -	Características físico-químicas de aterro brasileiros.....	28
Quadro 6 -	Média geométrica de microrganismos presentes no lixiviado de resíduos de saúde e domiciliares na cidade do Rio de Janeiro.....	30

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 7 -	Iniciadores e sondas específicos utilizados para amplificação do material genético por PCR quantitativo (qPCR).....	56
Quadro 8 -	Iniciadores e sondas específicos utilizados para amplificação do material genético por PCR convencional (cPCR).....	56
Quadro 9 -	Parâmetros de exposição usados no modelo QMRA para a via de ingestão oral.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Taxa de sucesso e eficiência de recuperação de adenovírus humano (HAdV) e bacteriófago PP7 por PCR quantitativo (qPCR), de acordo com a concentração viral e os métodos de extração de ácidos nucleicos.....	66
Tabela 2 -	Limite de detecção de adenovírus humano (HAdV) e bacteriófago PP7 por PCR quantitativo (qPCR), de acordo com a ultracentrifugação e extração de ácidos nucleicos.....	67
Tabela 3 -	Valores médios de caracterização físico-química de três amostras de lixiviado coletadas em um aterro sanitário localizado no Rio de Janeiro...	69
Tabela 4 -	Vírus de vertebrados presentes no lixiviado de caminhão e de aterro sanitário e caracterização quanto à presença de envelope viral e tipo de ácido nucleico.....	72
Tabela 5 -	Vírus humanos presentes no lixiviado de caminhão e de aterro sanitário e caracterização quanto à presença de envelope viral e tipo de ácido nucleico.....	73
Tabela 6 -	Valores mínimos e máximos do PCR quantitativo de adenovírus humano (HAdV), rotavírus espécie A (RVA), coliformes totais e Escherichia coli em lixiviado de caminhão e aterro sanitário.....	74
Tabela 7 -	Valores mínimos e máximos do RT-PCR quantitativo (sem e com PMA) de rotavírus espécie A (RVA) no lixiviado de caminhão e de aterro sanitário.....	75
Tabela 8 -	Valores mínimos e máximos do PCR quantitativo (qPCR e PMA-qPCR) de adenovírus humano (HAdV) e do ensaio de infecciosidade no lixiviado de caminhão e de aterro sanitário.....	76
Tabela 9 -	Comparação entre os valores médios da caracterização físico-química de lixiviado de caminhão e de aterro sanitário, de acordo com o respectivo código de referência do <i>Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater</i>	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	Área de Planejamento
APHA	Associação Americana de Saúde Pública
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior
cDNA	DNA complementar
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CE ₅₀	Concentração de efeito em 50% dos organismos
CL ₅₀	Concentração letal em 50% dos organismos
CH ₄	Metano
CO ₂	Gás Carbônico
COMLURB	Companhia Municipal de Limpeza Urbana do Município do Rio de Janeiro
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
cPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Convencional
CTR	Central de Tratamento de Resíduos
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EMA	Etídio Monoazida
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
ETR	Estação de Transferência de Resíduos
CG	Cópias Genômicas
HAdV	Adenovírus Humano
HAV	Vírus da Hepatite A
HEV	Vírus da Hepatite E
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
IQR	Intervalo Interquartil
JCPyV	Poliomavírus JC Humano
LVCA	Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental

MBR	Biorreator de Membrana
NAT	Nitrogênio Amoniacal
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
NTK	Nitrogênio Total Kjeldahl
NMP	Número Mais Provável
NO ²⁻	Nitrato
NO ³⁻	Nitrito
NTC	Controle Sem <i>Template</i>
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEAD	Polietileno de Alta Densidade
PMA	Propídio Monoazida
PNRS	Política Nacional de Resíduos Sólidos
qPCR	PCR quantitativo
QMRA	Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico
RSU	Resíduos Sólidos Urbanos
RT-PCR	Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase
RVA	Rotavírus espécie A
SARS-CoV-2	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2
SINIMA	Sistema Nacional de Informações sobre Meio Ambiente
SDT	Sólidos Dissolvidos Totais
SINIR	Sistema Nacional de Informações sobre a Gestão dos Resíduos Sólidos
SNIS	Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento
SST	Sólidos Suspensos Totais
ST	Sólidos Totais
STF	Sólidos Totais Fixos
STV	Sólidos Totais Voláteis
TCID ₅₀	50% da Dose Infectante de Cultura de Tecido
TOC	Carbono Orgânico Total
TTV	Torque Teno Vírus
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
WBE	Epidemiologia Baseada em Esgotos

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	GESTÃO DE RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS NO BRASIL	21
2.1.1	Panorama dos resíduos sólidos urbanos	23
2.1.2	Lixiviado de resíduos sólidos urbanos	25
2.1.3	Caracterização físico-química do lixiviado de resíduos sólidos	26
2.1.4	Microbiologia do lixiviado de resíduos sólidos	29
2.1.4.1	Vírus em lixiviados	31
2.1.5	Tratamento do lixiviado de resíduos sólidos	31
2.1.5.1	Aspectos legais	31
2.1.5.2	Aspectos técnicos	32
2.2	VIROLOGIA AMBIENTAL	34
2.2.1	Vírus entéricos	34
2.2.2	Rotavírus espécie A (RVA)	35
2.2.3	Adenovírus humanos (HAdV)	37
2.2.4	Metodologias de recuperação viral	39
2.2.5	Metodologias de detecção, quantificação e caracterização viral	40
2.2.5.1	Isolamento viral	40
2.2.5.2	Ensaio de PCR em Tempo Real	41
2.2.5.3	Sequenciamento nucleotídico	42
2.3	AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DO RISCO MICROBIOLÓGICO (QMRA)	43
3.	OBJETIVOS	46
3.1	OBJETIVO GERAL	46
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1	ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	47
4.2	AMOSTRAS, LOCAIS DE ESTUDO E PERÍODO DE COLETA	47
4.2.1	Estação de Transferência de Resíduos	48
4.2.2	Aterro sanitário	48
4.3	ESTUDO PILOTO	49
4.3.1	Controles virais	49
4.3.2	Avaliação de metodologias para recuperação viral	50
4.3.3	Ocorrência de vírus em lixiviado	51
4.4	METODOLOGIAS DE CONCENTRAÇÃO VIRAL	51
4.4.1	Floculação orgânica	51
4.4.2	Ultracentrifugação	52
4.5	MONITORAMENTO DE VÍRUS NO LIXIVIADO	52
4.5.1	Sequenciamento de nova geração (NGS)	53
4.5.2	Métodos de detecção e quantificação de HAdV e RVA	55
4.5.2.1	Ensaio de integridade do capsídeo por qPCR	55
4.5.2.2	PCR quantitativo	55
4.5.3	Caracterização molecular de HAdV e RVA	56
4.5.4	Ensaio de infecciosidade de HAdV	57
4.6	CARACTERIZAÇÃO DO LIXIVIADO DE RESÍDUOS SÓLIDOS	58
4.6.1	Parâmetros bacteriológicos	58
4.6.2	Parâmetros físico-químicos	58
4.7	AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE RISCO MICROBIOLÓGICO (QMRA)	58

4.7.1	Descrição do cenário de exposição	59
4.7.2	Avaliação da exposição	59
4.7.2.1	Ingestão pelo contato mão-boca	60
4.7.2.2	Ingestão oral pela via de respingos	61
4.7.3	Modelo de dose-resposta	64
4.7.4	Caracterização do risco	64
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	65
5.	RESULTADOS	66
5.1	ESTUDO PILOTO	66
5.1.1	Avaliação de metodologias de recuperação viral	66
5.1.2	Ocorrência de vírus em lixiviado	67
5.1.3	Parâmetros bacteriológicos e físico-químicos	69
5.2	MONITORAMENTO DE VÍRUS EM LIXIVIADO	70
5.2.1	Diversidade genética viral	70
5.2.2	Quantificação de HAdV, RVA e parâmetros bacteriológicos	73
5.2.3	Avaliação de integridade do capsídeo de RVA	75
5.2.4	Comparação entre métodos de detecção de HAdV	76
5.2.5	Diversidade genética de RVA e HAdV	78
5.3	CARACTERIZAÇÃO DO LIXIVIADO DE RESÍDUOS SÓLIDOS	80
5.3.1	Parâmetros físico-químicos	80
5.3.2	Parâmetros físico-químicos como preditores de HAdV	81
5.4	AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE RISCO MICROBIOLÓGICO (QMRA)	82
5.4.1	Análise de sensibilidade	83
5	DISCUSSÃO	84
5.1	ESTUDO PILOTO, OCORRÊNCIA DE VÍRUS E CARACTERIZAÇÃO DO LIXIVIADO	84
5.2	MONITORAMENTO DE VÍRUS EM LIXIVIADO	87
5.2.1	Metagenômica viral	88
5.2.2	Deteção, quantificação, caracterização molecular de HAdV, RVA e parâmetros bacteriológicos	89
5.2.3	Parâmetros físico-químicos	91
5.3	ANÁLISE DE RISCO	92
6	CONCLUSÃO	96
7	PERSPECTIVAS	97
	REFERÊNCIAS	98

1. INTRODUÇÃO

A produção de resíduos sólidos urbanos (RSU) está diretamente relacionada à atividade de consumo humano. Os processos de urbanização e globalização contribuem para um aumento exponencial de consumo de produtos, que automaticamente geram mais RSU, uma vez que, essa produção não tem sido acompanhada por processos que permitam a redução, reutilização e reciclagem destes resíduos (HOORNWEG; BHADA-TATA, 2012).

Atualmente, o descarte e destinação adequada de RSU é um problema, seja em países desenvolvidos ou em desenvolvimento e necessita de soluções de gestão que devem ser financeiramente sustentáveis, tecnicamente viáveis, ambientalmente adequadas e socialmente e legalmente aceitáveis (ABDEL-SHAFY; MANSOUR, 2018).

Segundo o Relógio Global de Geração de Resíduos, o mundo produz cerca de 200 toneladas de resíduos por hora, 2 bilhões por ano (D-WASTE, 2021), e pelo menos 33% acabam recebendo uma destinação final de maneira ambientalmente inadequada. Globalmente, a média de resíduos gerados por pessoa por dia é de 0,74 kg, variando de 0,11 a 4,54 kg (KAZA; YAO; BHADA-TATA; WOERDEN, 2018).

Quanto à destinação final no Brasil, 75,72% dos resíduos sólidos coletados são destinados para aterros sanitários e 24,28% são dispostos de forma inadequada, dos quais 11,58% para aterros controlados e 12,70% para lixões (SNIS, 2019).

Uma das consequências da grande geração de resíduos no Brasil e no mundo é a alta produção de lixiviados (ARABI; SBAA; VANCLOOSTER; DARMOUS, 2020). Lixiviados são matrizes ambientais líquidas, complexas, de alta variabilidade, quantidade de compostos de difícil degradação e tóxicas para diferentes organismos (COSTA; DA COSTA E SILVA; ALVES DAFLON; QUINTAES *et al.*, 2019).

Os lixiviados são gerados diretamente nas bacias dos caminhões de coleta de resíduos sólidos em decorrência da umidade inicial destes e do aporte de água de chuva (BENYOUCEF; MAKAN; EL GHMARI; OUATMANE, 2015). São gerados também em aterros sanitários, a partir da água que percola pelas camadas do aterro e da decomposição dos resíduos (JAYAWARDHANA; KUMARATHILAKA; HERATH; VITHANAGE, 2016).

Nos estudos científicos, embora os dados de caracterização físico-química e bacteriológica dessa matriz já foram descritos, tanto para o lixiviado de caminhão quanto de aterro sanitário, a pesquisa de vírus em lixiviados de resíduos sólidos está restrita apenas a estudos de padronização de metodologias desenvolvidos na década de 1970, e que não incluíram a ocorrência, concentração e infecciosidade de vírus em lixiviados (BENYOUCEF *et al.*, 2015; COMLURB, 2012; COSTA *et al.*, 2019; SOBSEY *et al.*, 1974;1975).

Depois de um período de quase 40 anos, um estudo realizado na Itália demonstrou a presença e a persistência de adenovírus humano (HAdV) em um aterro sanitário, utilizando amostras de ar e superfície (CARDUCCI; FEDERIGI; VERANI, 2013).

Quanto aos estudos no Brasil, foram investigados apenas a soroprevalência de anticorpos contra as hepatites A, B, C e E em catadores de resíduos recicláveis na cidade de Goiânia (MARINHO; LOPES; TELES; MATOS *et al.*, 2014; MARINHO; LOPES; TELES; REIS *et al.*, 2013; MARTINS; FREITAS; KOZLOWSKI; REIS *et al.*, 2014; SOARES; LOPES; FREITAS; SILVA *et al.*, 2013) e a susceptibilidade de catadores a arboviroses em Brasília (CRUVINEL; ZOLNIKOV; TAKASHI OBARA; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Assim, embora se observe uma crescente preocupação quanto à presença de microrganismos patogênicos nos lixiviados de resíduos sólidos e os efeitos na saúde ocupacional dos trabalhadores formais e informais que manuseiam estes resíduos (MOL; CALDAS, 2020), não há na literatura estudos nacionais ou internacionais que abordem a presença de vírus em lixiviados e sua possível consequência na saúde destes trabalhadores, sendo esta tese o primeiro estudo que investiga vírus em lixiviados, sendo esta considerada uma matriz negligenciada quando comparada a outras matrizes ambientais.

Para preencher essa lacuna do conhecimento, esta tese buscou descrever a ocorrência e diversidade genética de vírus em lixiviados de resíduos sólidos de caminhões de coleta e aterro sanitário a fim de determinar o risco de desenvolvimento de doenças gastrointestinais em trabalhadores de limpeza urbana no município do Rio de Janeiro pela exposição a esses vírus.

Inicialmente, avaliou-se metodologias de concentração viral associadas a protocolos de extração de ácido nucleico a fim de se estabelecer metodologia de recuperação de vírus em lixiviados. Posteriormente, realizou-se coleta de amostras de lixiviados de caminhão e de aterro sanitário, a fim de se avaliar a diversidade genética de vírus, assim como detectar, quantificar e isolar vírus entéricos de transmissão fecal-oral, o HAdV e o rotavírus espécie A (RVA).

A partir dos dados obtidos, realizou-se a Avaliação de Risco Quantitativo Microbiológico (QMRA) de exposição ocupacional de trabalhadores de limpeza urbana, a fim de se estimar a probabilidade de os trabalhadores desenvolverem gastroenterite viral, utilizando dois mecanismos de exposição a partir da ingestão inadvertida de lixiviado: contato mão-boca e via de respingos.

A QMRA dos trabalhadores de limpeza urbana foi realizada em colaboração com o *Laboratory of Hygiene and Environmental Virology*, na *Università di Pisa*, Itália, como parte dos objetivos do doutorado sanduíche (Edital PRINT-FIOCRUZ-CAPES).

Os resultados obtidos nesta tese serão apresentados para a Companhia de Limpeza Urbana do município do Rio de Janeiro, responsável pelos locais de coleta de lixo, para comunicação de risco e elaboração das medidas de prevenção e controle. Este estudo multidisciplinar, pioneiro no país e no mundo, demonstra a importância dos vírus como contaminantes ambientais e poderá auxiliar as autoridades responsáveis na tomada de decisões visando medidas de mitigação para redução de risco ocupacional dos trabalhadores de limpeza urbana.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 GESTÃO DE RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS NO BRASIL

A gestão de resíduos sólidos urbanos (RSU) no Brasil é regida por normas técnicas e legislações específicas, de forma a garantir a prestação dos serviços estabelecidos.

A Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS), descrita na Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010, estabelece no Art. 3º o conceito de resíduos sólidos como um material, substância, objeto ou bem descartado resultante da atividade humana, cuja destinação final se encontra nos estados sólido, semissólido, gasoso e/ou líquido, e que apresenta características que torna inviável seu lançamento na rede pública de esgotos ou em corpos d'água.

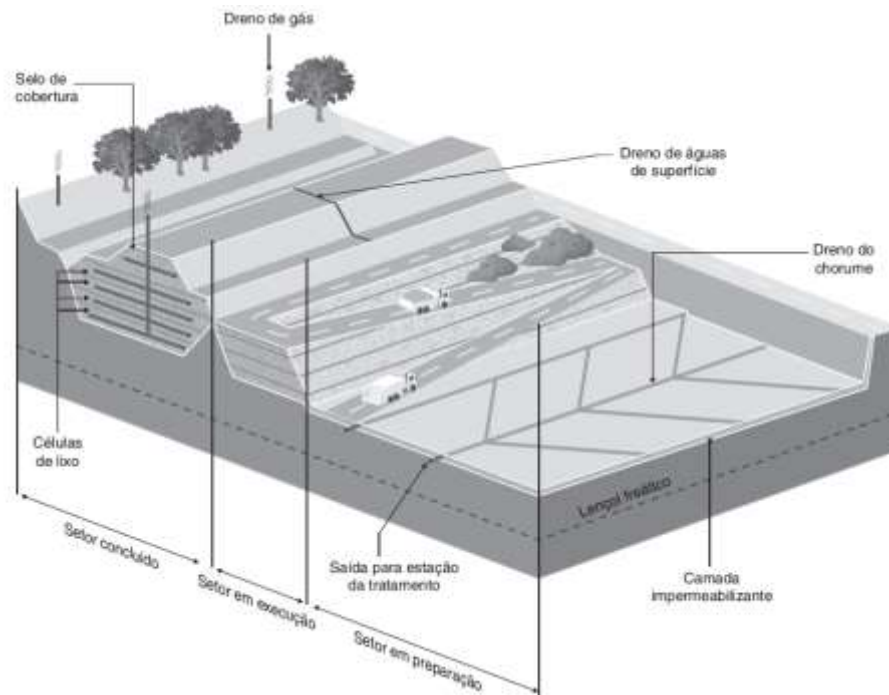
Dentre os objetivos da PNRS, definidos no seu Art. 7, destaca-se a proteção da saúde pública e da qualidade ambiental; não geração, redução, reutilização, reciclagem, tratamento dos resíduos sólidos e disposição final ambientalmente adequada dos rejeitos. De acordo com esta política, os municípios devem eliminar e recuperar os lixões e promover a distribuição dos rejeitos em aterros sanitários de acordo com as normas operacionais específicas, evitando danos ou riscos à saúde pública e à segurança e a minimizando impactos ambientais adversos (BRASIL, 2010).

Em seu Art. 13, a PNRS classifica os RSU como formados por resíduos domiciliares e por resíduos de limpeza urbana obtidos por varrição, limpeza de logradouros e vias públicas (BRASIL, 2010). O gerenciamento de RSU é de responsabilidade dos municípios e inclui as etapas de coleta, transporte, transbordo, tratamento e disposição final ambientalmente adequada (BRASIL, 2010).

Segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), aterro sanitário é definido como a técnica de disposição de resíduos sólidos no solo, sem causar danos à saúde pública e à sua segurança, minimizando os impactos ambientais, utilizando os princípios de engenharia (ABNT, 1992).

A estrutura de um aterro sanitário (Figura 1) é composta minimamente por: sistemas de tratamento dos resíduos a serem dispostos; sistema de tratamento de base (impermeabilização da fundação); sistema de operação; sistema de drenagem da fundação (sob a base do aterro); sistema de cobertura; sistema de drenagem das águas pluviais; sistema de drenagem do lixiviado (chorume); sistema de drenagem dos gases; análise de estabilidade dos maciços de terra e dos resíduos dispostos; sistema de coleta e tratamento do lixiviado; sistema de tratamento dos gases; registro das operações (ABNT, 1992).

Figura 1: Estrutura de um aterro sanitário de resíduos sólidos urbanos.



RITTER *et al.* em SANTOS & OHNUMA JR. (2021).

Os locais com disposição inadequada de resíduos, como lixões a céu aberto, vazadouros e aterros controlados são estruturas que não possuem uma normalização no controle operacional do biogás e do lixiviado produzido, e por não apresentarem uma impermeabilização na base e na cobertura de suas estruturas, continuam impactando diretamente no meio ambiente e promovendo a contaminação dos corpos hídricos. Além disso, estes locais promovem a propagação de vetores de doenças, como roedores, aves e insetos (AKPEIMEH; FLETCHER; EVANS; IBANGA, 2020; TONINI; MANFREDI; BAKAS; BROGAARD *et al.*, 2019).

A disposição inadequada de resíduos sólidos tem efeitos diretos e indiretos na saúde e no meio ambiente, muitos ainda nem mensurados e, portanto, negligenciados pelas políticas públicas no Brasil e no mundo. Alguns exemplos destes efeitos são a poluição do ar por metano, o risco de desastres, as queimas não controladas de resíduos sólidos, a contaminação do solo e lençóis freáticos, e os impactos na flora e fauna ao redor (Figura 2) (MAVROPOULOS, 2015):

Figura 2: Efeitos dos lixões a céu aberto, vazadouros e aterros controlados na saúde e no meio ambiente.



Adaptado de MAVROPOULOS (2015).

No Brasil, o Marco Legal do Saneamento, definido pela Lei Nº 14.026, de 15 de julho de 2020, estabelece prazos para adequação e a implementação da cobrança de taxas de coleta de resíduos pelos municípios brasileiros, bem como para a disposição final ambientalmente adequada, variáveis de acordo com o tamanho do município, entre agosto de 2021 e agosto de 2024 (BRASIL, 2020).

2.1.1 Panorama dos resíduos sólidos urbanos

As informações sobre a gestão de resíduos sólidos dos municípios estão disponíveis no Sistema Nacional de Informações sobre a Gestão dos Resíduos Sólidos (SINIR), que é um dos instrumentos da PNRS. O SINIR reúne informações do Sistema Nacional de Informações sobre Meio Ambiente (SINIMA) e o Sistema Nacional de Informações Sobre Saneamento (SNIS), coordenado pelo Ministério do Desenvolvimento Regional (SINIR, 2019; SNIS, 2019).

Segundo a pesquisa de 2019 do Diagnóstico do Manejo de Resíduos Sólidos Urbanos - SNIS, contemplando 3.712 municípios (66,6%), o Brasil produz 178 mil toneladas diárias de RSU, e cada habitante contribui com a geração de cerca de 1 kg/dia (SNIS, 2019).

A região Sudeste é caracterizada por apresentar a maior produção de RSU do Brasil (46,9%). Quanto à destinação final na região, 87,90% dos resíduos sólidos coletados são destinados para aterros sanitários e 12,20% são dispostos de forma inadequada, dos quais 9,94% para aterros controlados e 2,26% para lixões (SNIS, 2019).

O município do Rio de Janeiro apresenta um padrão de coleta de resíduos sólidos domiciliares organizado por Área de Planejamento (AP). Dados referentes à 2019 mostram a elevada quantidade de resíduos coletados em todas as AP, em especial nas AP 3, 4 e 5, indicando um padrão de consumo e atividade humana aumentados (Quadro 1) (COMLURB, 2020b).

Quadro 1: Total de resíduos domiciliares coletados em 2019, de acordo com a Área de Planejamento (AP) (COMLURB, 2020b).

Área de Planejamento (AP) - 2019	Toneladas (t)
AP 1 (Centro)	93.878
AP 2 (Zona Sul e Tijuca)	238.492
AP 3 (outros bairros da Zona Norte)	599.547
AP 4 (Jacarepaguá e Barra da Tijuca)	308.521
AP 5 (outros bairros da Zona Oeste)	487.634

O total de resíduos domiciliares coletados em 2019 foi de 2.216.294 toneladas, e de resíduos públicos provenientes de varrição ou limpeza de logradouros públicos, 1.007.143 toneladas (COMLURB, 2021a).

A série histórica da composição gravimétrica do município do Rio de Janeiro demonstra que, em 2019, os resíduos orgânicos representaram 47,33% do peso dos resíduos domiciliares, seguidos por frações menores de plástico (15,72%), papel e papelão (14,63%), vidro (3,58%), metais (1,75%), materiais inertes (2,20%) e outros (14,78%) (COMLURB, 2020a).

Os RSU são coletados manualmente porta-a-porta pelos trabalhadores da companhia de limpeza urbana e compactados ou não nos caminhões de coleta para serem direcionados para as Estações de Transferência de Resíduos (ETR) mais próximas, de acordo com a AP. Para os trabalhadores de coleta, a manipulação destes resíduos, bem como o processo de compactação no caminhão, realizada várias vezes durante a sua jornada de trabalho, pode ser considerada uma atividade crítica quanto ao risco de exposição (MOL; CAIRNCROSS; GRECO; HELLER, 2019).

As ETRs em operação em 2019 compreenderam as estações de Caju, Marechal Hermes, Bangu, Jacarepaguá e Santa Cruz. Ao chegar nas ETRs, os RSU são transferidos para carretas e encaminhados para a Central de Tratamento de Resíduos (CTR Rio) em Seropédica, onde está localizado o aterro sanitário (COMLURB, 2021b).

A CTR Rio recebe diariamente aproximadamente 15 mil toneladas de resíduos sólidos urbanos, dos quais cerca de 10 mil são originados da cidade do Rio de Janeiro e 5 mil dos municípios de Seropédica, Itaguaí, Mangaratiba, Piraí, Miguel Pereira e São João de Meriti (COMLURB, 2020 – Comunicação Pessoal).

2.1.2 Lixiviado de resíduos sólidos urbanos

Lixiviação é o fenômeno de solubilização de substâncias, com a passagem da fase sólida para a fase líquida e percolação de água. O processo de lixiviação acontece em diferentes solos, locais e processos industriais e o efluente gerado é denominado lixiviado (ABNT, 2004).

O lixiviado de resíduos sólidos é um subproduto derivado da decomposição dos RSU. Ele pode ser formado nos caminhões de coleta, nas estações de transferência e em aterros sanitários e possui alta resistência e toxicidade (COSTA; DA COSTA E SILVA; ALVES DAFLON; QUINTAES *et al.*, 2019). É uma preocupação mundial e ainda hoje apresenta um grande desafio na redução da sua geração e na remoção de seus poluentes por tratamentos adequados (YOUCAI, 2019).

Nesta tese de doutorado, foi proposta a utilização de dois termos para descrever a matriz de lixiviados de resíduos sólidos de estudo: lixiviado fresco de caminhão e lixiviado de aterro sanitário.

O lixiviado fresco de caminhão, também conhecido como chorume, é um líquido gerado diretamente na bacia do caminhão de coleta de resíduos durante o dia de coleta e formado a partir da decomposição inicial dos resíduos, da água de chuva e do processo de compactação no caminhão durante a coleta. Por ser um lixiviado obtido diretamente dos resíduos sólidos, possui alta carga orgânica e elevadas concentrações de compostos físico-químicos (BENYOUCEF; MAKAN; EL GHMARI; OUATMANE, 2015).

A Lei estadual nº 8.598 de 31 de outubro de 2019 estabelece que os proprietários de caminhão de resíduos devem ser notificados em caso de vazamento de lixiviado do caminhão e correção da falha em 7 dias, e em caso de reincidência, aplicação de multa. Esta é uma medida para evitar a contaminação do solo e diminuir o risco de exposição no ambiente durante todo o trajeto de transporte dos resíduos (JANEIRO, 2019).

O lixiviado de aterro sanitário é formado pela decomposição de resíduos orgânicos, da umidade dos resíduos sólidos e da percolação de líquidos como água de chuva e escoamento superficial na estrutura do aterro. Durante o processo de formação do lixiviado, ocorre a solubilização de substâncias orgânicas e inorgânicas, formando um novo líquido de composição variável e de difícil tratamento (MANNARINO; FERREIRA; MOREIRA, 2011; TCHOBANOGLIOUS; KREITH, 2002).

Nos aterros sanitários, o lixiviado é drenado e direcionado para uma estação de tratamento. Locais como lixões a céu aberto, vazadouros e aterros controlados não possuem uma normalização de tratamento do lixiviado, podendo contaminar os corpos hídricos, impactando na saúde pública e meio ambiente (NOGUEIRA, 2015).

2.1.3 Caracterização físico-química do lixiviado de resíduos sólidos

As informações sobre as propriedades físico-químicas do lixiviado fresco de caminhão são escassas na literatura. Um estudo realizado na cidade de *Kasba Tadla*, em Marrocos, realizou a caracterização físico-química do lixiviado de resíduos domiciliares coletado diretamente de caminhões compactadores (Quadro 2). Observou-se um pH ácido, com elevada condutividade, demanda química de oxigênio (DQO), turbidez e sólidos suspensos totais, amônia e cloreto, com 50% compostos orgânicos, indicando ser uma matriz complexa e de alta toxicidade (BENYOUCEF; MAKAN; EL GHMARI; OUATMANE, 2015).

Quadro 2: Caracterização do lixiviado fresco de caminhão em *Kasba Tadla*, Marrocos (BENYOUCEF *et al.*, 2015).

Parâmetros físico-químicos	Média
pH	4,88
Condutividade ($\mu\text{s cm}^{-1}$)	26.930
Demanda Química de Oxigênio (DQO) (mg L^{-1})	23.500
Óleos e Graxas (g L^{-1})	370
Turbidez (NTU)	2.890
Sólidos Suspensos Totais (SST) (mg L^{-1})	5.552
Amônia (mg L^{-1})	1.990
Cloreto (mg L^{-1})	2.570
Compostos Orgânicos (mg L^{-1})	55%
Metais (mg L^{-1})	75

Quanto à composição do lixiviado de aterros sanitários e suas principais características físico-químicas, a caracterização indica uma elevada variabilidade na composição desta matriz. Comparações de caracterização físico-químicas são complexas porque envolvem variáveis diversas como fase e idade do aterro, a forma de operação e a composição dos resíduos que são destinados (TCHOBANOGLIOUS; KREITH, 2002).

Quanto às fases que um aterro pode apresentar, são descritas duas, a acidogênica e a metanogênica (e seus intermediários). Souto e Povinelli descrevem uma revisão destas fases de acordo com as características físico-químicas do lixiviado de resíduos sólidos de 25 aterros brasileiros, demonstrando a alta variabilidade de concentração de compostos físico-químicos entre as duas fases (Quadro 3) (SOUTO; POVINELLI, 2013).

Na fase acidogênica, é observada uma intensa atividade microbiológica, com produção elevada de ácidos orgânicos e CO₂. Nesta etapa, ocorre a degradação de compostos de massa molecular elevada, como proteínas e polímeros, formando compostos intermediários e de baixo peso molecular. O pH possui características ácidas e valores de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), DQO, e condutividade aumentados devido à dissolução de ácidos orgânicos (TCHOBANOGLIOUS; KREITH, 2002).

Na fase metanogênica, as arqueias metanogênicas convertem os produtos da primeira fase em metano (CH₄) e gás carbônico (CO₂), e o pH do lixiviado aumenta para valores próximos da neutralidade, na faixa de 6 a 8. Os valores de DBO e de condutividade são reduzidos nesta fase e observa-se a presença de compostos húmicos e fúlvicos (TCHOBANOGLIOUS; KREITH, 2002).

Quadro 3: Características físico-químicas do lixiviado de 25 aterros brasileiros Adaptado de SOUTO & POVINELLI (2013).

Parâmetros físico-químicos	Fase Ácida		Fase Metanogênica	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
pH	4,4	8,4	5,9	9,2
Alcalinidade total (mg CaCO₃ L⁻¹)	170	32.000	125	20.200
Turbidez (NTU)	100	540	0,02	620
Condutividade (µs cm⁻¹)	230	45.000	100	45.000
Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) (mg O₂ L⁻¹)	1	55.000	3	17.200
Demanda Química de Oxigênio (DQO) (mg O₂ L⁻¹)	90	100.000	20	35.000
Nitrogênio total Kjeldahl (NTK) (mg N L⁻¹)	1,7	3.000	0,6	5.000
Nitrogênio amoniacal (NAT) (mg N L⁻¹)	0,07	2.000	0,03	3.000
N-NO₂⁻ (mg N L⁻¹)	-	-	nd	70
N-NO₃⁻ (mg N L⁻¹)	nd	45	nd	270
Fósforo total (mg P L⁻¹)	nd	260	nd	80
Cloreto (mg Cl L⁻¹)	275	4.700	20	6.900
Sólidos Totais (ST) (mg L⁻¹)	400	45.000	200	29.000
Sólidos Totais Voláteis (STV) (mg L⁻¹)	78	26.700	75	20.000
Sólidos Totais Fixos (STF) (mg L⁻¹)	40	28.400	100	17.000
Sólidos Suspensos Totais (SST) (mg L⁻¹)	10	7.000	7	12.400

*nd = abaixo do limite de detecção.

Outra forma de classificar as características do lixiviado é de acordo com a idade do aterro, um fator determinante na composição físico-química do lixiviado. Durante a fase inicial do aterro (fase ácida), são denominados aterros jovens, e com anos de operação (fase metanogênica), são descritos aterros maduros (Quadro 4):

Quadro 4: Características físico-químicas do lixiviado de acordo com a idade de um aterro norte-americano. Adaptado de COSTA *et al.* (2019).

Parâmetros físico-químicos	Idade do aterro (anos)			
	0-5 (Jovem)	5-10 (Intermediário/ Maduro)	10-20 (Maduro)	>20 (Maduro)
pH	3-6	6-7	7-7,5	7,5
Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) (mg O ₂ L ⁻¹)	10.000–25.000	1000–4000	50–1000	<50
Demanda Química de Oxigênio (DQO) (mg O ₂ L ⁻¹)	15.000–40.000	10.000–20.000	1000–5000	<1000
Nitrogênio total Kjeldahl (NTK) (mg N L ⁻¹)	1500–4500	400–800	75–300	<50
Amônia (NH ₄ ⁺) (mg N L ⁻¹)	1500–4250	250–700	50–200	<30
Cloreto (mg Cl ⁻ L ⁻¹)	1000–3000	500–2000	100–500	<100
Fósforo total (mg P L ⁻¹)	100–300	10–100	nd	<10
Alcalinidade total (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	8000–18.000	4500–6000	nd	nd
Condutividade (μs cm ⁻¹)	15.000–41.500	6.000–14.000	nd	nd
Sólidos Dissolvidos Totais (SDT)	10.000–25.000	5000–10.000	2000–5000	<1000

*nd = abaixo do limite de detecção.

Por sua dimensão continental, o Brasil apresenta municípios de diferentes tamanhos, com padrões de consumo das populações variáveis, além de condições climáticas próprias em suas regiões. Isso resulta em aterros sanitários de diferentes portes e tempo de operação, influenciando diretamente nas características físico-químicas dos lixiviados (Quadro 5) (COSTA; ALFAIA; CAMPOS, 2019):

Quadro 5: Características físico-químicas dos lixiviados de aterros sanitários brasileiros. Adaptado de COSTA *et al.* (2019).

Parâmetros físico-químicos	Aterros sanitários brasileiros							
	Bandeirantes (São Paulo)	Piraí (Rio de Janeiro)	Rolândia (Paraná)	Florianópolis (Santa Catarina)	Minas Gerais (Belo Horizonte)	Seropédica (Rio de Janeiro)	Vitória (Espírito Santo)	Muribeca (Pernambuco)
Idade do aterro (ano)	30	4	11	9	9	5	10	27
pH	8,1	7,3	9,1	8,1	8,3	7,8	8,3	7,9
DBO (mg L ⁻¹)	2.060	74	55	1.683	68	863	1.746	136
DQO (mg L ⁻¹)	7.373	768	1.819	3.581	2.354	1.931	6.214	6.077
DBO/DQO	0,28	0,09	0,030	0,47	0,029	0,45	0,28	0,022
NH ₄ ⁺ -N (mg N L ⁻¹)	2.183	323	859	1.419	1.055	2.185	1.639	153,6
Cl ⁻ (mg.L-1)	-	1.362	-	-	2.190	1.597	-	20.095

Como observado nos quadros 3, 4 e 5, o lixiviado de aterro sanitário, de forma geral apresenta altos valores de DQO, nitrogênio amoniacal e cloreto. Outra característica é a sua alta toxicidade. Enquanto o lixiviado de caminhão possui uma escassez de estudos de caracterização físico-química e ausência de estudos de toxicidade, o lixiviado de aterro sanitário é reconhecidamente altamente tóxico, com impactos na saúde e no meio ambiente (COSTA; ALFAIA; CAMPOS, 2019).

Para estimar o potencial tóxico dos lixiviados, são realizados ensaios ecotoxicológicos com organismos padronizados, como bactérias, algas, zooplanctons, mexilhões e peixes. Os organismos teste são expostos à substância ou efluente com potencial tóxico e a toxicidade é estimada pela concentração de efeito (CE_{50}) ou concentração letal em 50% dos organismos (CL_{50}). Também podem ser investigados biomarcadores de efeito ou exposição sub letal, por exemplo, em cultura de células (ABE, 2017).

Para entender a toxicidade do lixiviado, estudos com diferentes organismos são amplamente descritos (EMENIKE; FAUZIAH; AGAMUTHU; GHOSH; THAKUR; KAUSHIK, 2017; MANNARINO; MOREIRA; FERREIRA; ARIAS, 2013). Efeitos citotóxicos e genotóxicos dos lixiviados em células HepG2 foram observados com valores de EC_{50} variando de 11,58% a 20,44% (GHOSH; GUPTA; THAKUR, 2015).

Para avaliar o solo de um aterro sanitário, a pesquisa com minhocas, utilizada como indicadores do solo, são úteis para investigar a contaminação por lixiviado e biomarcadores de toxicidade são utilizados para avaliação de risco aos organismos (JUNIOR; AMARAL; MANNARINO; HAUSER-DAVIS *et al.*, 2021; SALES JUNIOR; MANNARINO; BILA; TAVEIRA PARENTE *et al.*, 2021).

Embora a caracterização físico-química dos lixiviado seja amplamente estudada, os artigos científicos demonstram uma defasagem de dados sobre a caracterização microbiológica e ausência de dados virológicos nesta matriz.

2.1.4 Microbiologia do lixiviado de resíduos sólidos

Diferentes tipos de resíduos sólidos como papel higiênico, fraldas descartáveis e excretas de pessoas infectadas, além da destinação final de lodos de esgoto e de fossas sépticas, são capazes de carrear microrganismos para o lixiviado de resíduos sólidos (GERBA; TAMIMI; PETTIGREW; WEISBROD *et al.*, 2011).

As informações sobre a caracterização microbiológica de lixiviados frescos são restritas na literatura mundial. Porém, na cidade do Rio de Janeiro, a caracterização bacteriológica do lixiviado fresco de resíduos domiciliares de 2012 foi realizada pela

COMLURB em 57 amostras representativas dos bairros da cidade. A média aritmética obtida foi de $1,25 \times 10^9 \pm 3,35$ Número Mais Provável (NMP) 100 ml⁻¹ de coliformes totais, $2,68 \times 10^8 \pm 3,28$ NMP 100 ml⁻¹ de *E. coli*, $1,12 \times 10^9 \pm 3,12$ NMP 100 ml⁻¹ de *Enterococcus sp* e $8,66 \times 10^4 \pm 19,59$ NMP 100 ml⁻¹ de *Pseudomonas aeruginosa* (COMLURB, 2012).

A comparação da caracterização microbiológica de coliformes totais, termotolerantes, *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Enterococcus sp.* de lixiviados de caminhão obtidos de resíduos sólidos domiciliares com os de serviços de saúde na cidade do Rio de Janeiro (Quadro 6) não verificou diferença significativa na concentração de microrganismos detectados. Embora tenha sido detectado uma maior concentração de *Pseudomonas aeruginosa* no lixiviado de resíduos de saúde quando comparado com os domiciliares, essa diferença não foi significativa (SILVA; CAMPOS; FERREIRA; MIGUEL *et al.*, 2011).

Quadro 6: Média geométrica de microrganismos presentes no lixiviado de resíduos de saúde e domiciliares na cidade do Rio de Janeiro (SILVA *et al.*, 2011).

Parâmetros bacteriológicos	Média geométrica (Número mais Provável por 100 ml)	
	Resíduos de saúde	Resíduos domiciliares
	(N=25)	(N=25)
Coliformes totais	$4,9 \times 10^8$	$1,9 \times 10^9$
Coliformes termotolerantes	$3,9 \times 10^8$	$1,7 \times 10^9$
<i>Escherichia coli</i>	$1,5 \times 10^8$	$4,3 \times 10^8$
<i>Enterococcus sp.</i>	$1,9 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$3,0 \times 10^7$	$3,4 \times 10^5$

Quanto à diversidade microbiológica de lixiviados, o sequenciamento da porção 16S do DNA ribossomal (DNAr) identificou os filos *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Actinobactéria* como os mais dominantes em um aterro na China. Algumas das espécies caracterizadas foram *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Rhizobium*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, etc, além de bactérias não cultiváveis (LIU; XI; QIU; HE *et al.*, 2019). Padrões microbiológicos obtidos em um aterro no Japão por 16S do DNAr baseado no RFLP identificou *Fervidobacterium*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, dentre outros (SAWAMURA; YAMADA; ENDO; SODA *et al.*, 2010).

Quanto ao Brasil, a concentração de coliformes totais variou de $3,3 \times 10^1$ a $1,1 \times 10^3$ NMP 100 ml⁻¹ e de $7,9 \times 10^1$ a $3,5 \times 10^2$ NMP 100 ml⁻¹ nos lixiviados bruto e tratado, respectivamente, em uma análise do lixiviado obtido do aterro controlado de Jardim Gramacho, Duque de Caxias, RJ. Para *Enterococcus sp.*, observou-se uma diferença de concentração entre o lixiviado bruto (10^5 NMP 100 ml⁻¹) e tratado (10^2 NMP 100 ml⁻¹) (EDUARDO, 2007).

2.1.4.1 Vírus em lixiviados

Quanto à presença de vírus entéricos em lixiviados, uma tentativa de padronização de uma metodologia para a detecção viral nesta matriz ambiental foi primeiramente descrita na década de 1970, período anterior ao desenvolvimento de técnicas de biologia molecular. Porém, vírus não tinham sido detectados em lixiviados neste momento (COOPER; POTTER; LEONG, 1975; SOBSEY, 1978; SOBSEY; WALLIS; MELNICK, 1974; 1975).

Em 2013, foi realizado o primeiro estudo da detecção de vírus em aterro sanitário, embora não tenha sido investigado em lixiviados. HAdV foram detectados em concentrações variando de $1,05 \times 10^6$ a $9,8 \times 10^7$ GC m^3^{-1} em amostras de ar e de 8 a 209 GC 100 cm^2^{-1} na superfície do aterro em Pisa, Itália (CARDUCCI; FEDERIGI; VERANI, 2013).

2.1.5 Tratamento do lixiviado de resíduos sólidos

2.1.5.1 Aspectos legais

A legislação estadual do Rio de Janeiro (Nº 9.055, de 8 de out. de 2020) instituiu a obrigatoriedade do controle e tratamento do lixiviado nos sistemas de destinação final de resíduos sólidos, vazadouros, aterros controlados e aterros sanitários, bem como a remediação de vazadouros (JANEIRO, 2020).

De acordo com esta lei, somente é permitida a utilização de tecnologias e equipamentos eficientes no tratamento de lixiviado que deverão atender rigorosamente aos padrões de qualidade estabelecidos pela legislação pertinente. Os padrões de lançamento de lixiviado tratado aceitos pelo Estado são definidos pela Resolução Federal CONAMA 430, ou outra que vier a substituir (JANEIRO, 2020).

Esta lei estadual também proíbe o tratamento do lixiviado bruto em Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) convencional, salvo a hipótese de existência de pré ou pós-tratamento que garanta valores de lançamento do efluente tratado dentro dos limites e padrões da resolução em vigor. Também proíbe a diluição de lixiviado em ETEs (JANEIRO, 2020).

Quanto ao padrão de lançamento de compostos inorgânicos de efluentes em corpos receptores permitidos pela Resolução CONAMA 430, o nitrogênio amoniacal total deve apresentar valores máximos de 20,0 mg/L. Por ser um composto rotineiramente presente em altas concentrações nos lixiviados, o nitrogênio amoniacal pode ser considerado um parâmetro preditor de toxicidade, assim como DQO e alcalinidade (CONAMA, 2011; COSTA; DA COSTA E SILVA; ALVES DAFLON; QUINTAES *et al.*, 2019).

Além disso, o lançamento em excesso de nutrientes, em formas nitrogenadas e fosfatadas em corpos receptores, pode ocasionar um fenômeno denominado eutrofização, característico pela proliferação da biomassa vegetal, com alterações na cor, odor, turbidez e redução da concentração de oxigênio dissolvido no ecossistema aquático. Como consequência, ocorre o crescimento descontrolado de plantas aquáticas, como cianobactérias e microalgas, e a mortalidade de espécies aquáticas como peixes e invertebrados (BARRETO; BARROS; BONOMO; ROCHA *et al.*, 2013).

Com relação aos critérios e padrões para lançamento de efluentes líquidos a nível estadual no Rio de Janeiro, embora seja uma normativa antiga, a NT-202.R-10 é semelhante à CONAMA 430, sendo inclusive mais restritiva aos seguintes parâmetros de compostos inorgânicos no lixiviado de aterro sanitário: nitrogênio total (10,0 mg/L N) e fósforo total (1,0 mg/L P) (INEA, 1986).

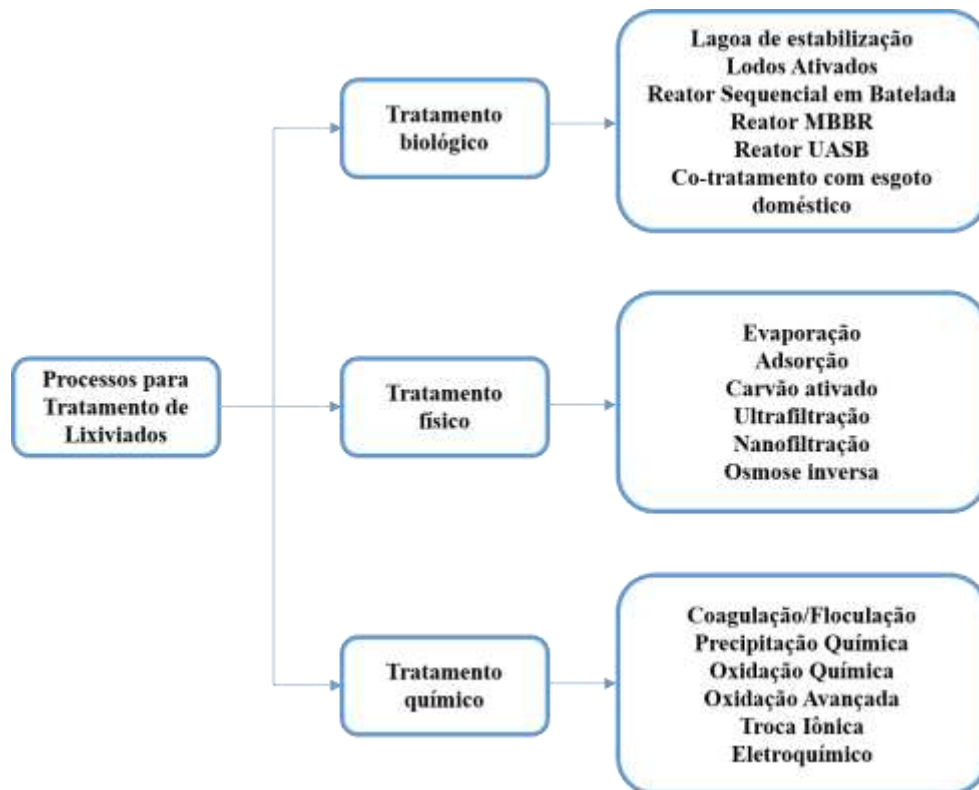
A Resolução Estadual Conema do Rio de Janeiro (Nº 90 de 8 de fev. de 2021) estabelece critérios e padrões de lançamento para esgotos sanitários. Esta norma não se aplica às estações de tratamento de lixiviado localizadas em aterros sanitários e/ou indústrias, efluentes industriais e/ou não sanitários. Porém, estabelece os padrões de tratamento para ETEs que recebem lixiviado de aterro sanitário (INEA, 2021).

O não enquadramento do lixiviado de resíduos sólidos dentro dos parâmetros mínimos de lançamento de efluentes das legislações federal e estadual confirma a obrigatoriedade de tratamento desse efluente descrita em lei, de forma a diminuir ou minimizar os riscos de contaminação ambiental.

2.1.5.2 Aspectos técnicos

Diversos protocolos de tratamento de lixiviado são disponíveis e a adoção da tecnologia depende da capacidade de investimento e operação do aterro sanitário, área disponível para a planta do sistema, quantidade e fluxo de lixiviado gerado e sua composição físico-química. Os tratamentos do lixiviado podem ser classificados em biológicos, físicos e químicos (Figura 3).

Figura 3: Processos para tratamento de lixiviados.



Adaptado de ELMAADAWY *et al.* (2020).

Os tratamentos biológicos são utilizados para biodegradar compostos orgânicos pela decomposição de microrganismos. Exemplos de tratamentos biológicos são as lagoas de estabilização, lodos ativados, reator sequencial em batelada, reator MBBR (do inglês *moving bed biofilm reactor*) e reator UASB (do inglês *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*). O co-tratamento do lixiviado com o esgoto doméstico é adequado quando estabelecida a proporção ideal para não sobrecarregar a ETE, embora a legislação atual de 2020 do Estado do Rio de Janeiro proíba o co-tratamento (COSTA; ALFAIA; CAMPOS, 2019; ELMAADAWY; LIU; HU; HOU *et al.*, 2020; JANEIRO, 2020; LIPPI; LEY; MENDEZ; JUNIOR, 2018).

Exemplos de tratamentos físicos de lixiviados descritos são a evaporação, adsorção, carvão ativado, ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa (COSTA; ALFAIA; CAMPOS, 2019; ELMAADAWY; LIU; HU; HOU *et al.*, 2020; LIPPI; LEY; MENDEZ; JUNIOR, 2018). Os principais tratamentos químicos utilizados são a coagulação, floculação, precipitação, oxidação química, oxidação avançada, troca-iônica e tratamento eletroquímico (COSTA; ALFAIA; CAMPOS, 2019).

2.2 VIROLOGIA AMBIENTAL

A virologia ambiental é um segmento da virologia que vem ganhando protagonismo na área ambiental, principalmente no campo do saneamento, uma vez que a ocorrência de vírus em ecossistemas aquáticos tem sido relacionada à falta de serviços de esgotamento sanitário adequado (PRADO; MIAGOSTOVICH, 2014).

Os primeiros estudos com vírus entéricos iniciaram-se em 1980. Porém, somente com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular a partir de 2000, vírus de transmissão fecal-oral não cultiváveis puderam ser detectados por amplificação em cadeia da polimerase (PCR ou RT-PCR). Por ser uma metodologia rápida e eficiente, com elevada sensibilidade, permitiu detectar e quantificar o material genético a partir de uma curva padrão, utilizando iniciadores de amplificação e sondas fluorescentes específicos para o segmento de interesse (TAN; JIANG, 2007).

Aplicando estas ferramentas moleculares, a virologia ambiental estabeleceu metodologias de concentração e detecção viral em matrizes ambientais como águas superficiais, recreacionais, de chuva, esgoto, lodo de esgoto e água de consumo (LABADIE; BATÉJAT; LECLERCQ; MANUGUERRA, 2020; WONG; XAGORARAKI; ROSE, 2007).

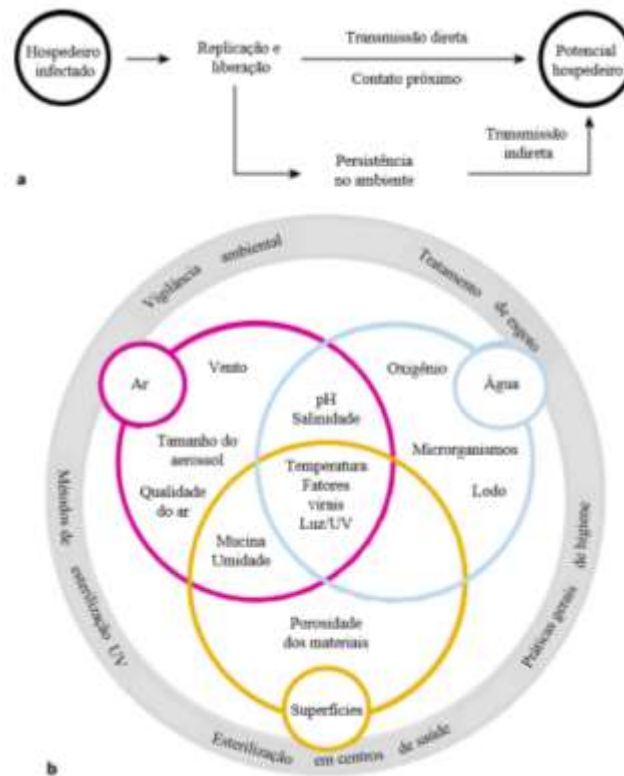
2.2.1 Vírus entéricos

Os vírus entéricos estão frequentemente associados à veiculação hídrica e membros de diferentes famílias, que têm em comum a via de transmissão fecal-oral. São excretados nas fezes dos indivíduos infectados por um período que varia entre alguns dias a vários meses (BLACKLOW; GREENBERG, 1991).

Estes vírus são eliminados em grandes concentrações nas fezes, de 10^5 a 10^{11} partículas virais por grama de fezes. Possuem baixa dose infecciosa, ou seja, poucas partículas virais são capazes de causar infecção. A resistência dos vírus entéricos a condições ambientais adversas, como radiação UV, temperatura, concentração de cloro e variações de pH os torna importantes contaminantes ambientais (BOSCH, 2007).

Múltiplos fatores ambientais contribuem para a persistência de vírus no ambiente, e o estudo dessas variáveis contribuem para o desenvolvimento de medidas de controle e adoção de políticas públicas. Exemplos são as características físico-químicas do ambiente como pH, temperatura e umidade, além da presença de microrganismos e as características virais como o tipo de material genético e a presença ou não de envelope lipídico (Figura 4) (LABADIE; BATÉJAT; LECLERCQ; MANUGUERRA, 2020).

Figura 4: Vírus no ambiente.



a) Formas de transmissão viral. b) Alguns dos fatores que determinam a persistência e infecciosidade viral no meio ambiente. Adaptado de LABADIE *et al.* (2020).

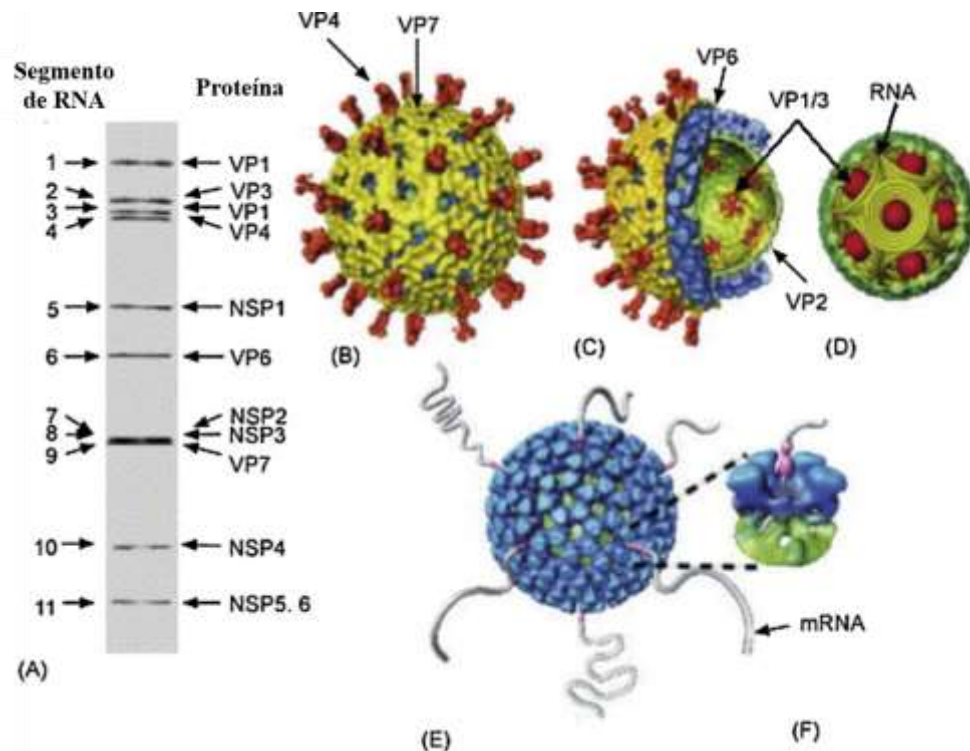
Neste grupo, estão incluídos mais de 100 vírus pertencentes às famílias *Reoviridae*, *Caliciviridae*, *Astroviridae*, *Adenoviridae*, *Picornaviridae*, dentre outras. As principais espécies virais capazes de infectar e causar doença em humanos são rotavírus, norovírus, astrovírus, adenovírus, enterovírus, vírus da hepatite A (HAV) e vírus da hepatite E (HEV) (WILHELMI; ROMAN; SÁNCHEZ-FAUQUIER, 2003), sendo RVA e o HAdV objetos de estudo nesta tese.

2.2.2 Rotavírus espécie A (RVA)

Os rotavírus (RV) foram descritos pela primeira vez por microscopia eletrônica em 1973, recebendo esse nome pela semelhança com uma roda de carroça (BISHOP; DAVIDSON; HOLMES; RUCK, 1973; FLEWETT; BRYDEN; DAVIES, 1973). Pertencem à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus* (ICTV, 2020), têm 75 nm de diâmetro, simetria icosaédrica e não apresentam envelope viral. O material genético é formado por 11 segmentos de RNA de fita dupla, codificando as proteínas virais (VP) estruturais, VP1-VP7 e não estruturais (NSP1-6) (Figura 5) (DESSELBERGER, 2014).

Os RVs apresentam um triplo capsídeo, sendo o capsídeo externo composto pelas proteínas VP4/VP7, o capsídeo intermediário pela proteína VP6 e o capsídeo interno pelas proteínas VP1/VP3. Proteases do trato gastrointestinal clivam a VP4, formando a VP5 e VP8, que então permitem a adsorção e penetração viral na célula (DESSELBERGER, 2014).

Figura 5: Estrutura do rotavírus



a) Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) demonstrando os 11 segmentos de RNA fíta dupla do genoma do rotavírus espécie A (RVA). No lado esquerdo, estão os segmentos gênicos, e no direito, as proteínas codificadas. **b)** Imagem reconstruída de crio-microscopia eletrônica (crio-EM), formada pela partícula viral de triplo capsídeo. **c)** Visualização das camadas internas de VP6 (azul), VP2 (verde) e as enzimas de transcrição (vermelho). **d)** Representação do genoma do rotavírus, formando espirais cônicas envolvendo as enzimas de restrição dentro da camada de VP2. **e, f)** Modelo reconstruído por crio-EM demonstrando a dupla camada durante a transcrição, resultando na liberação do RNA mensageiro (mRNA) (DESSELBERGER, 2014).

Os RVs são divididos em nove espécies (RVA-I), de acordo com as propriedades antigênicas da proteína VP6 (ICTV, 2020) proposta por (MATTHIJNSSENS; CIARLET; RAHMAN; ATTOUI *et al.*, 2008). De acordo com a caracterização molecular da VP6, utiliza-se a classificação por genogrupo I1-I5, sendo o I2 de origem humana (MATTHIJNSSENS; CIARLET; MCDONALD; ATTOUI *et al.*, 2011).

Quanto ao genótipo, são classificados de acordo com o gene da VP7 (com os tipos definidos pela sigla G), e da VP4 (com os tipos definidos pela sigla P), no formato GxP[x] (DESSELBERGER, 2014).

Do ponto de vista epidemiológico, o RVA é o mais importante para a infecção humana e associado ao risco de gastroenterite em crianças menores de cinco anos (TATE; BURTON; BOSCHI-PINTO; PARASHAR *et al.*, 2016). É também descrito como frequente causa de hospitalização por gastroenterite em adultos (GUTIERREZ; FIALHO; MARANHÃO; MALTA *et al.*, 2020; LAUSCH; WESTH; KRISTENSEN; LINDBERG *et al.*, 2017).

Os RVs têm sido descritos em locais ativados e em diferentes ecossistemas aquáticos como efluentes de esgoto, e praias, rios, lagoas e água de consumo (FUMIAN; VICTORIA; VIEIRA; FIORETTI *et al.*, 2018; LIZASOAIN; TORT; GARCÍA; GILLMAN *et al.*, 2018; MASCIOPINTO; DE GIGLIO; SCRASCIA; FORTUNATO *et al.*, 2019; OKOH; SIBANDA; GUSHA, 2010; PRADO; GASPAS; MIAGOSTOVICH, 2014; PURPARI; MACALUSO; DI BELLA; GUCCIARDI *et al.*, 2019; VIEIRA; DE ABREU CORRÊA; DE JESUS; LUZ *et al.*, 2016).

A pesquisa de genótipos virais circulantes de RV no ambiente é uma ferramenta de vigilância epidemiológica importante para acompanhamento da emergência de novos genótipos. A vacina de rotavírus, a Rotarix[®] (GlaxoSmithKline, Rixensart, Belgium) foi introduzida no Brasil em 2016. Um estudo buscou identificar os genótipos circulantes no esgoto durante 1 ano, após a introdução da vacina (agosto de 2019 a julho de 2010) na cidade do Rio de Janeiro e detectou os genótipos P[4], P[6] e G2, com base na classificação da VP4 e VP7. O sequenciamento da NSP3 e NSP4 não identificou cepas vacinais (FUMIAN; LEITE; ROSE; PRADO *et al.*, 2011).

Outro estudo realizou o sequenciamento parcial da VP6 de rotavírus no efluente de duas estações de tratamento de esgoto de hospitais da região metropolitana do Rio de Janeiro de 2005 e 2008 e indicou a presença do genogrupo I no esgoto, em uma prevalência de 7/14 (50,0%) e 19/20 (95,0%) em cada estação (PRADO; SILVA; GUILAYN; ROSE *et al.*, 2011).

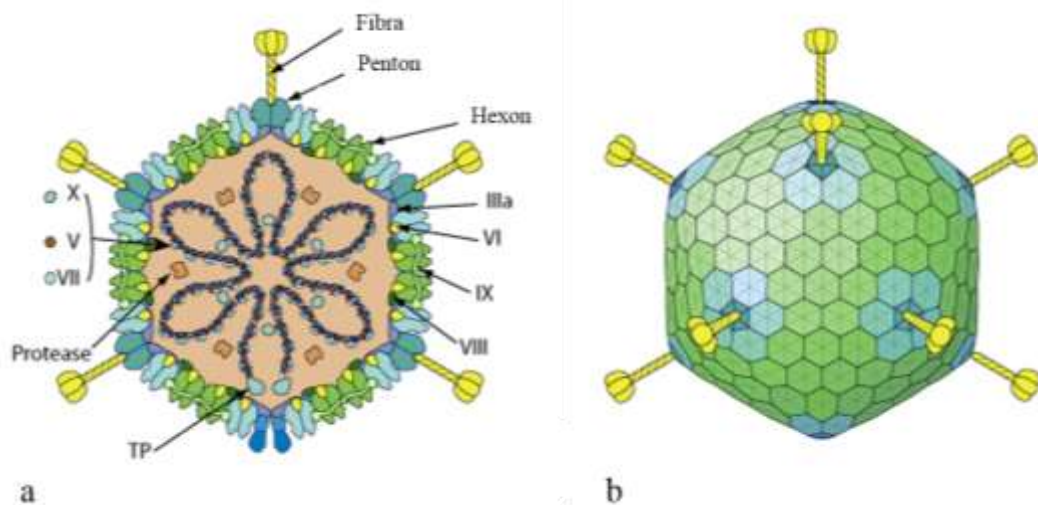
2.2.3 Adenovírus humanos (HAdV)

Os HAdV pertencem à família *Adenoviridae*, gênero *Mastadenovirus* (ICTV, 2020). São vírus não envelopados, com capsídeo de simetria icosaédrica, 90 nm de diâmetro e DNA dupla fita com aproximadamente 35 kb (Figura 6). A proteína do capsídeo é composta de 92 capsômeros, formados por 240 hexons, 12 bases dos pentons, e 12 estruturas chamadas fibras que se projetam de cada penton para o exterior. As proteínas acessórias (IIIa-X), protease e

a proteína terminal (TP) contribuem para a manutenção da estrutura viral (NEMEROW; STEWART; REDDY, 2012; RUX; BURNETT, 2004).

As regiões conservadas do gene que codifica a proteína do hexon são utilizadas para detecção molecular e oligonucleotídeos foram desenvolvidos para detectar todos os tipos de HAdV (ALLARD; ALBINSSON; WADELL, 2001; BERK, 2007; HERNROTH; CONDEN-HANSSON; REHNSTAM-HOLM; GIRONES *et al.*, 2002).

Figura 6: Estrutura do adenovírus



a) Capsídeo não envelopado com DNA dupla fita, proteínas estruturais hexon, penton, fibra, IIIa-X, protease e proteína terminal (TP). b) Formato do capsídeo icosaédrico com as projeções das fibras (VIRALZONE, 2021).

Diversas espécies de HAdV são descritas como mastadenovírus humanos A-G (ICTV, 2020), responsáveis por infecções no trato respiratório, gastrointestinal e conjuntiva. Os adenovírus A, F e G estão relacionados às infecções gastrointestinais, B e C a infecções respiratórias e D a ceratoconjuntivite. Mais de 60 sorotipos de adenovírus são conhecidos por causar infecção em humanos. (HEWITT; GREENING; LEONARD; LEWIS, 2013).

A gastroenterite por HAdV, relacionada principalmente aos sorotipos 40-41 da espécie F, provoca lesões no trato gastrointestinal com atrofia de vilosidades e hiperplasia das criptas, causando má absorção e perda de líquido. O período de incubação é de 8 dias e está menos associado à febre alta e desidratação quando comparada aos rotavírus, mas vômito e febre são comuns (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015).

A detecção de HAdV em diferentes matrizes ambientais é amplamente descrita na literatura. No mundo, estudos têm sido realizados em alimentos, fômites hospitalares, rios, lagoas, água do mar, esgoto e lodo de esgoto (BOFILL-MAS; RUSIÑOL; FERNANDEZ-CASSI; CARRATALÀ *et al.*, 2013; HEWITT; GREENING; LEONARD; LEWIS, 2013; RAMES; ROIKO; STRATTON; MACDONALD, 2016).

A diversidade genética de HAdV em esgoto da Itália identificou as espécies A (sorotipos 5 e 12), B (3) e F (41) por sequenciamento de Sanger. Por NGS, além dos já detectados, identificaram-se mais 15 sorotipos (IACONELLI; VALDAZO-GONZÁLEZ; EQUESTRE; CICCAGLIONE *et al.*, 2017). Na Austrália, HAdV (31), B (3), C (1, 2 e 30), D (19) e F (41) foram caracterizados por NGS no esgoto (LUN; CROSBIE; WHITE, 2019).

Quanto à diversidade genética de espécies de HAdV em matrizes ambientais no Brasil, realizou-se a caracterização de HAdV em duas estações de tratamento de esgoto de hospitais na região metropolitana do Rio de Janeiro. Nas 34 amostras, foram identificados HAdV espécies D (23,53%), F-41 (14,70%), F-40 (8,82%) e C (8,82%) (PRADO; SILVA; GUILAYN; ROSE *et al.*, 2011). Um estudo da diversidade de HAdV, realizada em locais de realização de esportes aquáticos dos jogos Olímpicos de 2016 na cidade do Rio de Janeiro, caracterizou em águas e sedimentos respectivamente HAdV espécies C (93.1%–57.8%) e F (25.3%–0%) (STAGGEMEIER; HECK; DEMOLINER; RITZEL *et al.*, 2017).

Os HAdV têm sido apontados como potenciais indicadores virais de contaminação fecal humana por apresentarem as seguintes características: (1) estabilidade, persistência e ampla distribuição em diferentes matrizes ambientais; (2) detecção no esgoto sem sazonalidade; (3) resistência à desinfecção por ultravioleta (UV); (4) maior abundância em relação a outros vírus entéricos; (5) isolamento em cultura e ferramentas moleculares disponíveis; (6) especificidade viral com o hospedeiro humano (HUNDESA; MALUQUER DE MOTES; BOFILL-MAS; ALBINANA-GIMENEZ *et al.*, 2006).

2.2.4 Metodologias de recuperação viral

Devido à complexidade e alta variabilidade físico-química e microbiológica em diversas matrizes ambientais, o estabelecimento de controles internos como metodologias de recuperação viral possui importância na virologia ambiental. Nestes estudos, concentrações conhecidas de partículas virais são inseridas artificialmente nas amostras e depois recuperadas após a concentração viral, extração do material genético e quantificação por PCR em tempo real. (LI; QIU; PANG; ASHBOLT, 2019).

Para isto, estudos de padronização de metodologias foram descritos, utilizando diferentes métodos de concentração, como floculação orgânica, ultracentrifugação, adsorção/eluição e a ultrafiltração em diferentes matrizes (CALGUA; FUMIAN; RUSIÑOL; RODRIGUEZ-MANZANO *et al.*, 2013; CALGUA; RODRIGUEZ-MANZANO; HUNDESA; SUÑEN *et al.*, 2013; KATAYAMA; SHIMASAKI; OHGAKI, 2002; PINA; JOFRE; EMERSON; PURCELL *et al.*, 1998; WYN-JONES; SELLWOOD, 2001).

O uso de controles internos é uma prática importante para avaliar a metodologia de recuperação viral utilizada e o nível de inibição durante o processo de detecção, além de identificar resultados falso-negativos. Os mais utilizados são os controles internos de processo, adicionados antes da concentração da amostra e recuperados na etapa final de qPCR (HARAMOTO; KITAJIMA; HATA; TORREY *et al.*, 2018; LI; QIU; PANG; ASHBOLT, 2019).

Exemplos de controles internos em virologia ambiental são: o bacteriófago PP7, um vírus de RNA que infecta *Pseudomonas sp.*, colifago MS2, mengovírus, norovírus murino, vírus da mancha amarela de arroz, vírus do mosaico do tabaco, vírus do enrugamento do nabo e *pepper mild mottle virus* (PMMoV). A escolha do controle interno pode ser realizada de acordo com a semelhança genética (DNA ou RNA) e morfológica (com ou sem envelope). Por exemplo, a eficiência de recuperação de mengovírus pode ser utilizada em estudos de hepatite A, pois ambos são vírus não envelopados e com material genético de RNA (HARAMOTO; KITAJIMA; HATA; TORREY *et al.*, 2018).

2.2.5 Metodologias de detecção, quantificação e caracterização viral

Diferentes metodologias são aplicadas na virologia ambiental, para detectar, quantificar e caracterizar as partículas virais presentes em determinada matriz ambiental. Algumas destas são o isolamento viral em cultura de células, o PCR em Tempo Real para quantificação e o sequenciamento para caracterização viral (PAYNE, 2017).

2.2.5.1 Isolamento viral

O isolamento em cultura de células foi a primeira metodologia estabelecida na virologia, e até hoje é considerada o padrão-ouro para estimar o número de partículas virais infecciosas, seja em amostras clínicas ou matrizes ambientais (METCALF; MELNICK; ESTES, 1995).

Uma matriz ambiental de interesse, por apresentar interferentes ambientais, é submetida a tratamentos para retirada de contaminantes, como purificações e/ou diluições seriadas. A amostra é tratada com antibióticos e inoculada em uma linhagem celular estabelecida específica para o vírus de estudo. A confirmação da partícula infecciosa é realizada após alguns dias pela observação do efeito citopático por microscopia óptica. A maior diluição com um efeito citopático em 50% das células inoculadas é descrita como “50% da dose infectante de cultura de tecido por mililitro” (do inglês *tissue culture infective dose*) e os resultados expressos em TCID₅₀ ml⁻¹ (RAMAKRISHNAN, 2016).

2.2.5.2 Ensaio de PCR em Tempo Real

O PCR em Tempo Real ou PCR quantitativo (qPCR) é a metodologia mais utilizada na virologia clínica e ambiental, por ser de rápida execução e apresentar alta sensibilidade de detecção, aliada à padronização com iniciadores e sondas específicos para amplificação de fragmentos virais de interesse (GENSBERGER; KOSTIĆ, 2013).

A quantificação viral presente em matrizes ambientais possui diversas aplicações, dispersão, relação com o saneamento inadequado e avaliação da eficiência de tratamento de efluentes (FUMIAN; LEITE; ROSE; PRADO *et al.*, 2011; PRADO; DE CASTRO BRUNI; BARBOSA; GARCIA *et al.*, 2019; PRADO; FUMIAN; MIAGOSTOVICH; GASPAR, 2012). Sua aplicação em esgoto bruto é proposta como uma metodologia de epidemiologia baseada em esgoto (*Wastewater Based Epidemiology – WBE*) (PRADO; FUMIAN; MANNARINO; MARANHÃO *et al.*, 2020; PRADO; FUMIAN; MANNARINO; RESENDE *et al.*, 2021).

Uma modificação técnica, utilizando um pré tratamento com intercalantes de ácidos nucleicos, como os corantes propídio monoazida (PMA) e etídio monoazida (EMA) pode indicar a presença de partículas virais íntegras. (LEIFELS; CHENG; SOZZI; SHOULTS *et al.*, 2021; LEIFELS; HAMZA; KRIEGER; WILHELM *et al.*, 2016).

Para isso, as amostras são pré-tratadas com e sem PMA, ligando-se covalentemente e irreversivelmente ao DNA ou RNA viral e bloqueando a amplificação dos ácidos nucleicos devido ao desprendimento da enzima polimerase. Assim, apenas os genes-alvo de vírus intactos são amplificados (LEIFELS; CHENG; SOZZI; SHOULTS *et al.*, 2021; LEIFELS; HAMZA; KRIEGER; WILHELM *et al.*, 2016).

O ensaio de integridade do capsídeo foi descrito para HAdV, vírus da hepatite A, rotavírus, norovírus e enterovírus (COUDRAY-MEUNIER; FRAISSE; MARTIN-LATIL; GUILLIER *et al.*, 2013; LEIFELS; HAMZA; KRIEGER; WILHELM *et al.*, 2016;

RANDAZZO; LÓPEZ-GÁLVEZ; ALLENDE; AZNAR *et al.*, 2016; SILVA; PESSOA-DE-SOUZA; FONGARO; ANUNCIACÃO *et al.*, 2015), demonstrando seu potencial em diferenciar partículas íntegras e de ser um bom indicador para estimar partículas infecciosas.

2.2.5.3 Sequenciamento nucleotídico

O sequenciamento nucleotídico é uma metodologia simples e rápida, aplicada após a amplificação por PCR/RT-PCR convencional para confirmação de sequências de interesse e caracterização molecular. Em uma matriz ambiental, Suas limitações são a dificuldade de amplificar fragmentos maiores e de identificar diferentes genótipos virais presentes (IACONELLI; VALDAZO-GONZÁLEZ; EQUESTRE; CICCAGLIONE *et al.*, 2017).

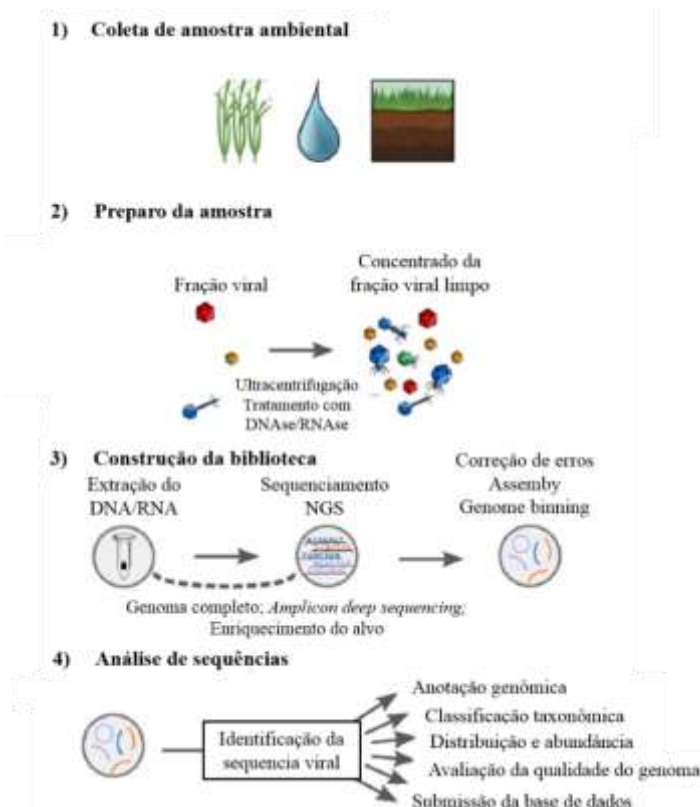
A metodologia de sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing - NGS*) permitiu ampliar o sequenciamento de todo o material genético presente em determinada amostra, possibilitado a obtenção do microbioma de determinado fluido corporal, possíveis co-infecções e o estabelecimento de relações entre espécies detectadas pela análise do metagenoma (ROUX, 2021). Possibilitou que novos genomas virais, inclusive não cultiváveis, fossem sequenciados, ampliando a base de dados de sequências genômicas (FERNANDEZ-CASSI; TIMONEDA; MARTÍNEZ-PUCHOL; RUSIÑOL *et al.*, 2018).

Os principais sistemas de NGS são o *Illumina* (Illumina Inc) e o *MinION* (Oxford Nanopore). Estes se baseiam na metodologia de sequenciamento por síntese, sendo por nanoporos no *MinION*. Ambas as análises envolvem etapas de preparação das amostras para o sequenciamento dos nucleotídeos e construção das bibliotecas. São utilizados para vigilância genômica e necessitam de *pipelines* de bioinformática para identificação das espécies virais detectadas (FERNANDEZ-CASSI; TIMONEDA; MARTÍNEZ-PUCHOL; RUSIÑOL *et al.*, 2018; RESENDE; MOTTA; ROY; APPOLINARIO *et al.*, 2020).

O sequenciamento por NGS pode ser realizado por três metodologias diferentes, dependendo da investigação de interesse. Pela análise do metagenoma viral completo, capaz de fornecer um panorama das principais espécies virais, pelo *amplicon deep sequencing* NGS, direcionado para um vírus ou família viral de interesse, (IZQUIERDO-LARA; ELSINGA; HEIJNEN; MUNNINK *et al.*, 2021) e HAdV (LUN; CROSBIE; WHITE, 2019), e pelo sequenciamento por enriquecimento do alvo, que utiliza um conjunto de sondas de interesse em saúde pública (MARTÍNEZ-PUCHOL; RUSIÑOL; FERNÁNDEZ-CASSI; TIMONEDA *et al.*, 2020).

As etapas para análise do metagenoma de vírus em matrizes ambientais incluem: (1) coleta da amostra; (2) preparação do material, onde a fração viral é submetida à ultracentrifugação e tratamento com DNase/RNase para retirada de material genético livre, e obtenção de um concentrado viral limpo; (3) construção da biblioteca, de acordo com o objetivo do estudo; e (4) análise de sequências (Figura 7).

Figura 7: Etapas de análise do metagenoma viral.



1) Coleta da amostra ambiental, 2) Preparo da amostra, 3) Construção da biblioteca e Análise de sequências
Adaptado de ROUX (2021).

2.3 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DO RISCO MICROBIOLÓGICO (QMRA)

A exposição ocupacional de trabalhadores que exercem atividades diretamente com limpeza urbana e manejo de resíduos sólidos pode causar diversos efeitos à saúde, como por exemplo, doenças infecciosas, efeitos tóxicos agudos, inflamação, alergia e câncer (CORRAO; MAZZOTTA; LA TORRE; DE GIUSTI, 2012).

As investigações epidemiológicas relatam que trabalhar no setor de RSU está associado a uma série de problemas de saúde (problemas respiratórios, gastrointestinais, irritação na pele), especialmente entre trabalhadores da coleta de resíduos em países de baixa renda (GROUP, 2006).

O manuseio de resíduos domiciliares sem o devido equipamento de proteção individual implica na exposição dos trabalhadores de RSU a substâncias químicas, poeira e microrganismos. No cenário brasileiro, (PENTEADO; CASTRO, 2021)) destacaram a preocupação do risco no manuseio de resíduos potencialmente infectantes pelos trabalhadores durante a pandemia da COVID-19. Até o momento de conclusão desta tese (junho/2021), não foram publicados estudos experimentais da presença de SARS-CoV-2 no lixiviado de caminhão.

A abordagem QMRA é utilizada para avaliar os riscos microbiológicos com base na medida dos índices de patógenos em uma matriz ambiental e sua curva dose-resposta. Como patógeno de referência para a avaliação de risco de trabalhadores expostos, o HAdV é um potencial candidato a marcador virológico de contaminação fecal humana no ambiente, está amplamente disperso em diferentes matrizes ambientais e permanece infeccioso por um período prolongado, além de ser um vírus relacionado à uma ampla gama de quadros clínicos e diferentes vias de exposição (CARDUCCI; DONZELLI; CIONI; FEDERIGI *et al.*, 2018).

A QMRA permite estimar a probabilidade de infecção por HAdV para aplicações destas informações em intervenções na gestão de risco e estabelecer a comunicação de risco para tomada de decisões em saúde pública. As etapas de avaliação de risco abrangem a descrição do cenário de exposição, a avaliação da exposição, o modelo de dose-resposta e a caracterização do risco (HAAS; ROSE; GERBA, 2014; VERANI; FEDERIGI; DONZELLI; CIONI *et al.*, 2019).

A maioria dos estudos de avaliação da exposição dos trabalhadores de limpeza urbana estão focadas na inalação de aerossóis contaminados (KIVIRANTA; TUOMAINEN; REIMAN; LAITINEN *et al.*, 1999; MADSEN; FREDERIKSEN; BJERREGAARD; TENDAL, 2020; PARK; RYU; KIM; YOON, 2011), enquanto a ingestão oral acidental de microrganismos durante a coleta de resíduos raramente é abordada, exceto para alguns estudos de monitoramento sobre contaminação por fungos e bactérias nas mãos dos trabalhadores (MADSEN; ALWAN; ØRBERG; UHRBRAND *et al.*, 2016).

Nos últimos 20 anos, a abordagem por QMRA tem sido mais utilizada para avaliação de riscos ambientais decorrente do monitoramento ou aferição de patógenos nos ambientes de trabalho. Esta abordagem foi realizada para avaliar o risco de trabalhadores em diferentes atividades nas estações de tratamento de águas residuais (CARDUCCI *et al.*, 2018; MEDEMA *et al.*, 2004; YAN; LENG; WU, 2021), em agricultores durante a irrigação com águas de reuso (ANTWI-AGYEI *et al.*, 2016; KOUAMÉ *et al.*, 2017; MARA; SLEIGH,

2010; SAMPSON *et al.*, 2017; SEIDU *et al.*, 2008) e durante as aplicações de fertilizantes de biossólidos ou esterco de origem animal (BROOKS *et al.*, 2012; BROOKS *et al.*, 2005; GERBA; CASTRO-DEL CAMPO *et al.*, 2008; JAHNE *et al.*, 2015; HAAS *et al.*, 2008).

Além disso, embora tenha sido raramente explorado no contexto de RSU, um estudo investigou a análise de risco de exposição a bioaerossóis de *Aspergillus fumigatus* e *Escherichia coli* O157:H7 em um lixão a céu aberto na Nigéria. Após 11 horas de exposição, os trabalhadores envolvidos na triagem, coleta de resíduos e monitoramento do local apresentaram um risco alto de desenvolver doença respiratória e gastrointestinal em todas as atividades, com magnitude de 10^{-1} (AKPEIMEH; FLETCHER; EVANS; IBANGA, 2020).

A análise por QMRA utilizando o modelo de risco de exposição ocupacional por aerossóis ao HAdV e a probabilidade de infecção aplicada em três locais diferentes. A probabilidade após 15 minutos de exposição foi maior em um banheiro de serviços de saúde (100%), seguida de uma estação de tratamento de esgoto (55%), na reciclagem de papel (40%) e no aterro sanitário (15%) (CARDUCCI; DONZELLI; CIONI; VERANI, 2016). Não há relatos na literatura sobre estudos prévios de QMRA utilizando o modelo de ingestão inadvertida de lixiviados para HAdV.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Descrever a ocorrência e diversidade genética de vírus em lixiviados de resíduos sólidos de caminhões de coleta e aterro sanitário a fim de determinar o risco de desenvolvimento de doenças gastrointestinais em trabalhadores de limpeza urbana no município do Rio de Janeiro pela exposição a esses vírus.

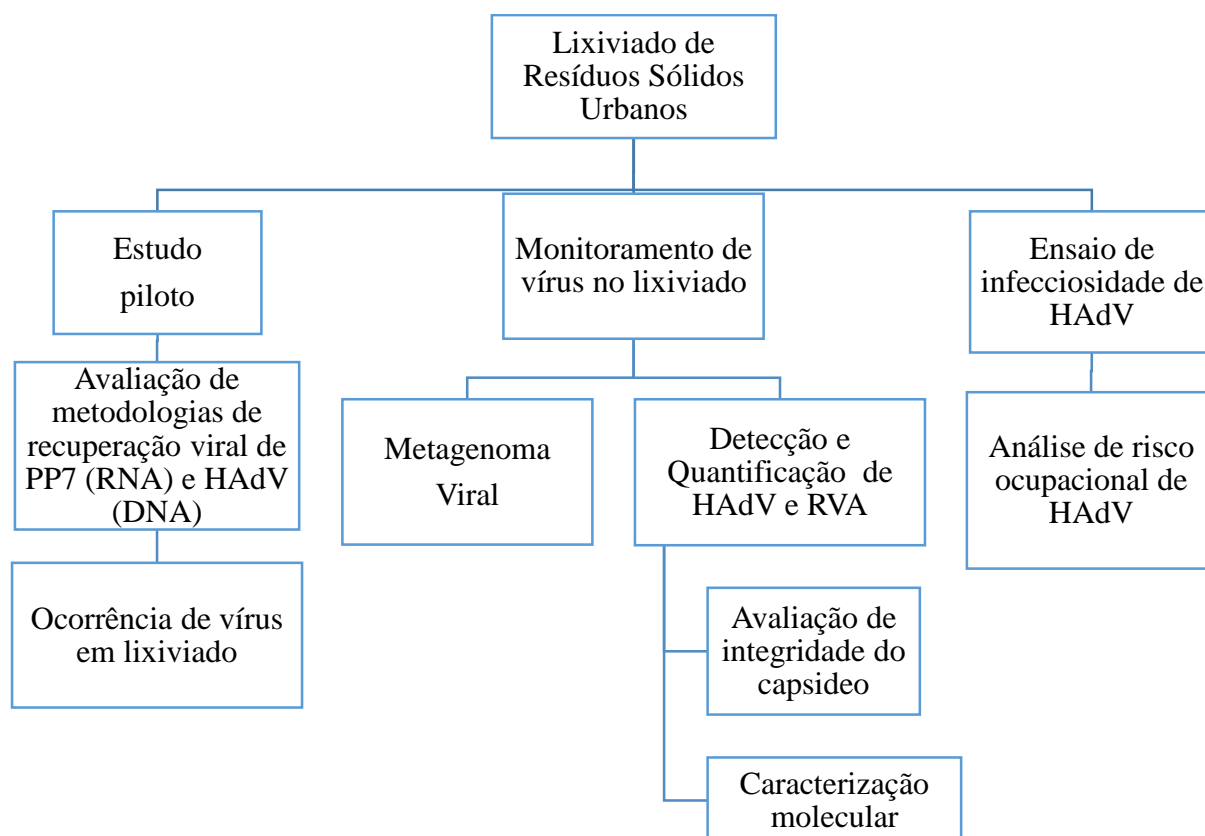
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer metodologias de recuperação de vírus em lixiviados;
- Avaliar por metagenoma a diversidade genética de vírus presentes nesta matriz;
- Determinar a ocorrência, concentração e integridade do capsídeo de HAdV e RVA;
- Caracterizar molecularmente os vírus detectados;
- Avaliar a infecciosidade de HAdV obtidos em lixiviados por isolamento em cultura de células e comparar como o ensaio de integridade do capsídeo por PCR em tempo real;
- Comparar as características físico-químicas e bacteriológicas de lixiviado provenientes de caminhão e de aterro sanitário.
- Avaliar o risco quantitativo de exposição ao HAdV dos trabalhadores da coleta domiciliar de resíduos sólidos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Essa tese de doutorado foi desenvolvida em três etapas, como demonstrado no fluxograma abaixo (Figura 8).

Figura 8: Fluxograma da metodologia desenvolvida nesta tese de doutorado.



4.1 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Este estudo não contemplou a utilização de amostras clínicas humanas ou animais. Não foram relatados riscos de danos à saúde dos profissionais envolvidos ou das populações que porventura residam em áreas próximas ao local das coletas de lixiviado. Durante as coletas, não foram introduzidos no sistema em estudo componentes químicos ou biológicos, não havendo possibilidade de disseminação de agentes contaminantes.

4.2 AMOSTRAS, LOCAIS DE ESTUDO E PERÍODO DE COLETA

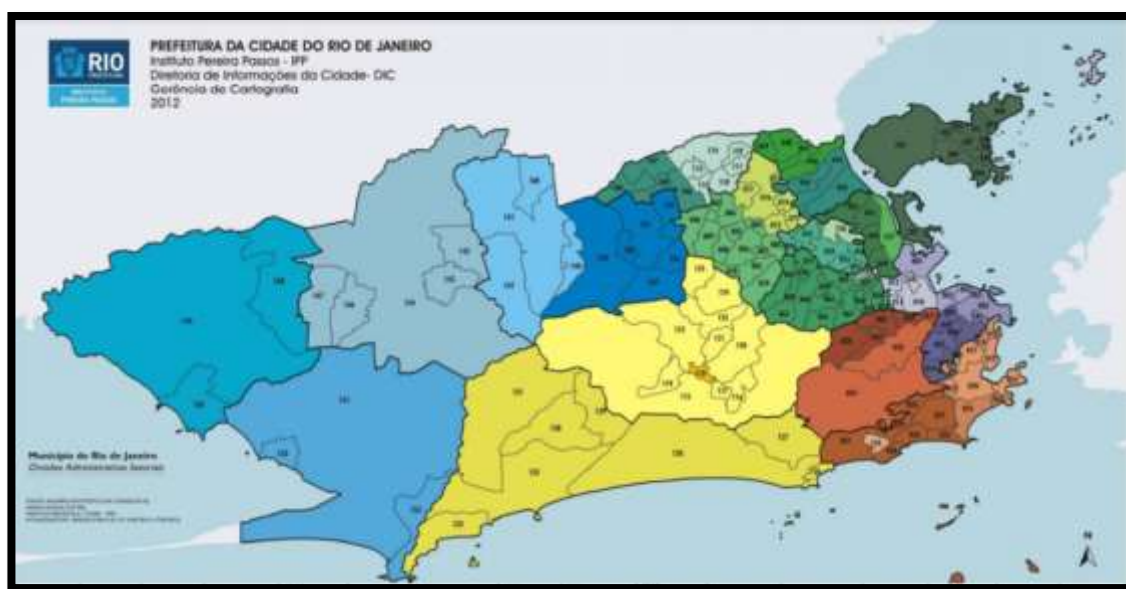
Para este estudo foram coletadas amostras de lixiviados brutos de resíduos sólidos de caminhões em uma Estação de Transferência de Resíduos (ETR) e de um aterro sanitário. As amostras foram coletadas em diferentes períodos de acordo com a etapa e local do estudo, conforme descrito a seguir:

4.2.1 Estação de Transferência de Resíduos

A coleta de lixo diretamente na bacia de caminhão foi realizada na ETR Jacarepaguá), localizada na Superintendência Regional de Jacarepaguá da Companhia de Limpeza Urbana do Município do Rio de Janeiro (COMLURB).

A ETR Jacarepaguá coleta resíduos sólidos urbanos da área de Planejamento 4, correspondendo a uma parte da Zona Oeste da cidade do Rio de Janeiro, com 900 mil habitantes. Essa área se subdivide nas regiões de planejamento 4.1 (Jacarepaguá e Cidade de Deus) e 4.2 (Barra da Tijuca). A Figura 9 demonstra a região atendida em amarelo pela ETR Jacarepaguá no mapa do município do Rio de Janeiro.

Figura 9: Área de planejamento 4 em amarelo atendida pela Estação de Transferência de Resíduos (ETR) Jacarepaguá.



Fonte: IPP (2012).

4.2.2 Aterro sanitário

A coleta de lixo de aterro foi realizada na CTR Rio, localizado na região metropolitana do Rio de Janeiro. Esse aterro sanitário começou a operar em 2011, serve uma região de 6,9 milhões de habitantes das cidades do Rio de Janeiro, Seropédica, Itaguaí e Mangaratiba, Piraí, Miguel Pereira e São João de Meriti e recebe 15 mil toneladas diárias de RSU, com estimativa de geração de até 1000 m³ de lixiviado/dia (COMLURB, 2020 – Comunicação Pessoal)

A CTR Rio possui uma impermeabilização com uma dupla camada de manta de polietileno de alta densidade (PEAD), intercalada com uma camada de argila compactada (Figura 10) e possui um sistema de drenagem e captação de lixiviado, que é direcionado para a estação de tratamento e monitorado por sensores para verificar vazamentos. O biogás gerado também é captado para aproveitamento energético e as águas pluviais são drenadas.

Figura 10: Central de Tratamento de Resíduos (CTR Rio), localizado em Seropédica.



Fonte: Google Earth (2021)

4.3 ESTUDO PILOTO

4.3.1 Controles virais

Neste estudo foram utilizados controles internos de processo durante o estudo piloto, que foram inoculados nas amostras de lixiviado de aterro antes da concentração, foram extraídos e recuperados ao final por PCR em Tempo Real, para avaliação da metodologia de recuperação viral.

Um dos controles utilizados foi o bacteriófago PP7, um vírus de RNA fita simples que infecta a bactéria *Pseudomonas sp*, gentilmente cedido pela Dra. Verónica Rajal (Universidade de Salta, Argentina). (RAJAL; MCSWAIN; THOMPSON; LEUTENEGGER et al., 2007). Outro controle interno, representando vírus de DNA, HAdV tipo 35, foi gentilmente doado pela Dra Annika Allard, *Umea University*, Suécia.

Cada amostra foi inoculada com $1,45 \times 10^9$ cópias genômicas em 100 μ l do bacteriófago PP7 e $9,8 \times 10^7$ cópias genômicas em 100 μ l do HAdV 35.

4.3.2 Avaliação de metodologias para recuperação viral

Foram coletadas três amostras de lixiviado bruto de aterro sanitário da CTR Rio, localizado em Seropédica, de junho de 2017 a fevereiro de 2018 para avaliação da metodologia de vírus em lixiviado. Foram coletados três litros em um tanque na central de captação de lixiviado no aterro sanitário, utilizando baldes de alumínio com posterior transferência para garrafas esterilizadas de polietileno. Um litro foi reservado para os ensaios de caracterização virológica e bacteriológicas e dois litros para as análises físico-químicas. As amostras foram transportadas para o laboratório a 4 °C e processadas em 24 h.

Cada amostra foi concentrada por dois métodos diferentes: floculação orgânica e ultracentrifugação. Posteriormente, as amostras concentradas foram submetidas à extração de ácido nucleico utilizando dois kits diferentes: (1) *QIAamp Fast DNA Stool mini kit*[®] (QIAGEN, Valência, CA, EUA); e (2) *QIAamp viral RNA mini kit*[®] (QIAGEN, Valência, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Como controle negativo, foi utilizada a água destilada *UltraPure™ DNase/RNase-Free* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e como controle positivo da extração, uma suspensão fecal positiva do LVCA – código CI-018).

Os resultados foram analisados quanto à taxa de sucesso (análise qualitativa quanto à presença ou ausência de detecção viral) e eficiência de recuperação viral (análise quantitativa quanto à quantidade de recuperação viral) (STALS; BAERT; VAN COILLIE; UYTTENDAELE, 2011).

Para isso, realizou-se a quantificação por PCR em Tempo Real para PP7 e HAdV, em duplicata, sem diluição e diluídas 10^{-1} e 10^{-2} , totalizando seis *replicatas* técnicas. Utilizou-se o sistema TaqMan[®] (ABI PRISM 7500, Applied Biosystems, Foster City, CA EUA), conforme descrito no item 4.5.2.2, e o resultado expresso em número de cópias genômicas. Nos experimentos de recuperação viral, os valores de HAdV obtidos naturalmente na matriz de lixiviado presente nas amostras foram subtraídos. O bacteriófago PP7, por não estar presente naturalmente no lixiviado, não foi subtraído.

Para determinar os limites de detecção de HAdV e PP7 por qPCR, uma amostra de lixiviado de aterro contaminada artificialmente foi submetida à ultracentrifugação associada com os dois métodos de extração do material genético. Para análise por qPCR, a amostra foi diluída de forma seriada na base 10, da forma pura até a diluição 10^{-13} , em duplicata.

4.3.3 Ocorrência de vírus em lixiviado

Após determinação da metodologia de recuperação viral mais eficiente, a mesma foi utilizada para investigar a ocorrência natural de HA Δ V no lixiviado. Com este objetivo, três amostras de lixiviado bruto de aterro sanitário foram coletadas de outubro de 2018 a fevereiro de 2019. Foram coletados três litros em um tanque na central de captação de lixiviado no aterro sanitário, utilizando baldes de alumínio com posterior transferência para garrafas esterilizadas de polietileno (Figura 11). Não foram coletados lixiviado de caminhão nesta etapa. Um litro foi reservado para os ensaios de caracterização virológica e bacteriológicas e dois litros para as análises físico-químicas. As amostras foram transportadas para o laboratório a 4 °C e processadas em 24 h.

As amostras foram concentradas, ácidos nucleicos extraídos e quantificadas por PCR em Tempo Real para a ocorrência natural de HA Δ V, em duplicata, sem diluição e diluídas 10^{-1} e 10^{-2} , totalizando seis *replicatas* técnicas. Utilizou-se o sistema TaqMan[®] (ABI PRISM 7500, Applied Biosystems, Foster City, CA EUA), conforme descrito no item 4.5.2.2, e o resultado expresso em número de cópias genômicas.

Figura 11: Coleta de lixiviado de aterro sanitário na Central de Tratamento de Resíduos (CTR Rio).



Fonte: Autoria própria (2017).

4.4 METODOLOGIAS DE CONCENTRAÇÃO VIRAL

4.4.1 Floculação orgânica

A floculação orgânica baseia-se na propriedade de vírus, que estariam presentes na matriz de lixiviado, adsorverem a proteínas pré-floculadas de leite desnatado. Para a concentração viral de lixiviado de resíduos sólidos, um volume de 50 ml de lixiviado foi eluído com 100 ml de tampão glicina 0,25 N (pH 9,5). A amostra foi incubada sob agitação no gelo durante 30 minutos e centrifugada a 8000 x g durante 30 minutos a 4 °C. O

sobrenadante foi coletado, o *pellet* descartado e o pH ajustado para 3,5. A amostra foi mantida sob agitação durante 8 horas à temperatura ambiente com uma solução contendo flocos de leite desnatado 0,01% (pH 3,5), para permitir a adsorção viral seguida de centrifugação a $8000 \times g$ por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente removido, o sedimento dissolvido em 1 ml de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,5) e o concentrado viral foi armazenado a -80 °C (CALGUA; RODRIGUEZ-MANZANO; HUNDESA; SUÑEN *et al.*, 2013).

4.4.2 Ultracentrifugação

Um volume de 42 ml de lixiviado foi centrifugado a $100.000 \times g$ por 1 hora a 4 °C utilizando um rotor tipo 35 na ultracentrífuga *Sorvall® WX Ultra Centrifuge Series* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 4 ml de tampão glicina 0,25N (pH 9,5) em gelo sob agitação por 30 minutos. Os sólidos suspensos foram removidos por centrifugação a $12.000 \times g$ por 15 minutos, o pellet descartado e o sobrenadante contendo as partículas virais ultracentrifugado a $100.000 \times g$ por 1 hora a 4 °C utilizando o rotor SW41. O sedimento obtido foi dissolvido em 500 µl de tampão PBS 1X e o concentrado viral foi armazenado a -80 °C (PINA; JOFRE; EMERSON; PURCELL *et al.*, 1998).

4.5 MONITORAMENTO DE VÍRUS NO LIXIVIADO

A partir dos resultados obtidos no estudo piloto, iniciou-se o monitoramento de viral em lixiviados de origens diferentes: o lixiviado fresco de caminhão e o lixiviado de aterro sanitário. Para este monitoramento, três litros de lixiviado de resíduos sólidos foram coletados de março a dezembro de 2019 na Estação de Transferência de Resíduos (ETR Jacarepaguá) e no Aterro Sanitário (CTR Rio).

Nove amostras de lixiviado fresco foram coletadas diretamente da bacia de caminhões de coleta de resíduos (Figura 12), cada uma delas correspondendo a um *pool* de 3-5 lixiviados de caminhões de roteiros diferentes (500 ml cada). Treze amostras de lixiviado bruto foram coletadas da central de captação de lixiviado no aterro sanitário.

De cada amostra coletada, um litro foi reservado para os ensaios de caracterização virológica e bacteriológica e dois litros foram submetidos às análises físico-químicas. As 22 amostras foram submetidas à extração de ácidos nucleicos, concentração viral, extração de ácidos nucleicos e detecção por PCR em Tempo Real, em duplicata, sem diluição e diluídas 10^{-1} e 10^{-2} , totalizando seis *replicatas* técnicas (Item 4.5.2.2).

Figura 12: Coleta de lixiviado diretamente da bacia do caminhão de coleta de resíduos sólidos, na Estação de Transferência de Resíduos (ETR=Jacarepaguá).



Fonte: Autoria própria (2019).

4.5.1 Sequenciamento de nova geração (NGS)

Para o NGS, utilizou-se o sistema *Illumina* (Illumina Inc), baseado no sequenciamento por síntese. Foram realizados dois *pools* do concentrado viral dos dois lixiviados diferentes, com 150 µl de cada amostra: um com as nove amostras de lixiviado fresco de caminhão e outro com as treze amostras de lixiviado de aterro sanitário.

Antes da extração dos ácidos nucleicos, 150 µl de cada *pool* foi tratado com 160U de *Turbo DNase* para degradação de DNA livre em excesso (Ambion Cat No. AM1907, Ambion) por 1h a 37 °C. A DNase foi inativada e as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 1,5 min. O sobrenadante foi coletado e armazenado a 4 °C até a extração dos ácidos nucleicos com o kit *QIAamp® Fast DNA Stool Mini* (QIAGEN, Valência, CA, EUA).

Após a extração, para detectar o material genético viral tanto de DNA quanto de RNA, a primeira fita de material genético foi retrotranscrita utilizando a transcriptase reversa e o *primer* aleatório A (5' GT-GTTTCCCAGTCACGATANNNNNNNNN'-3). A reação para síntese do cDNA foi incubada e posteriormente, para a construção da segunda fita, utilizou-se a sequenase, seguida de nova etapa de incubação (FERNANDEZ-CASSI; TIMONEDA; MARTÍNEZ-PUCHOL; RUSIÑOL *et al.*, 2018; WANG; URISMAN; LIU; SPRINGER *et al.*, 2003).

A segunda etapa de amplificação por PCR utilizou o *primer* aleatório B (5'-GTTTCCCAGTCACGATA'-3) e a enzima *AmpliTaqGold* (cat. No.4311806, *Life technologies*) para obter uma quantidade necessária de DNA para a preparação das bibliotecas. Após uma primeira etapa de 10 min a 95 °C para ativação da DNA polimerase,

padronizou-se o seguinte programa de PCR: 25 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 40 °C e 30 segundos a 50 °C, com uma etapa final de 60 segundos a 72 °C (FERNANDEZ-CASSI; TIMONEDA; MARTÍNEZ-PUCHOL; RUSIÑOL *et al.*, 2018; WANG; URISMAN; LIU; SPRINGER *et al.*, 2003).

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o *kit* de purificação de PCR *Agencourt AMPure XP* e ressuspendidos em um volume final de 50 µl (Beckman Coulter, CA, EUA), seguido quantificação utilizando o Qubit 2.0. As bibliotecas genômicas foram construídas com o kit de preparação de biblioteca *Nextera XT DNA* (Illumina Inc) de acordo com as instruções do fabricante.

Posteriormente, as bibliotecas foram sequenciadas na plataforma *NextSeq 550* (Illumina Inc), utilizando o kit *Mid Output 300* ciclos (2 × 150 pb) e o cartucho *NextSeq 550* no SENAI CETIQT - Instituto de Inovação em Biossintéticos e Fibras, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

As *reads* obtidas no formato FASTQ foram geradas pela pipeline *BaseSpace* da Illumina (<https://basespace.illumina.com>). A filtragem das leituras de baixa qualidade e a remoção dos adaptadores foram realizadas no *PRINSEQ v. 0.20.4* (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011).

Para montagem das sequências de nucleotídeos, utilizou-se o *megahit v. 1.2.8* (LI; LUO; LIU; LEUNG *et al.*, 2016) e as sequências virais filtradas pelo *VirSorter v 2.1* (GUO; BOLDUC; ZAYED; VARSANI *et al.*, 2021). Nas sequências classificadas como vírus pelo *VirSorter*, utilizou-se o *DIAMOND v. 0.9.31* (BUCHFINK; REUTER; DROST, 2021) para pesquisar outras sequências semelhantes contra todas as proteínas virais curadas disponíveis no *UniProt (The UniProt Consortium 2021)*.

As famílias virais foram atribuídas manualmente para cada espécie identificada de acordo com o banco de dados padronizado *NCBI Taxonomy*. As sequências analisadas para análise taxonômica devem expressar um *e-value* de 10^{-5} e um mínimo de 100 pb de alinhamento. Os vírus de humanos e de outros vertebrados foram classificados a nível de espécie e descritos de acordo com a presença de envelope viral e o tipo de material genético (DNA/RNA).

4.5.2 Métodos de detecção e quantificação de HAdV e RVA

4.5.2.1 Ensaio de integridade do capsídeo por qPCR

Para os ensaios de PCR quantitativo de integridade do capsídeo, cada amostra de lixiviado foi submetida ao tratamento com propídio monoazida (PMA). Em um volume de 200 µl de cada concentrado viral ultracentrifugado, inoculou-se o PMAxxx™ (Biotium Inc., Fremont, CA, EUA) a uma concentração final de 50 µM e incubou-se no escuro durante 10 minutos sob agitação de 200 rpm a 25 °C. Posteriormente, as amostras foram incubadas durante 15 minutos no dispositivo de fotólise PMA-Lite™ LED (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA). Cada amostra foi comparada em paralelo na ausência de PMA (FONGARO; HERNÁNDEZ; GARCÍA-GONZÁLEZ; BARARDI et al., 2016).

Os ácidos nucleicos foram extraídos com o *QIAamp Fast DNA Stool mini kit*® (QIAGEN, Valência, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Como controle negativo, foi utilizada água destilada *UltraPure™ DNase/RNase-Free* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e como controle positivo uma suspensão fecal positiva (código CI-019). Para a síntese de DNA complementar (cDNA) para RVA e posterior realização do RT-qPCR, utilizou-se o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

4.5.2.2 PCR quantitativo

O PCR quantitativo foi aplicado nas etapas de ensaio piloto, ocorrência de vírus em lixiviados e monitoramento de HAdV e RVA em lixiviados de resíduos sólidos. Para quantificação do material genético viral, com e sem PMA, realizou-se o PCR quantitativo (qPCR) pelo sistema TaqMan® (ABI PRISM 7500, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando iniciadores e sondas específicas marcadas com fluoróforos para HAdV (HERNROTH; CONDÉN-HANSSON; REHNSTAM-HOLM; GIRONES et al., 2002), RVA (RT-qPCR) (ZENG; HALKOSALO; SALMINEN; SZAKAL et al., 2008), e o controle interno de processo bacteriófago PP7 (RAJAL; MCSWAIN; THOMPSON; LEUTENEGGER et al., 2007). As sequências nucleotídicas dos iniciadores e sondas estão disponíveis no Quadro 7.

Cada amostra de lixiviado de resíduos sólidos foi testada em duplicata, em amostras puras sem diluição e em amostras diluídas (10^{-1} e 10^{-2}), totalizando seis reações de qPCR por amostra. Todas as reações qPCR incluíram um controle negativo (água destilada *UltraPure™ DNase/RNase-Free*) e positivo da extração (suspensões fecais positivas) e também um controle sem *template* (NTC).

As curvas padrões de DNA sintético no formato *gBlock* (Integrated DNA Technologies™, Coralville, Iowa, EUA) utilizadas consistiam em fragmentos específicos virais contendo a região-alvo de qPCR para cada vírus, com diluição seriada na base 10 (10^7 - 10^0 GC/reação). As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram um *Cycle Threshold* (Ct) ≤ 38 . A quantificação viral foi obtida pela média da duplicata detectada, corrigindo para a metodologia e a diluição utilizadas (pura, 10^{-1} e 10^{-2}), e a carga viral expressa em número de cópias genômicas por 100 ml (GC 100 ml⁻¹).

Quadro 7: Iniciadores e sondas específicos utilizados para amplificação do material genético por PCR quantitativo (qPCR).

		Iniciadores/ Sondas	Sequências de nucleotídeos 5' 3'	Referências
HAdV	qPCR	AdF	CWTACATGCACATCKCSGG	Hernroth et al., 2002
		AdR	CRCGGGCRAAYTGCACCAG	
RVA	RT-qPCR	Sonda	HEX-CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCCT-BHQ1	Zeng et al., 2008
		NSP3F	ACCATCTWCACRTRACCCTCTATGAG	
		NSP3R	GGTCACATA ACGCCCCTATAGC	
PP7	RT-qPCR	Sonda	VIC-AGTTAAAAGCTAACACTGTCAAA-MGB	Rajal et al., 2007
		247F	GTTATGAACCAATGTGGCCGTTAT	
		320R	GGCGATGCCTCTGAAAAAAG	
		Sonda	FAM-TCGGTGGTCAACGAGGAACTGGAAC-TAMRA	

4.5.3 Caracterização molecular de HAdV e RVA

Todas as amostras do monitoramento de lixiviado de caminhão e de aterro sanitário foram submetidas ao PCR convencional (cPCR) para amplificação do material genético e posterior sequenciamento nucleotídico para caracterização molecular.

Para HAdV, realizou-se um PCR semi-nested da região de 245 pb do gene hexon parcial (ALLARD; ALBINSSON; WADELL, 2001). Para RVA, o cDNA foi utilizado para amplificação parcial da região de 379 pb do gene VP6 (ITURRIZA GÓMARA; WONG; BLOME; DESSELBERGER *et al.*, 2002). As sequências nucleotídicas dos iniciadores estão disponíveis no Quadro 8.

Quadro 8: Iniciadores e sondas específicos utilizados para amplificação do material genético por PCR convencional (cPCR).

		Iniciadores/ Sondas	Sequências de nucleotídeos 5' 3'	Referências
HAdV	cPCR	Hexdeg1	GCCSCARTGGKCWTACATGCACATC	Allard et al., 2001
		Hexdeg2	CAGCACSCCICGRATGTCAAA	
		Hexdeg1	GCCSCARTGGKCWTACATGCACATC	
		Hexdeg4	CCYACRGCCAGIGTRWAICGMRCYTTGTA	
RVA	RT-cPCR	VP6F	GACGGVGCRACTACATGGT	Iturriza Gómara et al., 2002
		VP6R	GTCCAATTCATNCTGGTGG	

Os produtos obtidos foram purificados do gel de agarose utilizando o kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, MI, EUA) e submetidas ao sequenciamento utilizando o kit comercial *Big Dye Terminator® v 3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

As sequências foram obtidas a partir do sequenciador automático de 48 capilares *ABI Prism 3730 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) do serviço da “Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ” e analisadas no programa *MEGA X®* para edição, análise de sequências e caracterização molecular (KUMAR; STECHER; LI; KNYAZ *et al.*, 2018).

4.5.4 Ensaio de infecciosidade de HAdV

Todas as amostras de monitoramento de vírus em lixiviados, independente do resultado de carga viral de HAdV, foram submetidas ao ensaio de infecciosidade de HAdV em cultura de células no *Laboratory of Hygiene and Environmental Virology*, na Universidade de Pisa, Itália, dentro dos objetivos do doutorado sanduíche (Edital PRINT-FIOCRUZ-CAPES).

A linhagem celular A549 de carcinoma epitelial de pulmão humano (ATCC CCL-185) foi utilizada para titulação viral em microplacas de poliestireno de 96 poços. Realizou-se uma diluição seriada de base 10 (10^{-1} a 10^{-4}) em Meio Mínimo Essencial de Eagle’s (MEM) suplementado com 10% de L-glutamina e 0,125% de gentamicina. Em seguida, cada diluição de amostra de lixiviado foi semeada em cinco poços, cada poço contendo 75 µl de amostra, 75 µl de MEM suplementado com 0,125% de gentamicina, 0,1% de tampão HEPES para estabilizar o pH e 50 µl de suspensão das células A549 (aproximadamente 10^6 células ml^{-1}). As placas foram cobertas e incubadas a 37 °C sob 5% de CO_2 por 5 dias.

A análise do efeito citopático foi realizada por microscopia de luz invertida. A maior diluição que produziu um efeito citopático em 50% das células inoculadas foi determinada pela fórmula de Spearman-Kärber (RAMAKRISHNAN, 2016) e os resultados expressos em 50% da dose infectante de cultura de tecido por mililitro (do inglês *tissue culture infective dose*) ($\text{TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$). O limite mínimo de detecção para esse ensaio de infecciosidade foi 101,12 $\text{TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DO LIXIVIADO DE RESÍDUOS SÓLIDOS

4.6.1 Parâmetros bacteriológicos

Coliformes totais e *E. coli* de lixiviado fresco de caminhão e de aterro sanitário foram quantificados utilizando o kit *Colilert® Quanti-Tray®/2000* (IDEXX Laboratories, Inc, Westbrook, ME, EUA), e os resultados expressos pelo Número Mais Provável por 100 ml (NMP 100 ml⁻¹). As amostras foram padronizadas previamente quanto à diluição seriada de base 10 para leitura. No lixiviado fresco de caminhão, estabeleceu-se a diluição de 10⁻⁹ a 10⁻¹³ e no lixiviado bruto de aterro sanitário, a diluição de 10⁻¹ a 10⁻³.

4.6.2 Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos para a caracterização do lixiviado fresco de caminhão e de aterro sanitário foram pH: [4500 H⁺ (B)], cor verdadeira e aparente [2120 (C)], turbidez [2130 (B)], alcalinidade total [2320 (B)], condutividade [2510 (B)], dureza total [2340 (C)] (APHA, 2017).

Quanto aos sólidos, foram analisados os sólidos totais [2540 (B)], sólidos dissolvidos totais [2540 (C)], sólidos suspensos totais [2540 (D)], sólidos fixos totais [2540 (F)] e sólidos voláteis totais [2540 (F)] (APHA, 2017).

Outro compostos analisados foram carbono total, orgânico e inorgânico [5310 (B)], demanda química de oxigênio (DQO) [5220 (D)], UV 254 nm [5910 (B)], cloreto [4500 Cl⁻ (B)], fósforo, adaptado de [4500 P(B), 4500 P(E)] e (CHEN; TORIBARA; WARNER, 1956), amônia [4500 NH₃ (D)], nitrogênio total [TOC-L CPH/CPN (Shimadzu)], nitrito [4500 NO₂⁻ (B)] e nitrato [4500 NO₃⁻ (B)] (APHA, 2017). Todas as análises foram realizadas de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2017).

4.7 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE RISCO MICROBIOLÓGICO (QMRA)

A Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico, do inglês *Quantitative Microbial Risk Assessment* (QMRA) dos trabalhadores de limpeza urbana foi realizada em colaboração com o *Laboratory of Hygiene and Environmental Virology*, na Universidade de Pisa, Itália, como parte dos objetivos do doutorado sanduíche (Edital PRINT-FIOCRUZ-CAPES).

A QMRA é o processo que utiliza a concentração de patógenos no ambiente e a quantidade de exposição a uma matriz ambiental (dose) como *inputs* e depois estima a probabilidade associada (risco) de um resultado adverso (infecção ou doença) como um *output*, utilizando funções matemáticas específicas do patógeno que descrevem a relação

dose-resposta. A QMRA envolve a descrição do cenário de exposição, a avaliação da exposição, o modelo de dose-resposta e a caracterização do risco (HAAS; ROSE; GERBA, 2014).

Para a construção dessa análise de risco, o HAdV foi utilizado como modelo, por ser um vírus disperso em diferentes matrizes ambientais e resistente no ambiente, sendo considerado um indicador viral de contaminação fecal humana (HEWITT; GREENING; LEONARD; LEWIS, 2013; VERANI; FEDERIGI; DONZELLI; CIONI *et al.*, 2019).

4.7.1 Descrição do cenário de exposição

Critério de inclusão: Trabalhadores da coleta de resíduos que atuam diretamente nos caminhões, envolvidos na coleta manual porta-a-porta e compactação dos resíduos no caminhão e expostos ao lixiviado fresco produzido durante a operação de compactação de resíduos.

Critério de exclusão: Motoristas, que não realizam a atividade de coleta, pois são responsáveis pela condução dos caminhões pelas ruas e até ao aterro, não sendo diretamente expostos. Os trabalhadores dos aterros sanitários também não são diretamente expostos ao lixiviado de aterro, uma vez que o lixiviado de aterro é drenado para uma central de captação e conduzido para a estação de tratamento de lixiviado de forma independente de contato humano (LANZARINI; MARINHO MATA; MENDES SAGGIORO; COSTA MOREIRA *et al.*, 2020).

Portanto, estabeleceu-se um modelo baseado no cenário de exposição ocupacional do trabalhador da coleta de resíduos ao lixiviado fresco de caminhão, que pode ser ingerido acidentalmente, em resultado da contaminação tanto do compartimento oral ou peri-oral.

Para essa avaliação, foi estabelecido o cenário de exposição em que os trabalhadores não utilizavam máscaras de proteção facial, como geralmente acontecia antes da pandemia da COVID-19, e utilizavam um tipo específico de luva para prevenção de acidentes com perfurocortantes, feita por uma mistura de fibras sintéticas e fibras naturais banhada em látex. Para investigar a análise de risco em um cenário de dificuldade na adesão ao uso de luvas, realizou-se em paralelo um cenário hipotético exclusivo para o contato mão-boca, onde os trabalhadores não utilizavam luvas.

4.7.2 Avaliação da exposição

Para estimar a dose, foi considerado o modelo conceitual compartimental desenvolvido pelo *Institute for Occupational Medicine* (CHERRIE; SEMPLE; CHRISTOPHER; SALEEM *et al.*, 2006; HSE, 2007) para a ingestão inadvertida de

substâncias químicas líquidas em ambientes ocupacionais, adaptada para o modelo para agentes biológicos e para o cenário de exposição específico.

A exposição oral dos trabalhadores de caminhões baseou-se em dois mecanismos possíveis para transferir o HAdV para a cavidade oral: contato das mãos contaminadas com a pele ao redor da boca (contato mão-boca) e contaminação direta do lixiviado de caminhão para a boca ou para a área peri-oral (via de respingos). Em ambos os casos, a concentração de HAdV (C_{HAdV}) foi derivada dos dados de monitoramento de lixiviado de caminhão, considerando os resultados expressos em $\text{TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$, porque representam a carga viral infecciosa.

Como o número de dados (#9 amostras) era pequeno para estabelecer uma distribuição teoricamente ajustada, criou-se uma distribuição empírica uniforme com um valor mínimo de $17 \text{ TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$ e um valor máximo de $667 \text{ TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$ com base no limite inferior e superior das análises experimentais, seguindo uma abordagem bem estabelecida na literatura de QMRA (RASHEDUZZAMAN; SINGH; HAAS; TOLOFARI *et al.*, 2019).

4.7.2.1 Ingestão pelo contato mão-boca

Os coletores de resíduos sólidos podem contaminar as luvas que estão utilizando ao tocar no lixiviado do caminhão acumulado na superfície do veículo, que foi assumido estar altamente poluído com uma carga de lixiviado de 1 gota por cm^2 ($LL_{\text{superfície}}$) (SHATKIN; SMITH; MOYER, 2005). Para estimar a dose de exposição, considerou-se a área de contato entre a mão e o compartimento oral ($SA_{\text{mão-boca}}$), a eficiência de transferência da superfície para as mãos ($TE_{\text{superfície/mão}}$) e das mãos para a boca ($TE_{\text{mão/boca}}$), e a frequência horária de contato mão-boca (f_{contato}), como reportado na Equação 1. Para entender o papel das luvas na dose ingerida, foram utilizados valores diferentes para $TE_{\text{superfície/mão}}$, $TE_{\text{mão/boca}}$ e f_{contato} , com base no uso de equipamento de proteção individual (EPI).

Trabalhadores sem luvas: Para a eficiência de transferência de HAdV das superfícies para as mãos sem luvas ($TE_{\text{superfície/mão}}$), foram utilizados dados experimentais sobre a transferência viral de superfícies rígidas não porosas para a mão em uma condição de alta umidade relativa do ar (uma característica típica do clima brasileiro), visto que a eficiência de transferência de microrganismos é intensificada sob uma umidade relativa alta de 40% a 65%, especialmente no caso de vírus (LOPEZ; GERBA; TAMIMI; KITAJIMA *et al.*, 2013).

Para a eficiência da transferência da mão para a boca ($TE_{\text{mão/boca}}$), foram utilizados dados de um estudo que analisou a transferência viral da mão sem luvas contaminada para a boca (RUSIN; MAXWELL; GERBA, 2002), estimada em 34%.

Para a f_{contato} , foi adotada a frequência de contato dos trabalhadores empregados em setores de manufatura e engenharia que realizam atividades manuais sem o uso de luvas (ZAINUDIN, 2004)

Trabalhadores com luvas: Para a eficiência de transferência de HAdV das superfícies para as mãos com luvas ($TE_{\text{superfície/mão}}$), foram utilizados dados da transferência viral de mãos com luvas de látex para uma superfície rígida não porosa contaminada com um inóculo úmido (SHARPS; KOTWAL; CANNON, 2012).

Para a eficiência da transferência da mão para a boca ($TE_{\text{mão/boca}}$), na ausência de estudos sobre $TE_{\text{mão/boca}}$ para mãos com luvas, os dados da eficiência de transferência sem luvas foram ajustados (RUSIN; MAXWELL; GERBA, 2002), utilizando dados sobre produção de alimentos, que demonstraram que luvas de látex são 10% menos eficientes na transferência viral do que mão sem luvas (TULADHAR; HAZELEGER; KOOPMANS; ZWIETERING *et al.*, 2013).

A f_{contato} foi muito baixa entre os trabalhadores que utilizavam luvas, com base no comportamento dos trabalhadores que manuseavam pesticidas e também nos laboratórios que manipulavam patógenos (CHERRIE; SEMPLE; CHRISTOPHER; SALEEM *et al.*, 2006; ZAINUDIN, 2004). Embora os coletores de resíduos sólidos possam ter um padrão comportamental de f_{contato} diferente, foi utilizada uma f_{contato} já descrita na literatura.

Além da adoção de EPI, a exposição de cada contato mão-boca foi considerada independente da duração do contato, como em outros estudos de QMRA que modelaram a exposição não-dietética a patógenos (MATTIOLI; DAVIS; BOEHM, 2015).

A dose de HAdV ingerida acidentalmente devido ao contato mão-boca foi calculada de acordo com a Equação 1:

$$\text{Dose}_{\text{mão-boca}} = C_{\text{HAdV}} * LL_{\text{superfície}} * TE_{\text{superfície/mão}} * SA_{\text{mão-boca}} * TE_{\text{mão/boca}} * f_{\text{contato}} * n_{\text{horas}}$$

(eq. 1)

onde a dose mão-boca é a dose de HAdV transferida para a cavidade oral como resultado do contato mão-boca durante um dia de trabalho [Número de HAdV em $TCID_{50}$] e cada variável de entrada é explicada no Quadro 9.

4.7.2.2 Ingestão oral pela via de respingos

Os trabalhadores podem ingerir o lixiviado de caminhão diretamente durante a operação de compactação de resíduos do veículo. O número de eventos de compactação durante um dia de trabalho rotineiro pode variar muito, porque a coleta de resíduos em áreas com alta densidade populacional em cidades pode implicar em dezenas de atividades de

compactação. Embora o botão de acionamento dos compactadores esteja na lateral do caminhão (para tentar minimizar acidentes durante a compactação), os trabalhadores ainda estão expostos a poeira e gotas do lixiviado de caminhão, que podem respingar para o compartimento oral e peri-oral dos trabalhadores de caminhões que se encontram perto do compactador (Comlurb, 2020 – Comunicação pessoal).

Assumiu-se que durante um dia de trabalho, um trabalhador pode ser exposto de 1 a 50 gotas, com base no julgamento profissional dos pesquisadores da área, visto que não há descrição de dados disponíveis na literatura, e após uma discussão com a COMLURB.

Assim, foi modelado o volume de exposição do lixiviado de caminhão ingerido acidentalmente através de respingos entre um mínimo de 0,01 ml e um máximo de 0,5 ml ($V_{\text{lixiviado}}$), uma vez que gotículas de 10 μl são consideradas partículas líquidas grandes de aerossol que podem se espalhar a uma distância curta de uma fonte (SATTAR; IJAZ; GERBA, 1987).

A dose de HAdV ingerida acidentalmente devido a respingos diretos na cavidade oral foi calculada de acordo com a Equação 2:

$$\text{Dose}_{\text{respingos}} = C_{\text{HAdV}} * V_{\text{lixiviado}}$$

(eq. 2)

onde a $\text{dose}_{\text{respingos}}$ é a dose de HAdV transferida para a cavidade oral como resultado da via de respingos durante um dia de trabalho [Número de HAdV em TCID₅₀] e cada variável de entrada é explicada no Quadro 9.

Quadro 9. Parâmetros de exposição usados no modelo de QMRA para a via de ingestão oral.

Variáveis de entrada	Descrição	Unidade de medida	Valores	Comentários e referências
Concentração de patógeno				
C_{HAdV}	Concentração de HAdV no lixiviado de caminhão medida por ensaio de infecciosidade	TCID ₅₀ ml ⁻¹	distribuição uniforme (min=17, máx = 667)	Dados de monitoramento de HAdV obtidos neste estudo.
Mecanismo de contaminação mão-boca				
$LL_{superfície}$	Carga de lixiviado na superfície de caminhões	ml por cm ²	0,04	Suposição ou cenário deste estudo, considerando um veículo altamente contaminado com uma gota de líquido (0,04 ml, Shatkin et al. 2005) para cada cm ² da superfície do caminhão.
$TE_{superfície/mão}$	Eficiência de transferência de HAdV da superfície para as mãos sem luvas	%	distribuição normal ($\mu = 37\%$, SD = 16%)	Dados da eficiência de transferência da superfície para a mão: colifago MS-2 inoculado em aço inoxidável em condição de alta umidade relativa do ar (Lopez et al. 2013).
	Eficiência de transferência de HAdV da superfície para as mãos com luvas	%	distribuição normal ($\mu = 14\%$, SD = 4%)	Dados da eficiência de transferência de superfície para mão: norovírus humano GII.4 entre superfícies não porosas (aço inoxidável) e mão com luvas de látex. O procedimento foi realizado em condição úmida, sem esperar a secagem do inóculo (Sharps, Kotwal e Cannon 2012).
$SA_{mão-boca}$	Área de contato da pele entre a mão e o compartimento perioral para cada evento de exposição	cm ²	10	Dados de avaliação da exposição em trabalhadores com chumbo e pesticidas, considerando que a superfície das mãos que leva à ingestão de lixiviado é de 5% da superfície palmar (Cherrie et al. 2006; Wilson et al., 2012).
	Eficiência de transferência de HAdV das mãos para a boca	%	34	Dados de eficiência da transferência da mão para a boca – colifago PRD-1 (Rusin et al. 2002).
$TE_{mão/boca}$	Eficiência de transferência de HAdV das mãos com luvas para a boca	%	24	Dados sobre transferência viral da mão sem luvas para a boca (Rusin, Maxwell e Gerba 2002), corrigido por um fator de 10% de acordo com estudos de laboratório sobre preparação manual de alimentos (Tuladhar et al. 2013; Rönnqvist et al. 2014).
	Frequência de contato mão-boca	eventos/hora	distribuição uniforme (min = 0, máx = 3)	Dados comportamentais baseados em trabalhadores de manufatura e engenharia que não utilizam luvas (ZAINUDIN, 2004).
$f_{contato}$	Frequência de contato mão-boca com luvas	eventos/hora	distribuição uniforme (min = 0, máx = 1).	Dados comportamentais sobre trabalhadores utilizando luvas (trabalhadores de laboratório e pesticidas) (Zainudin 2004, Cherrie et al, 2006).
	n_{horas}	Número de horas coletando resíduos sólidos	horas	8
Mecanismo de contaminação por respingos				
$V_{lixiviado}$	Volume de lixiviado do caminhão ingerido acidentalmente durante um dia de trabalho	ml	distribuição uniforme (min=0,01,máx= 0,5)	Suposição deste estudo com base no julgamento profissional e discussão com a Empresa de Resíduos

4.7.3 Modelo de dose-resposta

Utilizou-se um modelo de dose-resposta que apresenta a doença gastrointestinal como desfecho. Em particular, foi escolhida a equação dose-resposta hipergeométrica desenvolvida por Teunis e colaboradores (2016) (TEUNIS; SCHIJVEN; RUTJES, 2016), com valores de parâmetros do modelo otimizados para ingestão, obtidos a partir de ensaios clínicos de inoculação de suspensões virais de adenovírus (AdV4, AdV7) via ingestão oral. A probabilidade de infecção (P_{inf}) foi calculada pela seguinte fórmula, que utiliza um modelo Beta-Poisson:

$$P_{\text{inf}}(\text{dose}; \alpha, \beta) = 1 - {}_1F_1(\alpha, \alpha + \beta, -\text{dose}),$$

onde $\alpha = 5.11$, $\beta = 2.80$ e ${}_1F_1$ representa a função hipergeométrica confluyente do primeiro tipo.

Em seguida, a probabilidade de doença ($P_{\text{doença}}$) para cada patógeno foi estimada multiplicando o P_{inf} e a patogenicidade, que representa a probabilidade de desenvolver a doença diante da infecção, calculada pela fórmula de acordo com Teunis (2016):

$$P_{\text{doença}|\text{inf}}(\text{dose} | \eta, r) = 1 - (1 + \text{dose}/\eta)^{-r},$$

onde $\eta = 6.53$, $r = 0,41$.

4.7.4 Caracterização do risco

A análise de Monte Carlo foi executada para 200 simulações, cada uma com 10.000 interações (pacote *Vensim*, Ventana Systems, Inc., Harvard, MA, EUA). O resultado final da análise de Monte Carlo pode ser visto como a probabilidade diária de doença com base em 200 medidas para aumentar a precisão de risco à saúde.

A análise de sensibilidade foi realizada para testar a importância relativa das variáveis estocásticas no resultado dos modelos: C_{HAdV} , f_{contato} , $TE_{\text{superfície/mão}}$ para o modelo de mecanismo mão-a-boca e C_{HAdV} e $V_{\text{lixiviado}}$ para o modelo de mecanismo de respingos. Para determinar o efeito dessas variáveis na estimativa final de risco, seu valor foi variado, um de cada vez, dentro da faixa de variabilidade daquele parâmetro, enquanto mantinha cada um dos outros parâmetros de entrada constantes (para variáveis de estimativa pontual no modelo mão-boca) ou fixados em seu valor médio de sua própria função de distribuição de probabilidade.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPad Prism* versão 8.0.1. Os dados virológicos e bacteriológicos foram transformados em logaritmo antes da análise estatística, utilizando a média geométrica nas análises. As concentrações microbiológicas foram expressas em valores mínimos e máximos nas tabelas. Amostras abaixo do limite de detecção receberam o valor da metade deste limite (BUCARDO; LINDGREN; SVENSSON; NORDGREN, 2011).

O teste t-pareado foi utilizado para comparar as *reads* sequenciadas por metagenoma viral entre o lixiviado de caminhão e de aterro sanitário.

O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar os métodos de detecção de HAdV e o teste-t não pareado para comparar as concentrações de HAdV, coliformes totais e *E. coli* entre o lixiviado do caminhão e do aterro.

A correlação de *Spearman* e a análise de regressão foram realizadas para investigar a correlação entre a infecciosidade do HAdV, qPCR e PMA-qPCR, e entre RV qPCR e PMA-qPCR. Coeficientes de correlação (R^2) entre 0,8-1,0; 0,5-0,8; 0,3-0,5 e <0,3 foram considerados como correlações fortes, moderadas, baixas e não significativas, respectivamente (HEWITT; GREENING; LEONARD; LEWIS, 2013).

O teste de Mann-Whitney foi usado para comparar os dados físico-químicos entre o lixiviado do caminhão e do aterro.

Os resultados foram considerados significativos quando os valores de P estavam abaixo de 0,05.

Para entender o papel dos parâmetros físico-químicos nas concentrações microbiológicas, um modelo de regressão múltipla foi desenvolvido utilizando cada parâmetro microbiológico (coliforme total, *E. coli*, HAdV - mensurados por diferentes métodos analíticos), um de cada vez, como a variável dependente e os parâmetros físico-químicos como preditores (variáveis independentes).

Os parâmetros físico-químicos foram examinados quanto à colinearidade com base na correlação r de *Pearson* e aqueles que apresentavam baixa colinearidade entre si ($-0,5 < r < 0,5$) foram selecionados como preditores nas análises de regressão múltipla (ZUUR; IENO; ELPHICK, 2010). Finalmente, o modelo foi simplificado utilizando o *Akaike Information Criterion* (AIC) (FOX; WEISBERG, 2011) e a análise foi realizada no programa R utilizando os pacotes *car* e *effects* (TEAM, 2018).

5. RESULTADOS

5.1 ESTUDO PILOTO

5.1.1 Avaliação de metodologias de recuperação viral

Para se estabelecer uma metodologia de concentração viral, avaliou-se a taxa de sucesso e a eficiência de recuperação nas três amostras de lixiviado de aterro sanitário de HAdV e do controle interno de processo, o bacteriófago PP7. A taxa de sucesso foi de 100% para todas as análises. A eficiência de recuperação variou de 2,56 a 977,39% para o HAdV e de 0,012% a 523,97% para o bacteriófago PP7 (Tabela 1).

Comparando ambas as concentrações, independente da metodologia de extração utilizada, na da floculação orgânica, as amostras foram positivas apenas nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} , mas não em amostras puras. Além disso, também apresentaram valores médios para a recuperação PP7 inferiores a 1,0% (0,01-0,61%), independentemente do método de extração.

Já na metodologia de ultracentrifugação utilizando o *QIAamp Fast DNA Stool mini*[®], as amostras foram positivas em amostras puras, 10^{-1} e 10^{-2} , e resultaram em valores médios de eficiência de recuperação superiores a 100% para HAdV (346,18%) e PP7 (523,97%).

A ultracentrifugação associada ao *QIAamp Fast DNA Stool mini*[®] foi estabelecida como a metodologia para detecção de vírus em lixiviados. Os lixiviados de caminhão não foram analisados.

Tabela 1: Taxa de sucesso e eficiência de recuperação de adenovírus humano (HAdV) e bacteriófago PP7 por PCR quantitativo (qPCR), de acordo com a concentração viral e os métodos de extração de ácidos nucleicos.

Método de concentração viral	Extração de ácidos nucleicos	Taxa de sucesso	Eficiência de recuperação de HAdV (min-máx) (%)	Eficiência de recuperação de PP7 (min-máx) (%)
Ultracentrifugação	<i>QIAamp Fast DNA Stool mini kit</i> [®]	100%	346,18 (178,07-645,66)	523,97 (396,30-713,48)
	<i>QIAamp viral RNA mini kit</i> [®]	100%	2,56 (0,14-4,33)	0,60 (0,21-1,31)
Floculação orgânica	<i>QIAamp Fast DNA Stool mini kit</i> [®]	100%	162,64 (99,64-274,93)	0,61 (0,080-1,661)
	<i>QIAamp viral RNA mini kit</i> [®]	100%	977,39 (569,94-1631,47)	0,01 (0,00-0,03)

O limite de detecção foi a maior detecção em CG da amostra no qPCR com carga positiva. Tanto HAdV quanto PP7 apresentaram o maior limite de detecção utilizando o *QIAamp Fast DNA Stool mini kit*[®]. Para HAdV, os limites de detecção e Ct foram, respectivamente 37,02 CG/37,00, e para o bacteriófago PP7, 2,75 CG/ 39,85.

Tabela 2: Limite de detecção de adenovírus humano (HAdV) e bacteriófago PP7 por PCR quantitativo (qPCR), de acordo com a ultracentrifugação e extração de ácidos nucleicos.

Método de concentração viral	Extração de ácidos nucleicos	Limite de detecção HAdV / Ct	Limite de detecção PP7 Ct
Ultracentrifugação	<i>QIAamp Fast DNA Stool mini kit</i> [®]	37,02 CG/37,00	2,75 CG/ 39,85
	<i>QIAamp viral RNA mini kit</i> [®]	181,62 CG/34,70	30,86 CG/ 35,06

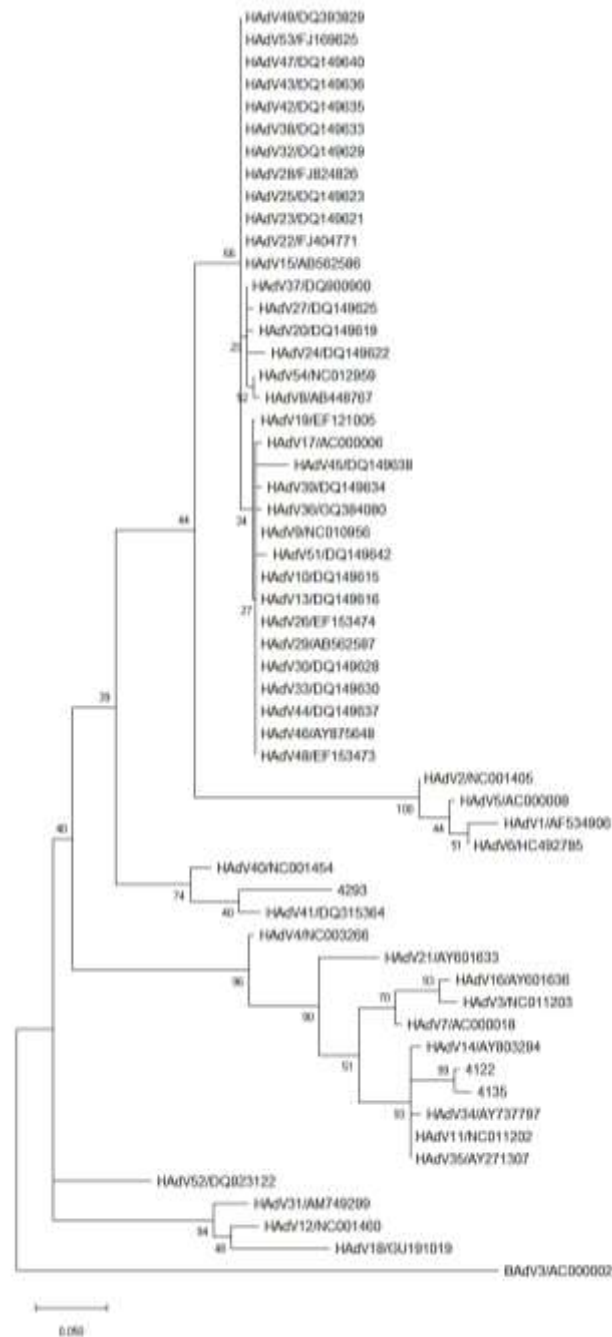
5.1.2 Ocorrência de vírus em lixiviado

A metodologia que associa a ultracentrifugação e o *QIAamp Fast DNA Stool mini kit*[®] foi escolhida para investigar a ocorrência de HAdV em amostras de lixiviado de aterro sanitário. Detectou-se HAdV em amostras de aterro sanitário não diluídas e diluídas (10^{-1} e 10^{-2}) por qPCR nas três amostras analisadas, com uma média de $3,44 \times 10^6 \pm 1,56 \times 10^6$ GC ml⁻¹. O PP7 foi recuperado com sucesso em todas as amostras com uma eficiência de recuperação média de 22,83% (2,40–64,28%).

A caracterização molecular foi realizada com o fragmento de 245 pb do gene hexon (Figura 13), alinhadas com 54 sequências de protótipos de referência do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) representando diferentes espécies de HAdV (ICTV, 2011). O método utilizado foi o *Maximum Likelihood*, com o modelo *Tamura 3 parameters* e *Gamma distribution (G)* com 2.000 *bootstraps*. Todas as sequências obtidas no estudo foram depositadas na NCBI (base de dados GenBank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) com os seguintes números de acesso: 4122 (MT005183); 4135 (MT005184); 4293 (MT005185).

A sequência nucleotídica revelou a ocorrência HAdV espécie B, que representa os adenovírus respiratórios (HAdV11, HAdV14, HAdV34 e HAdV35) e espécie F, relacionados com adenovírus de transmissão fecal-oral (HAdV-41) (Figura 13).

Figura 13: Dendrograma contendo as três seqüências de 245 pb do gene hexon do adenovírus humano (HAdV) (4122, 4135 e 4293) com as 54 seqüências de protótipos do ICTV (ICTV, 2011).



A escala na base do dendrograma indica a distância. O método utilizado foi o *Maximum Likelihood*, com o modelo *Tamura 3 parameters* e *Gamma distribution* (G) com 2.000 *bootstraps*. A amostra 4122 e 4135 agruparam com HAdV espécie B (HAdV-11, 14, 34 e 35), e a amostra 4293 agrupou com HAdV espécie F (HAdV-41).

5.1.3 Parâmetros bacteriológicos e físico-químicos

Em relação aos parâmetros bacteriológicos, a concentração média de todas as amostras de lixiviado foi de $8,32 \times 10^3$ NMP 100 ml⁻¹ e $1,6 \times 10^3$ NMP 100 ml⁻¹ para coliformes totais e *E. coli*, respectivamente.

Os resultados dos parâmetros físico-químicos das amostras utilizadas tanto na inoculação experimental quanto nas amostras analisadas para a ocorrência de vírus em lixiviados demonstrou um pH que variou de 7,91 a 8,18, com alta concentração de sólidos, cor, alcalinidade, cloreto, UV 254 e nitrogênio amoniacal total (Tabela 3). Algumas concentrações de nitrato/nitrito não puderam ser quantificadas devido ao limite de detecção do método utilizado.

Tabela 3: Valores médios de caracterização físico-química de seis amostras de lixiviado coletadas em um aterro sanitário localizado no Rio de Janeiro.

Parâmetros físico-químicos	Amostras de lixiviado utilizadas nos ensaios de recuperação viral (N=3)		Amostras de lixiviado utilizadas nos ensaios de ocorrência viral (N=3)	
	Média	Min-Max	Média	Min-Max
	pH	7,91	(7,41-8,53)	8,18
Cor verdadeira (mg Pt-Co L ⁻¹)	8350	(6300-9650)	8487	(6850-10560)
Cor aparente (mg Pt-Co L ⁻¹)	13083	(10000-18300)	9147	(7450-11640)
Turbidez (NTU)	280	(41-622)	318	(153-447)
Alcalinidade (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	10695	(9340-11690)	11539	(8820-13578)
Condutividade (ms cm ⁻¹)	19,83	(13,66-25,5)	16,26	(15,94-16,61)
Dureza total (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	1367	(1002-1733)	717	(550-900)
Sólidos totais (mg L ⁻¹)	14251	(11770-16618)	15373	(4331-28388)
Sólidos dissolvidos totais (mg L ⁻¹)	13715	(11380-16248)	6135	(1916-12464)
Sólidos suspensos totais (mg L ⁻¹)	536	(370-848)	508	(320-766)
Sólidos fixos totais (mg L ⁻¹)	10143	(9416-10869)	7260	(1318-10570)
Sólidos voláteis totais (mg L ⁻¹)	4108	(2354-5749)	2286	(659-4150)
Carbono orgânico dissolvido (mg O ₂ L ⁻¹)	3099	(1310-5538)	1887	(1642-2132)
Demanda química de oxigênio (mg O ₂ L ⁻¹)	7609	(3212-10636)	8051	(6062-10470)
UV 254 nm	3922	(3844-4000)	4345	(3924-5815)
Cloreto (mg Cl L ⁻¹)	4113	(3913-4465)	3680	(2959-4253)
Fósforo (mg P L ⁻¹)	1,05	(0,30-1,08)	3,18	(1,04-7,26)
Nitrogênio amoniacal total (mg N-NH ₃ L ⁻¹)	2455	(1727-3239)	5507	(572-9529)
Nitrato (mg N-NO ₃ ⁻ L ⁻¹)	*	*	1,19	(0,74-1,93)
Nitrito (mg N-NO ₂ ⁻ L ⁻¹)	*	*	0,27	(0,25-0,30)

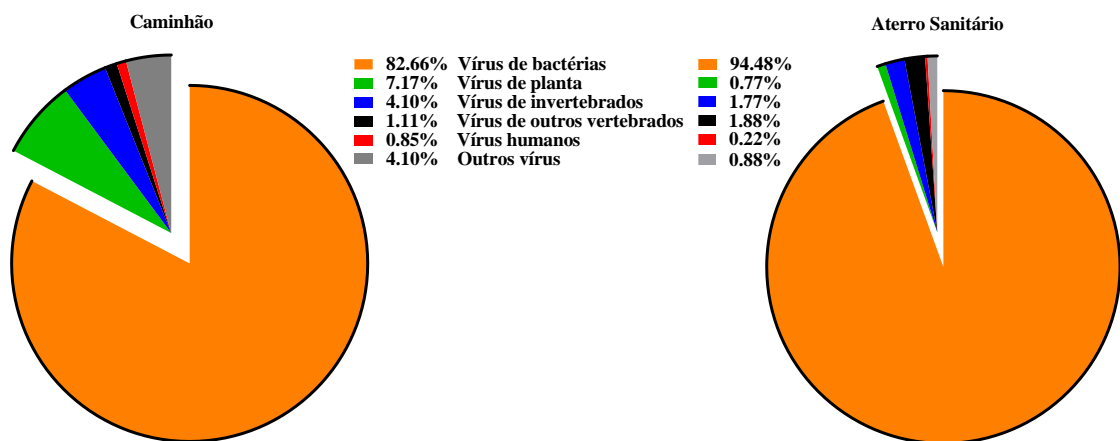
*abaixo do limite de detecção.

5.2 MONITORAMENTO DE VÍRUS EM LIXIVIADO

5.2.1 Diversidade genética viral

Os resultados de análise da metagenômica viral do lixiviado fresco de caminhão e do aterro sanitário demonstraram a predominância de bacteriófagos que infectam bactérias patogênicas, ou que habitam o trato gastrointestinal ou o ambiente, seguidas dos vírus de plantas, invertebrados, de outros vertebrados e de vírus humanos, em diferentes proporções de acordo com o tipo de lixiviado (Figura 14).

Figura 14: Proporção de vírus presentes em lixiviado de resíduos sólidos proveniente de caminhão e de aterro sanitário.

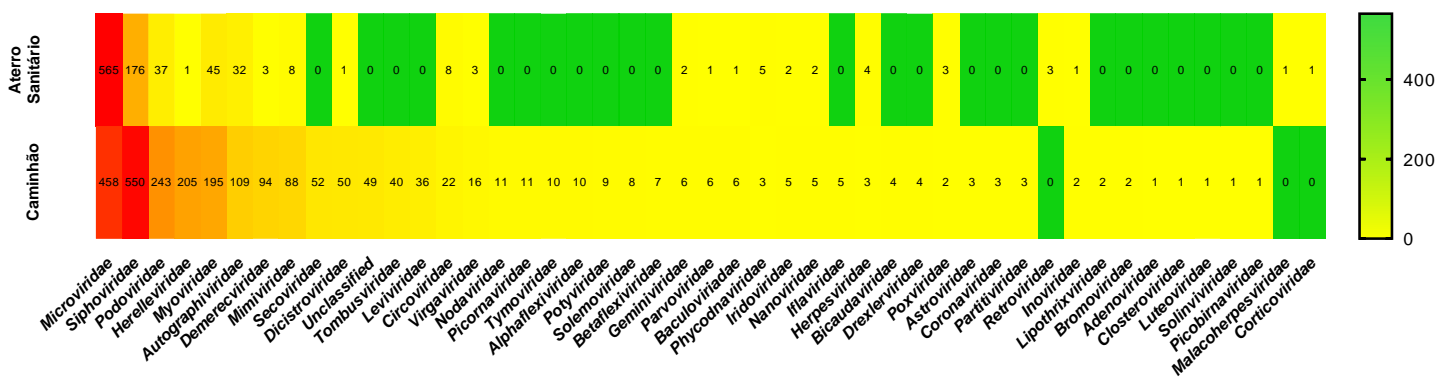


A diversidade de famílias virais e a intensidade das *reads* (maior abundância relativa) sequenciadas foi comparada entre os dois tipos de lixiviados, de acordo com as famílias virais sequenciadas (Figura 15). Pode-se observar uma maior diversidade de famílias virais e de intensidade das *reads* no lixiviado de caminhão, quando comparado com o lixiviado de aterro.

A comparação dos resultados obtidos nos dois tipos de lixiviados revelou a diversidade de famílias virais e de intensidade das *reads* com significância estatística entre as amostras de lixiviado de caminhão e lixiviado de aterro sanitário. Após normalização dos resultados de abundância viral (transformados em porcentagem), as médias foram comparadas e observou-se uma diferença significativa entre as porcentagens detectadas no lixiviado de caminhão quando comparadas com o aterro sanitário ($p = 0,0055$), reforçando a diferença virológica entre os dois tipos de lixiviados (Figura 15).

O bacteriófago mais prevalente foi o *Bdellovibrio phage phiMH2K*, descrito por infectar a bactéria *Bdellovibrio bacteriovorus*, uma proteobactéria não enterobacteriana com um ciclo de vida parasitário intracelular obrigatório. Outros bacteriófagos predominantes foram o *Chlamydia virus Chp1* e o *Lactococcus virus skl*.

Figura 15: Mapa de calor da diversidade genética viral do lixiviado de caminhão e de aterro sanitário.



Cada célula contém o número de sequências obtidas. O eixo horizontal representa a classificação das 46 famílias virais e *reads* não classificadas. A intensidade de calor, demonstrada na coluna da direita, variou de verde (não detectado) ao vermelho (maior abundância relativa).

O lixiviado de caminhão foi comparado com o lixiviado de aterro quanto à presença ou não de envelope viral e o tipo de ácido nucleico (DNA ou RNA), para os grupos de vírus de outros vertebrados (Tabela 4) e vírus humanos (Tabela 5). No lixiviado de caminhão, observou-se uma maior diversidade de espécies virais, com a detecção de material genético de vírus de DNA e de RNA, enquanto no lixiviado de aterro a predominância foi de vírus de DNA. Quanto ao envelope, observou-se a presença ou ausência de envelope para os dois tipos de lixiviados.

Alguns genomas de vírus humanos de transmissão fecal-oral foram sequenciados, como astrovírus, e alguns vírus da família *Picornaviridae*, como por exemplo o enterovírus humano D68, coxsackievírus, aichi vírus e vírus da hepatite A. Representando os adenovírus, detectou-se o adenovírus aviário (Tabelas 4 e 5). Não foram detectados vírus que infectam humanos no lixiviado de aterro sanitário (Tabela 5).

Tabela 4: Vírus de vertebrados presentes no lixiviado de caminhão e de aterro sanitário e caracterização quanto à presença de envelope viral e tipo de ácido nucleico.

Tipo de lixiviado	Família	Gênero/Espécie	Envelope viral	Ácido Nucleico
Caminhão		<i>Circovirus/</i> Circovírus de porco 2		
	<i>Circoviridae</i>	<i>Circovirus/</i> Circovírus de ganso	Não	DNA
		<i>Aviadenovirus/</i> Adenovírus aviário 8		
	<i>Picornaviridae</i>	<i>Tremovirus/</i> Vírus da encefalomielite aviária	Não	RNA
	<i>Coronaviridae</i>	<i>Alphacoronavirus/</i> Coronavírus felino	Sim	RNA
Caminhão e Aterro		<i>Circovirus/</i> Circovírus de pombo		
		<i>Circovirus/</i> Circovírus de porco 1		
	<i>Circoviridae</i>	<i>Circovirus/</i> Circovírus de canário	Não	DNA
		<i>Circovirus/</i> Vírus da doença do bico e das penas		
	<i>Poxviridae</i>	<i>Suipoxvirus/</i> Vírus Suinepox		
	<i>Herpesviridae</i>	<i>Rhadinovirus/</i> Herpesvírus ateles	Sim	DNA
		<i>Mardivirus/</i> Gallid herpesvírus 2		
		<i>Rhadinovirus/</i> Herpesvírus de saimiri 2		
Aterro	<i>Poxviridae</i>	<i>Orthopoxvirus/</i> Vírus camelpox	Sim	DNA
	<i>Retroviridae</i>	<i>Lentivirus/</i> Vírus da imunodeficiência felina	Sim	RNA

Tabela 5: Vírus humanos presentes no lixiviado de caminhão e de aterro sanitário e caracterização quanto à presença de envelope viral e tipo de ácido nucleico.

Tipo de lixiviado	Família	Gênero/Espécie	Envelope Viral	Ácido Nucleico
Caminhão	<i>Herpesviridae</i>	<i>Varicellovirus/</i> Vírus da varicella-zoster	Sim	DNA
		<i>Enterovirus/</i> Enterovírus humano D68		
		<i>Enterovirus/</i> Coxsackievirus B3		
		<i>Enterovirus/</i> Coxsackievirus B4		
		<i>Enterovirus/</i> Rinovírus humano A		
		<i>Kobuvirus/</i> Aichi vírus		
	<i>Picornaviridae</i>	<i>Hepatovirus/</i> Vírus da hepatite A		
		<i>Parechovirus/</i> Parechovirus humano 5	Não	RNA
		<i>Cosavirus/</i> Cosavirus A		
		<i>Cardiovirus/</i> Vírus saffold		
	<i>Picobirnaviridae</i>	<i>Cardiovirus/</i> Vírus da encefalomiocardite		
		<i>Picobirnavirus/</i> Picobirnavirus humano		
	<i>Astroviridae</i>	<i>Mamastrovirus/</i> Astrovírus humano 1		
<i>Mamastrovirus/</i> Astrovírus humano 8				
Caminhão e Aterro	<i>Circoviridae</i>	<i>Cyclovirus/</i> Ciclovírus humano associado 1	Não	DNA

Como a sensibilidade da metodologia de sequenciamento do metagenoma viral não permitiu detectar o HAdV e RVA, realizou-se a pesquisa específica desses vírus por PCR em Tempo Real, PCR convencional e sequenciamento parcial.

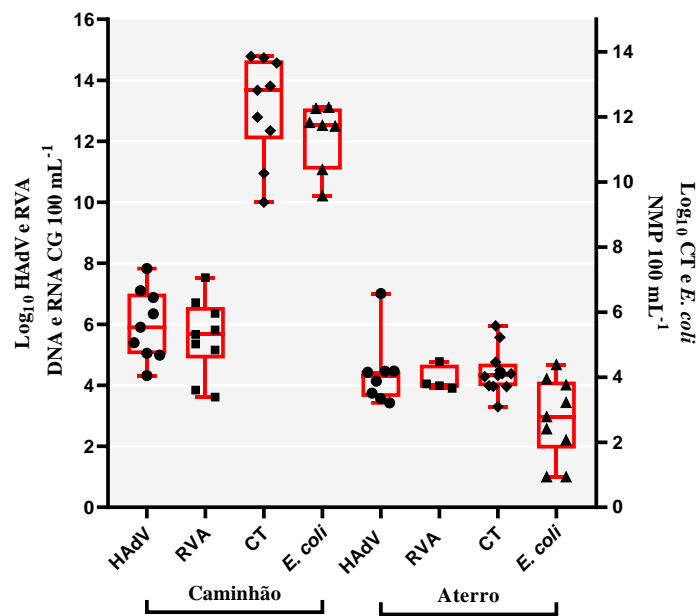
5.2.2 Quantificação de HAdV, RVA e parâmetros bacteriológicos

A distribuição de HAdV, RVA, coliformes e *E. coli* nas diferentes amostras de lixiviados está demonstrada na Figura 16. O HAdV foi detectado por qPCR em 100% (9/9) amostras de lixiviado de caminhão, em todas as diluições de qPCR (não diluído e diluído 10^{-1} e 10^{-2}), sem inibição, e em 77% (10/13) das amostras de lixiviado de aterro.

O RVA foi detectado por qPCR em 100% (9/9) amostras de lixiviado de caminhão, em todas as diluições de qPCR (não diluído e diluído 10^{-1} e 10^{-2}), sem inibição e em 30,7 % (4/13) de lixiviado de aterro. Os valores mínimos e máximos estão expressos na Tabela 6.

A análise estatística da concentração de HAdV, coliformes totais e *E. coli* de lixiviado de caminhão, quando comparados com o lixiviado de aterro, indicam uma diferença com significância estatística, apresentando uma concentração maior de HAdV ($p < 0,05$), coliformes totais e *E. coli* no lixiviado de caminhão ($p < 0,001$). RVA apresentou diferença, mas não foram estatisticamente significativas ($p = 0,06$).

Figura 16: Distribuição de adenovírus humano (HAdV), rotavírus espécie A (RVA); coliformes totais e *Escherichia coli*.



Distribuição de adenovírus humano (HAdV) e rotavírus espécie A (RVA) em cópias genômicas por 100 ml (CG 100 ml⁻¹); coliformes totais (CT) e *Escherichia coli* (*E. coli*) em Número Mais Provável por 100 ml (NMP 100 ml⁻¹) em lixiviado de caminhão e de aterro sanitário.

Tabela 6: Valores mínimos e máximos do PCR quantitativo de adenovírus humano (HAdV), rotavírus espécie A (RVA), coliformes totais e *Escherichia coli* em lixiviado de caminhão e aterro sanitário.

	Mínimo - Máximo	
	Caminhão	Aterro Sanitário
	CG 100 ml⁻¹	
qPCR HAdV	2,07×10 ⁴ – 6,68×10 ⁷	8,31×10 ¹ – 1,02×10 ⁷
RT-qPCR RVA	4,11×10 ³ – 3,39×10 ⁷	7,86×10 ³ – 6,01×10 ⁴
	NMP 100 ml⁻¹	
Coliformes totais	1,00×10 ¹⁰ – 6,05×10 ¹⁴	1,96×10 ³ – 8,95×10 ⁵
<i>Escherichia coli</i>	1,64×10 ¹⁰ – 1,30×10 ¹³	1,01×10 ¹ – 4,75×10 ⁴

5.2.3 Avaliação de integridade do capsídeo de RVA

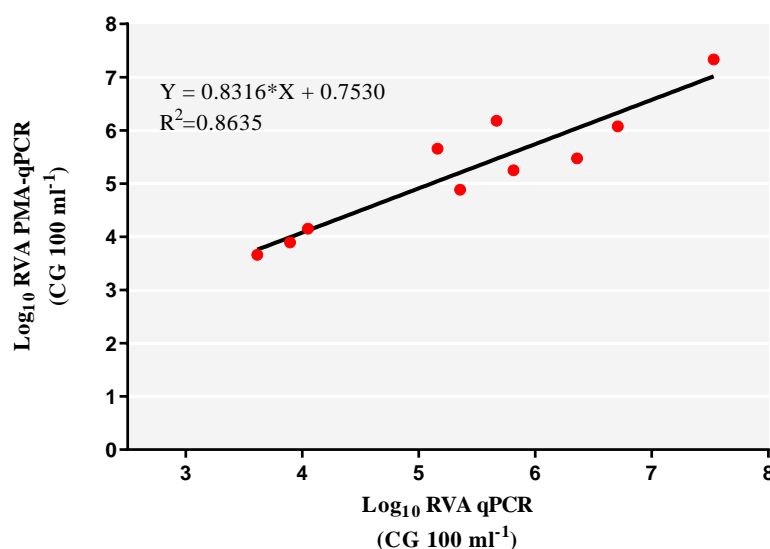
Na proporção de amostras positivas por RT-qPCR para RVA, a detecção foi diferente com base na matriz de lixiviado. O RVA foi detectado em 100% (9/9) no lixiviado de caminhão (qPCR) e 88,9% (8/9) (PMA-qPCR). Já no lixiviado do aterro, em 30,7% (4/13) sem PMA e 15,40% (2/13) com PMA. Não foram observadas diferenças nas médias entre a quantificação sem PMA e com PMA, independente da matriz ambiental ($p > 0,05$), mas foram observadas diferenças na detecção, diferente do observado para HAdV. Os valores mínimos e máximos estão expressos na Tabela 7.

Tabela 7: Valores mínimos e máximos do RT-PCR quantitativo (sem e com PMA) de rotavírus espécie A (RVA) no lixiviado de caminhão e de aterro sanitário.

RVA	Mínimo – Máximo (CG 100 ml ⁻¹)	
	Caminhão	Aterro
RT-qPCR	$4,11 \times 10^3 - 3,39 \times 10^7$	$7,86 \times 10^3 - 6,01 \times 10^4$
PMA RT-qPCR	$4,57 \times 10^3 - 2,15 \times 10^7$	$7,83 \times 10^3 - 1,42 \times 10^4$

Considerando os diferentes lixiviados analisados em conjunto, observou-se uma correlação significativa (correlação de Spearman, $p < 0,05$) entre os diferentes métodos de detecção do RT-qPCR RVA (qPCR e PMA-qPCR), com uma regressão linear forte ($R^2 = 0,8635$) (Figura 17).

Figura 17: Análise de regressão entre dois métodos de detecção de rotavírus espécie A (RVA).



Comparação do RT-qPCR [RVA sem propídio monoazida (PMA)] e o ensaio de integridade do capsídeo por qPCR (RVA com PMA).

5.2.4 Comparação entre métodos de detecção de HAdV

A frequência de amostras positivas para HAdV apresentou resultados diferentes com base na matriz de lixiviado e no método de detecção: as amostras de lixiviado de caminhão apresentaram 100% de positividade para HAdV independentemente do método de detecção (Tabela 8). Já as amostras de lixiviado de aterro sanitário apresentaram 92% (12/13), 85% (11/13), 77% (10/13), e 46% (6/13) de positividade para o qPCR no semi-nested, qPCR, PMA-qPCR e para o ensaio de infecciosidade, respectivamente.

Quanto à detecção, não houve diferença estatisticamente significativa entre a o ensaio de infecciosidade com qPCR e PMA-qPCR em lixiviado de aterro. Porém, o PCR semi-nested apresentou diferença significativa quando comparado ao ensaio de infecciosidade ($p = 0,03$).

O ensaio de infecciosidade de HAdV indicou um TCID₅₀ de $2,00 \times 10^3 - 7,00 \times 10^4$ e $2,00 \times 10^3 - 1,00 \times 10^4$ CG 100 ml⁻¹ para o lixiviado de caminhão e de aterro sanitário, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas nas amostras tratadas ou não com PMA ($p > 0,05$).

Tabela 8: Valores mínimos e máximos do PCR quantitativo (qPCR e PMA-qPCR) de adenovírus humano (HAdV) e do ensaio de infecciosidade no lixiviado de caminhão e de aterro sanitário.

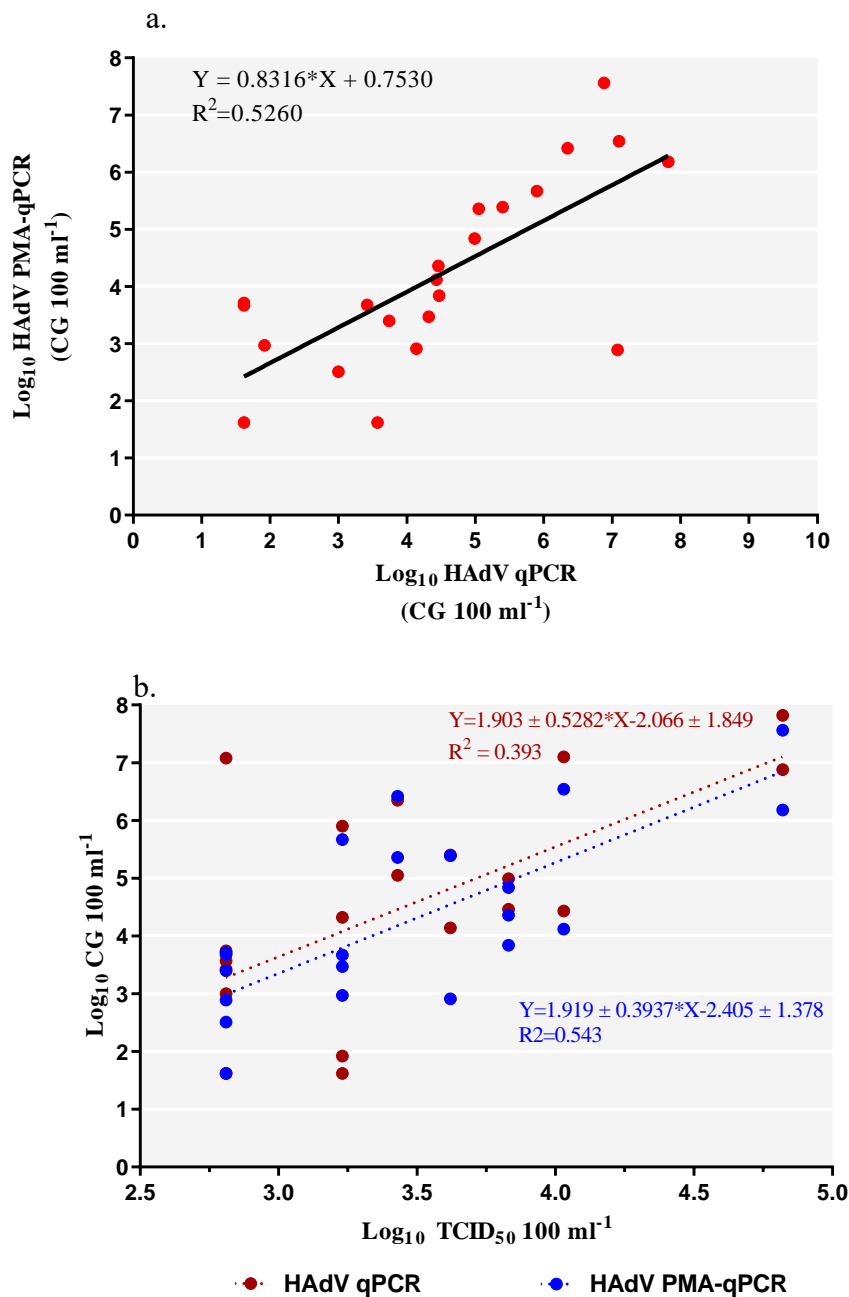
Método de detecção de HAdV	Tipo de lixiviado Nº de positivos (%)		Mínimo – Máximo (CG* ou TCID ₅₀ ** 100 ml ⁻¹)	
	Caminhão (n=9)	Aterro (n=13)	Caminhão	Aterro
Semi-nested-PCR	9 (100)	12 (92)	-	-
qPCR*	9 (100)	11 (85)	$2,07 \times 10^4 - 6,68 \times 10^7$	$8,31 \times 10^1 - 1,02 \times 10^7$
PMA-qPCR*	9 (100)	10 (77)	$3,25 \times 10^3 - 4,06 \times 10^7$	$4,00 \times 10^2 - 2,53 \times 10^4$
Infecciosidade de HAdV**	9 (100)	6 (46)	$1,70 \times 10^3 - 6,67 \times 10^4$	$1,70 \times 10^3 - 1,06 \times 10^4$

Quando os tipos de lixiviados foram considerados separadamente, observou-se uma correlação moderada ($R^2 = 0,681$, correlação de Spearman, $p < 0,05$), entre a detecção de HAdV por qPCR e o por PMA-qPCR em lixiviado de caminhão e também entre o ensaio de infecciosidade e o PMA-qPCR em aterro sanitário ($R^2 = 0,681$, correlação de Spearman, $p < 0,05$) (gráficos não demonstrados).

A correlação moderada entre a detecção de HAdV por qPCR e PMA-qPCR se manteve, quando considerado todos os dados (22 amostras) ($R^2 = 0,526$, correlação de Spearman, $p < 0,001$).

Com esta análise conjunta, também se observou uma correlação moderada ($R^2 = 0,543$) entre infecciosidade e PMA-qPCR e fraca ($R^2 = 0,393$) entre infecciosidade e qPCR (Figura 18).

Figura 18: Análise de regressão entre diferentes métodos de detecção de adenovírus humano (HAdV).



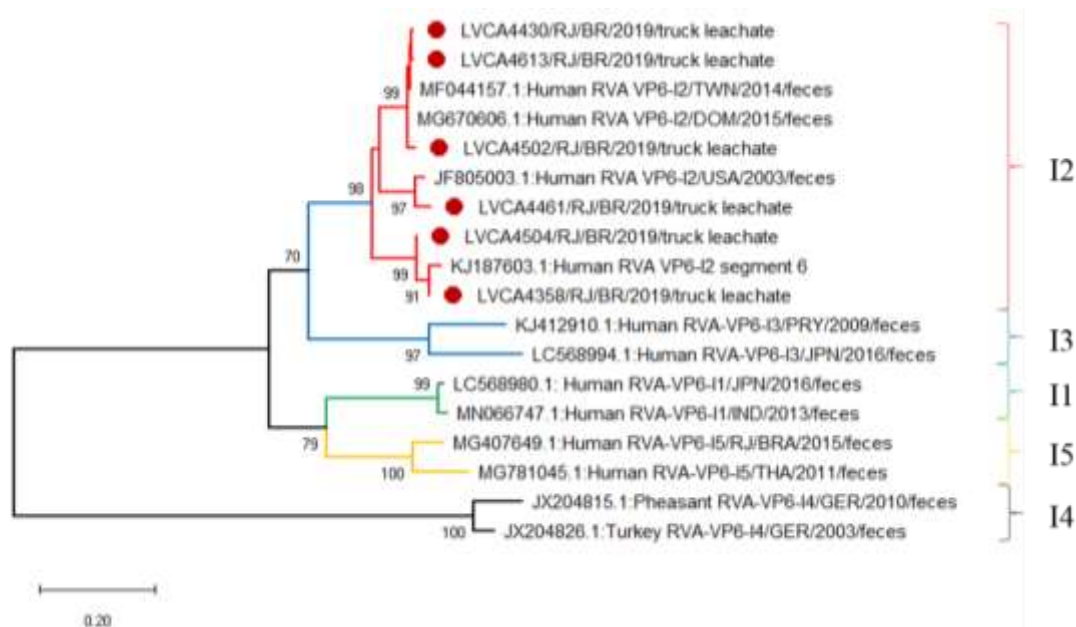
a) Comparação do qPCR [HAdV sem propídio monoazida (PMA)] e o ensaio de integridade do capsídeo por qPCR (PMA-qPCR). b) Comparação entre o ensaio de infecciosidade de HAdV (eixo x) e qPCR sem e com PMA (eixo y).

5.2.5 Diversidade genética de RVA e HAdV

Do total de amostras positivas para RVA, seis amostras do lixiviado de caminhão, correspondendo a 66,6% (6/9) desta matriz foram sequenciadas com sucesso. Não foi possível sequenciar as amostras do aterro sanitário.

Todas as amostras de RVA sequenciadas foram caracterizadas como relacionadas ao genogrupo I2, utilizando como base a caracterização molecular do gene VP6 parcial (379 pb) (Figura 19). Não foi possível genotipar por G e P (resultados negativos). Para caracterização molecular, foi construída uma árvore filogenética e utilizada a análise de máxima verossimilhança no *Mega X Software*, modelo *Tamura 3 Parâmetros e Distribuição Gamma com sítios Invariáveis (G+I)* com 2.000 *bootstraps* acima de 70%.

Figura 19: Dendrograma baseado na sequência parcial de 379 pb do gene VP6 de rotavírus espécie A (RVA) de seis amostras de lixiviado de caminhão (círculo em vermelho).

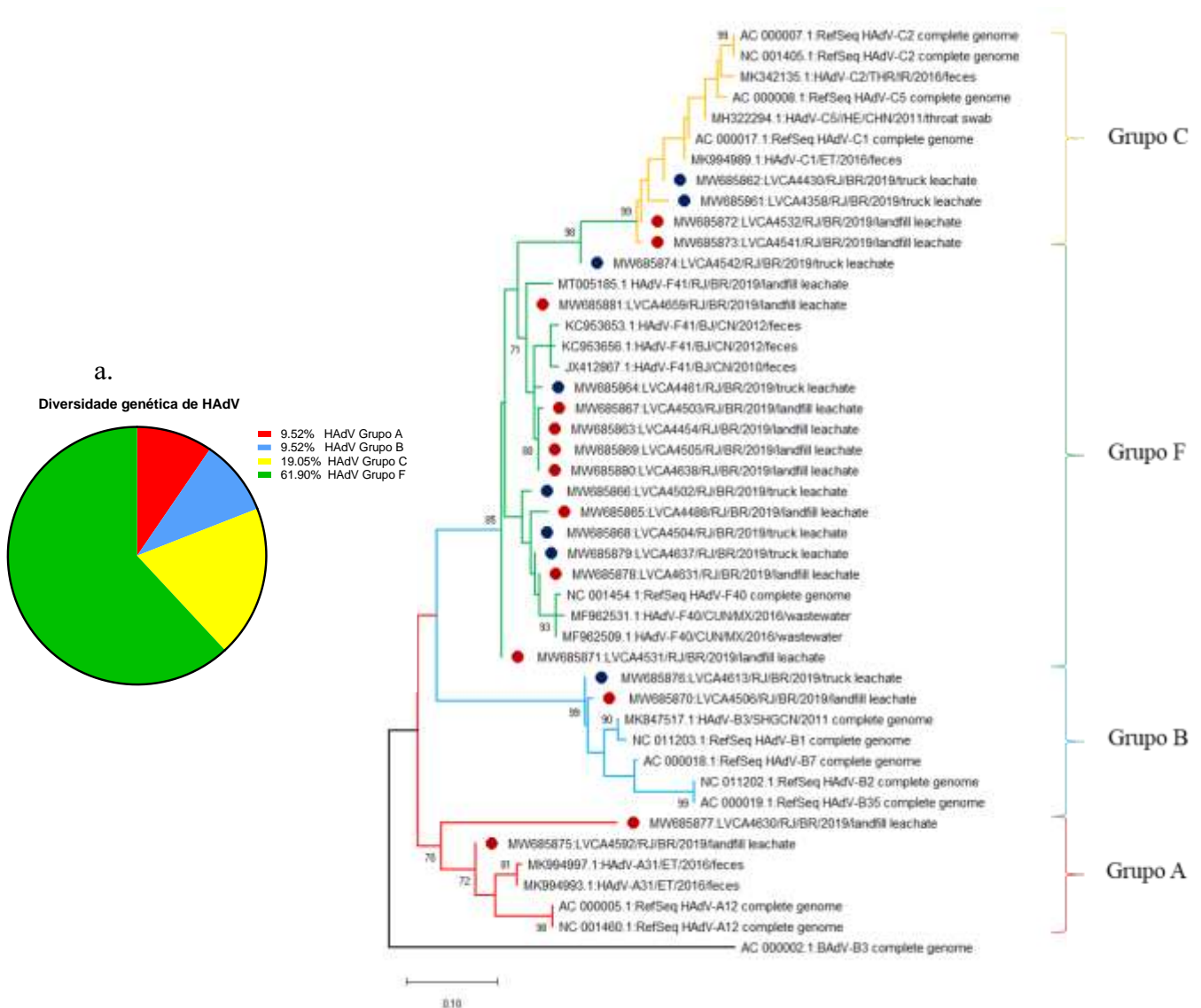


As sequências obtidas são apresentadas como LVCA, número de registro interno, estado, país e ano de coleta. As sequências de referência foram obtidas no GenBank. A árvore filogenética de máxima verossimilhança foi construída no *Mega X Software*, modelo *Tamura 3 Parâmetros, Distribuição Gama com Sítios Invariáveis (G + I)* e 2.000 *bootstraps* acima de 70%.

Quanto à diversidade genética de HAdV, obtida pela análise do gene hexon parcial (245 pb) de 21 das 22 amostras detectadas, evidenciou-se a ocorrência de um percentual maior de vírus pertencentes à espécie F (61,9%), seguido da espécie C (19,05%) e dos grupos A e B (9,52% cada). Dos HAdV-F sequenciados, 46,15% (6/13) eram do tipo 40 e 53,84%

(7/13) do tipo 41, que estão associados a sintomas gastrointestinais. A distribuição das espécies de HAdV por tipo de lixiviados foi semelhante, com exceção de HAdV espécie A, que só foi detectado no aterro sanitário. (Figura 20). Utilizou-se a análise de máxima verossimilhança no *Mega X Software*, modelo *Tamura 3 Parâmetros e Distribuição Gamma com sítios Invariáveis (G)* com 2.000 *bootstraps* acima de 70%.

Figura 20: Diversidade genética de adenovírus humano (HAdV) por espécie em lixiviado de caminhão e de aterro sanitário.



a) Proporção de grupos de HAdV (A, B, C e F). b) Dendrograma baseado na sequência parcial de nucleotídeos do gene hexon de HAdV (245 pb) de 21 amostras ambientais brasileiras de lixiviado de caminhão (círculo em azul) e aterro sanitário (círculo em vermelho). As sequências obtidas são apresentadas com o número de depósito no GenBank, seguido da sigla do laboratório (LVCA), número de registro interno, estado, país e ano de coleta. As sequências de referência foram obtidas no GenBank. A árvore filogenética de máxima verossimilhança foi construída no *Mega X Software*, modelo *Tamura 3 Parâmetros e Distribuição Gamma (G)* com 2.000 *bootstraps* acima de 70%.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DO LIXIVIADO DE RESÍDUOS SÓLIDOS

5.3.1 Parâmetros físico-químicos

A caracterização físico-química de amostras de lixiviado de caminhão e de aterro sanitário apresentou resultados distintos em termos de composição do lixiviado, no qual o lixiviado de caminhão apresentou um maior número de compostos orgânicos, quando comparado com amostras provenientes do aterro sanitário (Tabela 9).

Tabela 9: Comparação entre os valores médios da caracterização físico-química de lixiviado de caminhão e do aterro sanitário, de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2017).

Caracterização físico-química	Lixiviado de caminhão (N=9)		Lixiviado de aterro (N=13)		p-valor
	Média	Min-Max	Média	Min-Max	
pH	4,0	(4,00-5,00)	8,0	(8,00-9,00)	<0,0001
Cor verdadeira (mg Pt-Co L ⁻¹)	3527	(1235-16859)	7196	(5350-11690)	0,0014
Cor aparente (mg Pt-Co L ⁻¹)	73225	(15086-135000)	12423	(9061-20076)	<0,0001
Turbidez (NTU)	20333	(10000-48000)	213	(113-526)	<0,0001
Alcalinidade total (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	292	(48-576)	11509	(7499-14216)	<0,0001
Condutividade (µs cm ⁻¹)	27883	(15626-92013)	34283	(29744-37191)	0,0014
Total hardness (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	5495	(2546-13295)	6933	(436-33800)	0,1264
Sólidos totais (mg L ⁻¹)	67301	(55875-93358)	17113	(13201-28743)	<0,0001
Sólidos dissolvidos totais (mg L ⁻¹)	39955	(31588-52032)	16559	(13034-28518)	<0,0001
Sólidos suspensos totais (mg L ⁻¹)	27345	(12325-42177)	455	(167-2408)	<0,0001
Sólidos fixos totais (mg L ⁻¹)	19650	(12849-25530)	12196	(9510-24367)	0,0003
Sólidos voláteis totais (mg L ⁻¹)	47651	(37538-70699)	4917	(3009-8925)	<0,0001
Carbono total (mg TC L ⁻¹)	22410	(14748-35010)	6494	(4912-11480)	<0,0001
Carbono orgânico total (mg TOC L ⁻¹)	22103	(14617-34994)	4617	(3058-9977)	<0,0001
Carbono inorgânico total (mg IC L ⁻¹)	307	(16-904)	1877	(1026-2627)	<0,0001
Demanda química de oxigênio (mg O ₂ L ⁻¹)	53208	(24873-93374)	8137	(3682-19684)	<0,0001
UV 254 nm (unidade de absorvância)	153	(66,9-342)	132	(37-259)	0,2843
Cloreto (mg Cl L ⁻¹)	5567	(2691-8312)	6793	(4227-11213)	0,2624
Fósforo (mg P L ⁻¹)	232	(135-336)	20	(13-41)	<0,0001
Amônia (mg N-NH ₃ L ⁻¹)	272	(215-387)	2640	(2135-3316)	<0,0001
Nitrogênio total (mg N L ⁻¹)	1011	(696-1414)	3718	(2946-4312)	<0,0001

Os valores de cor aparente, turbidez, sólidos, carbono total (representado pelos altos valores de carbono orgânico total), demanda química de oxigênio (DQO), e fósforo foram significativamente maiores no lixiviado de caminhão, quando comparado ao lixiviado de aterro ($p < 0,0001$).

Os valores de pH, alcalinidade total, carbono inorgânico total, amônia e nitrogênio total apresentaram valores significativamente maiores no lixiviado do aterro, quando comparados ao caminhão ($p < 0,0001$). Cloreto e UV 254 não apresentaram diferença significativa nos dois lixiviados analisados ($p > 0,05$).

5.3.2 Parâmetros físico-químicos como preditores de HAdV

O papel dos parâmetros físico-químicos nas concentrações de bactérias e vírus foi estudado considerando todas as amostras de lixiviado juntas em modelos de regressão múltipla, para aumentar o tamanho da amostra para análise estatística.

Com base na análise do coeficiente de correlação, seis variáveis foram consideradas como preditores nos modelos: condutividade, cloreto, dureza total, UV 254 nm, sólidos suspensos totais e turbidez.

Após a simplificação do modelo, condutividade, cloreto, UV 254 nm, sólidos suspensos totais e turbidez foram capazes de explicar mais de 50% da variação das concentrações bacterianas, ou seja, 87% da variação coliforme total ($R^2_{adj} = 0,8706$, $p < 0,0001$) e 63% da variação de *E. coli* ($R^2_{adj} = 0,6279$, $p < 0,01$).

O nível da variabilidade de HAdV explicado por preditores físico-químicos variou com base nos métodos analíticos. 18% das partículas infecciosas correlacionou com sólidos suspensos totais ($R^2_{adj} = 0,1819$, $p < 0,05$), 36% do HAdV qPCR com sólidos suspensos totais e condutividade ($R^2_{adj} = 0,3631$, $p < 0,01$), e 58% do HAdV PMA-qPCR com sólidos suspensos totais e condutividade ($R^2_{adj} = 0,5806$, $p < 0,0001$). Independentemente do método analítico, os sólidos suspensos totais representaram o principal preditor para as concentrações de HAdV. Mais estudos são necessários para definir qual *cutoff* da concentração de sólidos suspensos que funcionaria como preditor.

5.4 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE RISCO MICROBIOLÓGICO (QMRA)

Os resultados da QMRA indicaram que os mecanismos de ingestão oral apresentaram diferentes doses de exposição, portanto, diferentes riscos de gastroenterite (Figura 21).

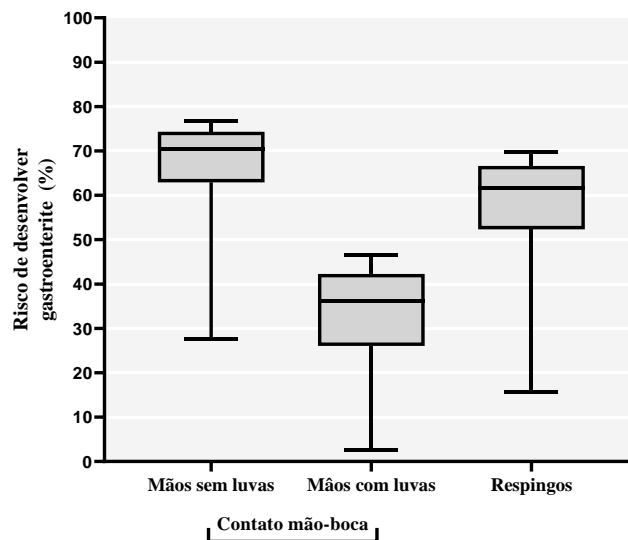
O contato mão-a-boca de trabalhadores utilizando luvas foi responsável por uma dose média de 17,85 TCID₅₀ (IQR = 9,37 – 26,34) o que correspondeu a um risco de gastroenterite médio de 33%, variando em um IQR de 26% e 42%. O contato mão-boca de trabalhadores sem luvas foi responsável por uma dose média de 209,32 TCID₅₀ (IQR = 140,23 – 394,24) o que correspondeu a um risco de gastroenterite médio diário de 67%, variando em um IQR de 63% e 74%.

Por outro lado, para o mecanismo de respingos estimou-se uma dose de exposição média de 85,24 TCID₅₀ (IQR = 44,73 - 125,76) associada a uma probabilidade de doença de 58% (IQR = 52% - 67%).

Considerando a dose diária total de exposição por ingestão como a soma da dose média pelo contato mão-a-boca com luvas e a via de respingos (103,10 TCID₅₀), a via por respingos é responsável pela maior contribuição para a dose diária total (~ 83 % da dose diária total) em comparação com a via mão-boca (~ 17%).

Por outro lado, considerando a dose diária total de exposição por ingestão oral como a soma da dose média pelo contato mão-a-boca sem luvas e a via de respingos (294,56 TCID₅₀), o contato mão-boca é responsável pela maior contribuição para a dose diária total (~ 71 % da dose diária total) em comparação com a via de respingos (~ 29%).

Figura 21. Probabilidade diária de doença gastrointestinal para trabalhadores de caminhão, atribuível à ingestão oral inadvertida de lixiviado de caminhão.



A dose de TCID₅₀ é categorizada para comparar o contato mão-a-boca (mãos sem e com luvas) e a via de respingos.

5.4.1 Análise de sensibilidade

A análise de sensibilidade investigou o impacto das variáveis de entrada modeladas em função da densidade de probabilidade na saída do modelo: f_{contato} , C_{HADv} e $TE_{\text{superfície/mão}}$ para a ingestão inadvertida via mão-a-boca e C_{HADv} e $V_{\text{lixiviado}}$ para a via de respingos.

No contato mão-boca com e sem luvas, o parâmetro de maior impacto foi a frequência de contato mão-boca e a concentração de HAdV no lixiviado do caminhão, seguido pela eficiência de transferência de HAdV entre a superfície e a mão. Na via de respingos, o parâmetro mais importante foi a concentração de HAdV seguido pelo volume de lixiviado ingerido acidentalmente (Figura 22).

Figura 22. Análise de sensibilidade da probabilidade de doença ($P_{\text{doença}}$) pela ingestão inadvertida de lixiviado de caminhão.

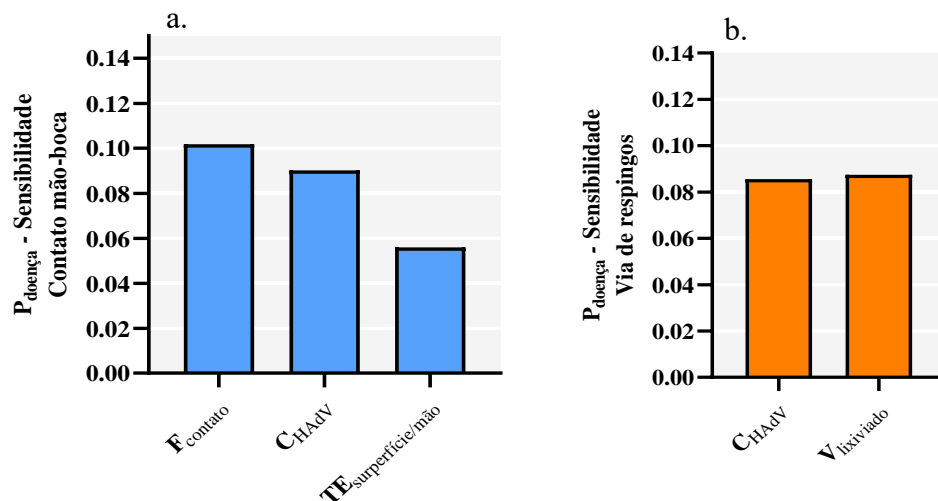


Fig. a: VARIÁVEIS que influenciam a via de contato mão-boca: frequência de contato mão-boca (F_{contato}), concentração de HAdV (C_{HADv}) e eficiência de transferência entre a superfície e a mão ($TE_{\text{superfície/mão}}$). Fig. b: Via de respingos: C_{HADv} e volume de lixiviado ($V_{\text{lixiviado}}$).

Os resultados obtidos desta tese originaram dados em quatro publicações científicas:

Artigo 1: Evaluation of viral recovery methodologies from solid waste landfill leachate. <https://doi.org/10.1007/s12560-020-09431-3>

Artigo 2: Human adenovirus in municipal solid waste leachate and quantitative risk assessment of gastrointestinal illness to waste collectors (submetido na *Waste Management*).

Artigo 3: Viral metagenomics of solid waste leachate: comparison between sanitary landfill and truck leachate (em preparo, será submetido na *Environmental Science and Technology*).

Artigo 4: Quantification and molecular characterization of rotavirus in solid waste leachate (em preparo, será submetido na *Food and Environmental Virology*).

5 DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO PILOTO, OCORRÊNCIA DE VÍRUS E CARACTERIZAÇÃO DO LIXIVIADO

Como mencionado anteriormente, não há relatos de pesquisas prévias relacionadas à detecção e quantificação de vírus em lixiviados, de modo que a primeira etapa deste estudo (piloto) teve como objetivo estabelecer uma metodologia capaz de recuperar vírus DNA e RNA a partir desta matriz. Neste estudo, foram analisadas somente amostras provenientes de aterro sanitário.

Devido à composição do lixiviado optou-se pela avaliação da metodologia de ultracentrifugação, que tem sido descrita como eficiente para a detecção viral a partir de amostras ambientais complexas como esgoto. A ultracentrifugação apresentou uma eficiência de recuperação viral de 47% (34-60%) para RVA de esgoto (FUMIAN; LEITE; CASTELLO; GAGGERO *et al.*, 2010). Este é o primeiro estudo que relata a utilização da ultracentrifugação como uma metodologia eficaz para detecção e quantificação de amostras de vírus em lixiviados.

Entretanto, ciente do custo inicial desta metodologia, também se avaliou a metodologia de floculação orgânica, que utiliza leite desnatado para precipitação viral. Descrita inicialmente para recuperação de vírus a partir de água do mar (CALGUA; MENGEWEIN; GRUNERT; BOFILL-MAS *et al.*, 2008), este protocolo foi ajustado para recuperação de vírus em esgotos (CALGUA; RODRIGUEZ-MANZANO; HUNDESA; SUÑEN *et al.*, 2013) e utilizado neste estudo como uma opção de baixo custo para recuperação de vírus em lixiviados.

Adicionalmente, estas metodologias foram avaliadas em associação com dois diferentes métodos de extração de ácido nucléico. Com resultados de eficiência bem variáveis, todos os métodos utilizados apresentaram uma taxa de sucesso para ambos os vírus analisados (HAdV e PP7). Entretanto, a metodologia de ultracentrifugação associada com o método de extração de ácidos nucleicos *QIAamp Fast DNA Stool mini Kit*[®] demonstrou menor variabilidade na recuperação de vírus tanto de DNA como de RNA. O *QIAamp Fast DNA Stool mini kit*[®] possui um tampão *InhibitEX*, descrito como adequado para a limpeza de inibidores de PCR em diferentes matrizes ambientais. Trata-se de um kit utilizado para detecção de patógenos gastroentéricos em amostras de fezes (PLATTS-MILLS; LIU; ROGAWSKI; KABIR *et al.*, 2018) e também é descrito para extração a partir de matrizes complexas, como por exemplo na detecção de adenovírus em sedimentos (SILVA; PESSOA-DE-SOUZA; FONGARO; ANUNCIAÇÃO *et al.*, 2015).

A ultracentrifugação associada ao *QIAamp DNA Fast Stool mini kit*[®] foi capaz de recuperar HAdV a partir das três amostras de lixiviado analisadas. Entretanto, o kit de extração *QIAamp viral RNA mini kit*[®], utilizado para fluidos corporais como plasma e soro (SINGH; LALE; EONG OOI; CHIU *et al.*, 2006) e amostras ambientais menos complexas como a água (KOVAC; GUTIÉRREZ-AGUIRRE; BANJAC; PETERKA *et al.*, 2009), não se mostrou eficiente para extração de material genético a partir de lixiviado. Anteriormente, o método de extração por isotiocianato de guanidina (BOOM; SOL; SALIMANS; JANSEN *et al.*, 1990) foi avaliado para estas mesmas amostras, e apresentou baixa eficiência de recuperação para HAdV (0,83%) e PP7 (0,003) (dados não mostrados).

Em ambas as metodologias (floculação orgânica e ultracentrifugação) observou-se uma eficiência de recuperação viral maior do que 100%, o que poderia sugerir a formação de agregados virais que podem ter influenciado nos resultados de quantificação. Porém, a formação de agregados ocorreria somente quando o pH da amostra de lixiviado de aterro (pH 8,0-9,0) estivesse equivalente ao ponto isoelétrico do HAdV (pH 3,5-4,0), o que não ocorreu para esse tipo de matriz. (MICHEN; GRAULE, 2010; WONG; MUKHERJEE; KAHLER; ZEPP *et al.*, 2012).

Com isso, a contaminação artificial do lixiviado com concentrações elevadas de controles virais parece ter sido um fator importante na formação destes agregados. A formação de agregados pode ser influenciada pela presença de sais concentrados, polímeros catiônicos e matéria orgânica suspensa, incluindo também o congelamento e descongelamento repetitivo da amostra (GERBA; BETANCOURT, 2017; WONG; MUKHERJEE; KAHLER; ZEPP *et al.*, 2012).

Em relação a inibição na detecção viral no lixiviado de aterro, as estratégias de diluição utilizadas, com testagem de amostras pura, diluídas 10^{-1} e 10^{-2} , foram eficientes para ajustar a quantificação dos vírus utilizando a ultracentrifugação. Entretanto, metodologia de floculação orgânica, independentemente do kit de extração utilizado, apresentou inibição em todas as amostras sem diluição, sendo essa inibição marcante em todas as diluições utilizando o kit *QIAamp viral RNA mini kit*[®], sugerindo que o leite utilizado tenha atuado como um inibidor adicional, além de outros inibidores presentes nestas amostras que não foram eliminados no processamento de concentração viral. Substâncias húmicas (ácidos húmicos e fúlvicos) são formadas pela agregação de moléculas resultantes de degradações químicas e biológicas e estão presentes em 60% da fração orgânica de lixivios de aterro, o que poderia explicar a inibição observada (LIMA; DE ALMEIDA; QUINTAES; BILA *et*

al., 2017). Estudos sugerem que os ácidos húmicos podem também inibir a reação de PCR através da ligação específica à sequência de DNA, limitando a quantidade de alvos disponíveis (OPEL; CHUNG; MCCORD, 2010). As amostras inoculadas submetidas à contaminação artificial não foram autoclavadas, e os resultados de HAdV obtidos foram subtraídos dos obtidos naturalmente na matriz de lixiviado.

Após estabelecimento da metodologia com maior eficiência de recuperação viral, pelos experimentos de contaminação artificial realizados, novas amostras de lixiviado de aterro sanitário foram coletadas para avaliar a ocorrência natural de vírus nesta matriz. Os títulos de HAdV encontrados nesta matriz ($3,44 \times 10^6$ GC ml⁻¹), foram semelhantes aos obtidos em esgoto bruto e superior ao obtido em lodos ativados (HARAMOTO; KITAJIMA; HATA; TORREY *et al.*, 2018; PRADO; GASPAS; MIAGOSTOVICH, 2014; RAMES; ROIKO; STRATTON; MACDONALD, 2016), assim como a recuperação do PP7, utilizado como controle interno de processo nestas amostras, demonstraram a eficiência da metodologia estabelecida. A utilização de controles internos é uma prática comum para avaliar a eficiência de recuperação de vírus e o nível de inibição durante a detecção viral, contribuindo para determinar resultados falso-negativos (HARAMOTO; KITAJIMA; HATA; TORREY *et al.*, 2018).

Na ocorrência de vírus em lixiviado de aterro sanitário, o sequenciamento parcial nucleotídico identificou HAdV dos grupos B e F. Os HAdV grupo F foram caracterizados como HAdV sorotipo 41, amplamente descrito em matrizes ambientais e associado a quadros de gastroenterite (KAAS; OGORZALY; LECHELLIER; BERTEAUX-LECELLIER *et al.*, 2019; REIS; ASSIS; DO VALLE; BARLETTA *et al.*, 2016). Não foi possível estabelecer o sorotipo de HAdV grupo B, mas estes foram relacionados a um grupo de sorotipos (11, 14, 34 e 35). O grupo B é descrito como associado a infecções respiratórias (BASTUG; ALTAS; KOC; BAYRAKDAR *et al.*, 2021).

Neste estudo piloto também foram avaliados parâmetros bacteriológicos e físico-químicos, a fim de se caracterizar a composição do lixiviado estudado. Os resultados de coliformes e *E. coli* encontrados de $8,32 \times 10^3$ e $1,6 \times 10^3$ NMP 100 ml⁻¹, respectivamente, estão semelhantes a estudos previamente descritos em lixiviados de aterros sanitários brasileiros (10^3 a 10^8 NMP 100 ml⁻¹) (SOUTO, 2009). Previamente, uma revisão da literatura buscou identificar as principais fontes de patógenos microbianos que poderiam estar presentes em aterros sanitários, sugerindo os resíduos de alimentos, fezes de animais, fraldas descartáveis, absorventes femininos e biossólidos de estações de tratamento de esgoto como os principais (GERBA; TAMIMI; PETTIGREW; WEISBROD *et al.*, 2011). Na França,

valores de $2,0 \times 10^4$ e $1,5 \times 10^4$ UFC 100 ml⁻¹ de coliformes totais e *E. coli* foram obtidos, respectivamente, em águas subterrâneas de um aterro sanitário e de $3,0 \times 10^3$ e $3,8 \times 10^1$ UFC 100 ml⁻¹ diretamente do lixiviado de aterro (GRISEY; BELLE; DAT; MUDRY *et al.*, 2010).

Em relação aos parâmetros físico-químicos, observou-se que os valores de pH, alcalinidade, dureza total, condutividade, sólidos, DQO, fósforo, nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato, são similares com as médias observadas na revisão bibliográfica de 25 aterros sanitários brasileiros (COSTA; ALFAIA; CAMPOS, 2019; SOUTO, 2009). Os resultados de pH, cor e DQO foram semelhantes aos encontrados nos aterros sanitários de Gericinó e Gramacho, localizados no estado do Rio de Janeiro (LIMA; DE ALMEIDA; QUINTAES; BILA *et al.*, 2017). No entanto, valores de UV 254 foram mais elevados nas amostras de lixiviado do nosso estudo.

A quantidade e as características dos lixiviados gerados em um aterro sanitário são específicas do local e, portanto, altamente variáveis. A caracterização físico-química do lixiviado depende da idade do aterro, dos métodos de operação, da ocorrência de eventos anteriores ao momento da amostragem, das condições climáticas, da composição dos resíduos e da taxa de degradação dos resíduos sólidos (BULC, 2006; O'LEARY; TCHOBANOGLOUS; KREITH, 2002). Por exemplo, uma amostra de lixiviado coletada durante a fase ácida de decomposição dos resíduos pode apresentar baixo valor de pH e concentrações elevadas de DBO, carbono orgânico total (TOC), DQO, nutrientes e metais. Já um lixiviado coletado durante a fase de fermentação de metano pode indicar um pH neutro para alto, e DBO, TOC e DQO em menores concentrações (O'LEARY; TCHOBANOGLOUS; KREITH, 2002). Porém, as fases de decomposição da matéria orgânica em um aterro sanitário não são tão definidas, visto ser uma estrutura dinâmica. Logo, o lixiviado pode não revelar a fase de decomposição. Isso aconteceria se fosse em um sistema estático.

O pequeno número de amostras utilizadas para verificar a capacidade da metodologia estabelecida para detectar vírus em amostras de lixiviado não permitiu qualquer tipo de correlação com parâmetros bacteriológicos e/ou físico-químicos.

5.2 MONITORAMENTO DE VÍRUS EM LIXIVIADO

Como segunda etapa deste estudo realizou-se um monitoramento de amostras de lixiviado de diferentes origens (bacia de caminhão e aterro sanitário), estimou-se o risco ocupacional de trabalhadores de limpeza urbana expostos diariamente a esta matriz. Nesta etapa, ambos os tipos de lixiviados foram estudados para fins comparativos. Inicialmente,

realizou-se um estudo de metagenoma viral, seguido de uma investigação direcionada para pesquisa de HAdV como indicador de contaminação fecal humana e de RVA, importante patógeno causador de gastroenterite viral. Metodologias de quantificação avaliando a integridade das partículas foram utilizadas para ambos os vírus, assim como ensaios de infecciosidade de HAdV. Parâmetros físico-químicos e bacteriológicos também foram utilizados para caracterização destes lixiviados.

5.2.1 Metagenômica viral

Com o objetivo de se identificar a diversidade de vírus presentes nas diferentes amostras de lixiviados (obtidas diretamente na bacia do caminhão e em aterro sanitário), dois *pools* destas amostras ultracentrifugadas foram sequenciadas utilizando a metodologia NGS.

O uso da metagenoma viral como ferramenta para análise da diversidade genética em lixiviados de resíduos sólidos foi realizado com sucesso. A ferramenta permitiu uma análise geral do lixiviado, detectando alguns vírus de transmissão fecal-oral de importância para o homem e animais. Observou-se uma diferença significativa na diversidade genética do *pool* obtido de lixiviado de caminhão, quando comparado com o aterro sanitário.

Uma análise global de ambas as amostras demonstrou uma alta diversidade de sequências de bacteriófagos nos lixiviados, o que também foi observado em outras matrizes ambientais, como de águas de reuso (ROSARIO; NILSSON; LIM; RUAN *et al.*, 2009). Os bacteriófagos detectados infectavam bactérias patogênicas ou comensais do trato gastrointestinal humano, sendo um indicador indireto de sequências bacterianas.

A detecção de vírus que infectam humanos pela via de transmissão fecal-oral como astrovírus humanos, e alguns vírus da família *Picornaviridae*, como por exemplo, enterovírus humano D68, coxsackievírus, aichi vírus e vírus da hepatite A, alertam para o potencial risco de infecção por estes vírus e risco de exposição ao trabalhador de limpeza urbana. A ausência de estudos na literatura descrevendo a diversidade destes vírus em lixiviados não permite uma avaliação comparativa entre lixiviados de diferentes regiões geográficas. Entretanto, trabalhos realizados em esgoto sugerem o uso da metagenômica como ferramenta de vigilância em saúde pública ambiental (FERNANDEZ-CASSI; TIMONEDA; MARTÍNEZ-PUCHOL; RUSIÑOL *et al.*, 2018; MCCALL; WU; MIYANI; XAGORARAKI, 2020).

A não detecção dos vírus-alvo deste estudo por esta metodologia, muito comum nos estudos ambientais, pode ser justificada pela não utilização de uma metodologia direcionada, visto que se realizou o sequenciamento dos genomas presentes na matriz. Uma menor

sensibilidade para detecção de vírus que infectam humanos em amostras de esgoto analisadas por metagenoma viral foi anteriormente justificada por esta não ser direcionada (MARTÍNEZ-PUCHOL; RUSIÑOL; FERNÁNDEZ-CASSI; TIMONEDA *et al.*, 2020). Outras metodologias de NGS são sugeridas como mais eficazes para detectar vírus-alvo, utilizando *primers* específicos para a região do vírus de interesse, como o *amplicon deep sequencing*, (LUN; CROSBIE; WHITE, 2019), que possui uma etapa prévia de nested-PCR seguido do NGS, e o NGS por sequenciamento de enriquecimento do alvo, que utiliza um *pool* de sondas específicas para detectar os principais vírus de interesse em saúde pública (MARTÍNEZ-PUCHOL; RUSIÑOL; FERNÁNDEZ-CASSI; TIMONEDA *et al.*, 2020).

5.2.2 Detecção, quantificação, caracterização molecular de HAdV, RVA e parâmetros bacteriológicos

A comparação da quantificação de HAdV, parâmetros bacteriológicos demonstrou maior concentração de vírus e bactérias no lixiviado fresco (caminhão) quando comparado com o lixiviado do aterro sanitário, com significância estatística. Um estudo realizado em um aterro sanitário na Itália também detectou HAdV em amostras coletadas do ar e de *swab* da superfície do aterro (CARDUCCI; FEDERIGI; VERANI, 2013). O RVA apresentou diferença, mas não foi significativa. O RVA e HAdV foram detectados com sucesso nas amostras de lixiviado de caminhão, com ou sem tratamento prévio com PMA, revelando que os vírus quantificados estavam íntegros, compatível com lixiviado frescos. Entretanto, não foi possível realizar o ensaio de infecciosidade de RVA em cultura de células para a validação do potencial infeccioso deste vírus.

A baixa prevalência de RVA no lixiviado de aterro sanitário pode indicar a não persistência deste vírus neste tipo de matriz, por estar sujeito aos processos de desnaturação nas camadas do aterro. Sendo um vírus RNA, espera-se uma menor resistência às condições adversas quando comparados a vírus DNA, como o HAdV (HEWITT; GREENING; LEONARD; LEWIS, 2013). O ensaio de infecciosidade em células A549 evidencia que o HAdV foi capaz de permanecer infeccioso nas amostras de lixiviados, com maior proporção no lixiviado de caminhão. Esses resultados são corroborados pelos experimentos de inoculação experimental realizados pela *United States Environmental Protection Agency* (USEPA), que testou a persistência viral de vários vírus, como o bacteriófago MS2, o bacteriófago Phi e o vírus Zika em amostras de lixiviados provenientes de diferentes aterros (USEPA, 2018). Assim como o HAdV, o bacteriófago MS2 é um vírus sem envelope e foi capaz de persistir por até 2 dias a 37 °C e até um mês a 12 °C.

O RVA foi detectado com sucesso nas amostras de lixiviado de caminhão, com alta carga viral, com ou sem PMA. Não foi possível realizar o ensaio de infecciosidade de RVA em cultura de células para a validação do potencial infeccioso, mas a estrutura viral de triplo capsídeo do RVA pode contribuir para a alta carga viral mesmo em amostras tratadas com PMA.

Além disso, no desenvolvimento desta tese, foi encontrada uma relação linear entre a infecciosidade do HAdV e o PMA-qPCR. Essa descoberta preliminar pode sugerir o uso do tratamento de PMA como uma metodologia fácil e prática para estimar a infectividade do HAdV, devido às características físico-químicas e morfológicas desse vírus, por se tratar de um vírus resistente ao ambiente, não envelopado e com material genético de DNA

A diferença significativa entre os parâmetros bacteriológicos detectados no lixiviado de caminhão, quando comparado ao de aterro sanitário, são justificados também pela caracterização gravimétrica de resíduos sólidos domiciliares desde 1995, incluindo o ano de coleta em 2019, que indicaram a predominância de resíduos orgânicos (COMLURB, 2020a). A concentração de coliformes totais e *E. coli* detectados foram superiores ao estudo de caracterização microbiológica de resíduos domiciliares realizada pela Comlurb em 2012 (COMLURB, 2012) e de um estudo da comparação microbiológica de resíduos domiciliares com resíduos de saúde no município do Rio de Janeiro (SILVA; CAMPOS; FERREIRA; MIGUEL *et al.*, 2011).

Os microrganismos detectados por técnicas moleculares e colimétricas estão relacionados à presença de resíduos sólidos como alimentos, fraldas descartáveis, papel higiênico, absorventes femininos, de serviços de saúde de pessoas doentes em casa e secreções, que contribuem para a detecção de vírus e bactérias excretados nas fezes e são carregados para o lixiviado de resíduos sólidos (GERBA; TAMIMI; PETTIGREW; WEISBROD *et al.*, 2011). O grau de contaminação dos resíduos domiciliares pode ser entendido como o resultado do que é destinado. No ambiente rural, as características do lixiviado mudam, devido à microbiologia presente nos resíduos do campo. O lodo de esgoto/fossa séptica, destinado para o aterro sanitário, é transportado de forma independente, logo não é encontrado no lixiviado de caminhão.

Outra possível fonte de microrganismos seriam lodos de ETEs e fossas sépticas, em locais onde ocorra a co-disposição desses dois rejeitos em aterro sanitário, apesar do país carecer de regulamentação técnica específica. Embora existam alternativas na disposição final, como a agricultura e a incineração, no Brasil a disposição em aterro sanitário ainda é utilizada (HENDGES; REINHER; LEICHTWEIS; FERNANDES *et al.*, 2017).

Neste monitoramento, foi possível sequenciar 95,45% (21/22) amostras de HAdV, em ambas os tipos de lixiviados de resíduos sólidos com sucesso. A caracterização parcial do gene hexon dos principais HAdV sequenciados (61,90%) indica serem pertencentes aos HAdV do grupo F (sorotipo 40 e 41) e corroboram os resultados observados no estudo piloto que detectou o sorotipo 41. Os HAdV grupo F são relacionados à quadros de gastroenterite, eliminado nas fezes e frequentemente detectados em diversas matrizes ambientais (ASSIS; FUMIAN; MIAGOSTOVICH; DRUMOND *et al.*, 2018; REIS; ASSIS; DO VALLE; BARLETTA *et al.*, 2016).

Também foram detectados HAdV grupo C (19,05%), relacionado a infecções respiratórias, e em menor proporção HAdV dos grupos A e B (9,52%), associados à gastroenterite e às infecções respiratórias e renais, respectivamente (SILVA, 2008).

Os RVA foram sequenciados em 66,7% (6/9) das amostras de lixiviado de caminhão, e a caracterização molecular parcial do gene VP6 indica serem vírus agrupados ao genogrupo I2, detectado anteriormente em uma lagoa da cidade do Rio de Janeiro (VIEIRA; MENDES; OLIVEIRA; GASPAR *et al.*, 2012).

5.2.3 Parâmetros físico-químicos

Conforme mencionado, foram encontradas diferenças significativas entre os dois tipos de lixiviados de resíduos sólidos estudados. Os valores de cor aparente, turbidez, sólidos, carbono orgânico, DQO e fósforo foram maiores no lixiviado de caminhão, quando comparados de aterro. O lixiviado fresco de caminhão é gerado a partir de resíduos sólidos recentes, com tempos de decomposição recentes. A elevada concentração de sólidos pode favorecer a adsorção de partículas virais íntegras, justificando o uso dos sólidos suspensos totais como preditores de HAdV. Essa caracterização físico-química indica uma maior concentração de compostos orgânicos no lixiviado, o que contribui para uma maior detecção e quantificação de partículas infecciosas nesta matriz.

Os valores de pH, alcalinidade, carbono inorgânico, amônia e nitrogênio total apresentaram valores significativamente maiores no lixiviado de aterro, quando comparados ao caminhão. Embora a alta concentração de sais seja um inibidor de PCR, o cloreto não apresentou diferença significativa nos dois tipos de lixiviados analisados, assim como o UV254. A estrutura do aterro sanitário pode favorecer a decomposição de resíduos sólidos, pois possui um tempo maior para a decomposição, e contribui com a desnaturação de partículas virais, influenciado pelas altas temperaturas do lixiviado e tempo de retenção prolongado nas estruturas do aterro.

Para investigar quais parâmetros físico-químicos poderiam estar relacionados às concentrações de HAdV, realizou-se a análise de regressão múltipla, sendo necessário agrupar o número amostral de ambos os tipos de lixiviados. As análises sugerem que as concentrações de HAdV poderiam ser previstas pela quantificação de sólidos suspensos totais, embora sejam capazes de explicar apenas uma pequena porcentagem (16%) da variação das partículas infecciosas. Este resultado pode ser utilizado como ponto de partida para futuras investigações sobre a adoção de parâmetros físico-químicos como substitutos da contaminação viral. Para as companhias de resíduos, que não possuem a estrutura necessária para quantificar vírus por ferramentas de biologia molecular, a alta concentração de sólidos suspensos, um parâmetro de rotina das companhias de resíduos, poderia indicar a presença de HAdV, embora mais estudos sejam necessários para estabelecer qual seria esse *cutoff*.

As medições virais são demoradas e caras, portanto, atualmente, não podem ser utilizadas para monitoramento em tempo real na perspectiva de medidas de gerenciamento de risco. O monitoramento baseado na predição é bem descrito no contexto do plano de segurança da água para monitorar a qualidade da água potável, onde o cloro residual (preditor químico) é usado para prever a redução da carga viral, com o objetivo de manter a contaminação viral dentro de um limite baseado em risco (limite crítico). Esse limite crítico é obtido pela abordagem QMRA, com base no risco tolerável de doenças transmitidas pela água (SMEETS; RIETVELD; VAN DIJK; MEDEMA, 2010). A mesma abordagem pode ser aplicada para o lixiviado após a definição de risco aceitável para os trabalhadores do caminhão. O modelo da QMRA pode ser utilizado para calcular o limite crítico de concentração de HAdV, que pode ser monitorado por meio da quantificação de sólidos suspensos totais, ou outro tipo de sólido, como preditor químico.

5.3 ANÁLISE DE RISCO

No cenário hipotético descrito nesta tese, os valores de risco à saúde obtidos foram elevados considerando o pior cenário de trabalhadores de coleta de resíduos envolvidos em atividades diárias relacionadas à coleta de resíduos, expostos a superfícies de caminhões altamente poluídas e aos respingos da compactação de resíduos nos caminhões.

Também foi realizado um cenário de comparação entre trabalhadores com e sem luvas, o que contribuiu para um aumento da probabilidade de desenvolver gastroenterite de 33% para 67%. Esse cenário de não utilização de luvas é importante devido à dificuldade de adesão deste EPI pelos trabalhadores da limpeza urbana. A necessidade de comunicação

deste risco aos trabalhadores da companhia de resíduos é crítica de modo a reduzir comportamentos negligentes no que se refere à adesão aos EPIs.

Além disso, no cálculo da dose, partiu-se do pressuposto conservador de que todas as partículas infecciosas eram enteropatogênicas, embora alguns sorotipos de HAdV são responsáveis por sintomas respiratórios, como os pertencentes aos grupos B e C (Figura 16). No entanto, a falta de dados de vigilância de gastroenterite entre trabalhadores de RSU brasileiros impede qualquer inferência entre os resultados do modelo e os dados epidemiológicos. Embora outros estudos epidemiológicos já revelaram um aumento da incidência de sintomas gastrointestinais entre trabalhadores manipulando resíduos (IVENS; BREUM; EBBEHØJ; NIELSEN *et al.*, 1999; POULSEN; BREUM; EBBEHØJ; HANSEN *et al.*, 1995; THORN; BEIJER; RYLANDER, 1998).

Embora o risco de gastroenterite por RVA não tenha sido avaliado neste estudo, a importância destes vírus em casos de gastroenterite em adultos é descrita, sendo frequente em adultos hospitalizados e em estudos epidemiológicos (GUTIERREZ; FIALHO; MARANHÃO; MALTA *et al.*, 2020; LAUSCH; WESTH; KRISTENSEN; LINDBERG *et al.*, 2017)

Os resultados da abordagem por QMRA evidenciaram as duas vias (contato mão-boca e via de respingos) como relevantes para a análise de risco. O uso de protetores faciais reduziria o risco de desenvolver gastroenterite por meio da via de respingos.

A via de exposição pelo contato mão-boca com luvas, embora tenha sido menor, apresentou um resultado que também deve ser discutido com a companhia quanto a formas de prevenção e controle, principalmente porque o não uso de luvas aumenta cerca de 34% o risco de exposição.

O uso de luvas que sejam adequadas não só para a prevenção de acidentes com perfurocortantes e escarificantes, mas também para a prevenção de agentes biológicos, seria uma medida a ser implementada de forma imediata, com uma mudança de regulamentação que contribuiria para reduzir o risco de desenvolver gastroenterite e diminuir a exposição a outros vírus.

A sugestão de palestras e treinamento de formação continuada são importantes para a comunicação, prevenção e o manejo de risco. Um treinamento quanto ao comportamento dos trabalhadores, principalmente visando diminuir o contato mão-boca, visto que a frequência de contato mão-boca apresentou o maior impacto na estimativa de risco de desenvolver gastroenterite por esta via.

5.3.1 Limitações da avaliação de risco

Cenário para o contato mão-boca. A investigação da exposição das mãos à ingestão inadvertida requer informações sobre a eficiência de transferência de uma substância da superfície para as mãos e das mãos para a boca. A eficiência de transferência de agentes biológicos é atualmente pouco investigada (GORMAN NG; SEMPLE; CHERRIE; CHRISTOPHER *et al.*, 2012). O papel das luvas é considerado somente em estudos em laboratório ou produção de alimentos, para investigar a sua importância na transmissão de vírus transmitidos por alimentos (RÖNNQVIST; AHO; MIKKELÄ; RANTA *et al.*, 2014; STALS; UYTENDAELE; BAERT; VAN COILLIE, 2013).

Portanto, foi utilizada a eficiência de transferência da superfície para mãos com luvas derivada destes estudos experimentais, porém as luvas de látex utilizadas para manipulação de alimentos podem diferir das luvas dos coletores de resíduos, determinando assim uma diferença na aquisição viral de superfícies e/ou na liberação para o compartimento oral. Além disso, o comportamento quanto à biossegurança poderia ser diferente entre os dois grupos.

Vias de exposição: Estes dados de monitoramento em HAdV referem-se a amostras de lixiviado líquido, portanto, considerou-se a via oral como a única rota de exposição para ingestão acidental de lixiviado. No entanto, a inalação de aerossol carreando HAdV poderia ser outra via de exposição para doenças gastrointestinais, porque as partículas de aerossol com um diâmetro aerodinâmico maior que 10 µm permanecem presas na superfície do sistema respiratório, na região nasofaríngea ou traqueobrônquica, e então são removidas pela depuração mucociliar por meio de expectoração ou deglutição no trato gastrointestinal. Alguns estudos de QMRA ocupacionais focados no risco de doença gastrointestinal atribuível à exposição por inalação quantificam essa taxa de ingestão entre 10% e 50%, embora seja outros locais de exposição (AKPEIMEH; FLETCHER; EVANS; IBANGA, 2020; BROOKS; TANNER; JOSEPHSON; GERBA *et al.*, 2005; MEDEMA; WULLINGS; ROELEVELD; KOOIJ, 2004).

No cenário de exposição estudado, não foi possível a caracterização de risco de gastroenterite proveniente da inalação, por ser necessária uma série de dados ainda não disponíveis, como medições diretas de HAdV em amostras de ar coletadas durante as operações de compactação do caminhão e suposições sobre a taxa de aerossolização dos resíduos para o ar durante a operação do compactador.

Além disso, embora não tenham sido detectados nesta tese, HAdV do grupo D podem ser responsáveis por um quadro de ceratoconjuntivite (GOPALKRISHNA; GANORKAR; PATIL, 2016), como resultado de respingos intraoculares de lixiviado de caminhão durante

a operação de compactação ou pelo contato mão-olho. O papel do lixiviado do caminhão em aumentar o risco de conjuntivite precisa ser mais explorado, pelo fato de os dados sobre a exposição ocular serem completamente ausentes, portanto, estudos de avaliação de exposição devem ser planejados para entender o envolvimento ocular por respingos, deposição direta de aerossóis vindos do compactador de caminhão ou contato mão-olho.

6 CONCLUSÃO

A metodologia de ultracentrifugação associada ao kit de extração QIAamp Fast DNA Stool mini kit[®] se mostrou eficiente para recuperação de vírus a partir de lixiviados, sendo utilizada no processamento destas matrizes nas diferentes etapas deste estudo.

A análise genômica da população viral em lixiviados de diferentes origens demonstrou maior abundância e diversidade de famílias no lixiviado fresco.

Exceto para RVA, o lixiviado fresco apresentou maiores concentrações dos microrganismos investigados (HAdV, coliformes totais e *E. coli*).

A metodologia de PMA-qPCR não demonstrou diferença significativa na concentração de HAdV e RVA, independente da origem do lixiviado. Entretanto, demonstrou correlação linear com isolamento de HAdV por cultura de células, podendo ser utilizada para estimar a infecciosidade destes vírus.

A caracterização molecular dos HAdV detectados revelou maior diversidade genética destes vírus, quando comparados com RVA, independente da origem do lixiviado.

Há uma maior concentração de compostos orgânicos em lixiviados frescos quando comparados aos obtidos no aterro sanitário.

Os sólidos suspensos totais são preditores da presença de HAdV em amostras de lixiviado.

Entre os diferentes cenários de exposição avaliados (mão-boca e respingos), o estudo de análise de risco ocupacional demonstrou que o maior risco para doença gastrointestinal por HAdV se observa quando os trabalhadores não utilizam luvas em suas atividades.

Este estudo pioneiro no Brasil no mundo alerta sobre o risco ocupacional dos trabalhadores de limpeza urbana quanto às infecções gastrointestinais, e sobre a conscientização destes profissionais no que se refere a utilização correta e constante dos equipamentos de proteção individual.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nesta tese serão apresentados à direção da COMLURB, para ciência e possível discussão das estratégias de comunicação de risco aos trabalhadores. A primeira abordagem será com foco na aquisição de luvas que incluam também a proteção contra agentes biológicos e na adoção de protetores faciais, visto que máscaras já são utilizadas devido à pandemia da COVID-19. A segunda, será no treinamento e na adoção de medidas de biossegurança para a conscientização da importância do uso de luvas durante a coleta de resíduos sólidos. Por fim, a realização de uma palestra virtual com os trabalhadores, apresentando os resultados da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-SHAFY, H. I.; MANSOUR, M. S. Solid waste issue: Sources, composition, disposal, recycling, and valorization. **Egyptian Journal of Petroleum**, 27, n. 4, p. 1275-1290, 2018.
- ABE, F. R. **Toxicologia ambiental**. Londrina: Editora e Distribuidora Educacional S.A., 2017. 216 p.
- ABNT. NBR 8.419/92: Apresentação de projetos de aterros sanitários de resíduos sólidos urbanos. Rio de Janeiro, RJ: Associação Brasileira de Normas Técnicas 1992.
- ABNT. Procedimento para obtenção de extrato lixiviado de resíduos sólidos. Rio de Janeiro, RJ: Associação Brasileira de Normas Técnicas 2004.
- AKPEIMEH, G. F.; FLETCHER, L. A.; EVANS, B. E.; IBANGA, I. E. Quantitative Microbial Risk Assessment (QMRA) of Workers Exposure to Bioaerosols at MSW Open Dumpsites. **Risk Anal**, Dec 2020.
- ALLARD, A.; ALBINSSON, B.; WADELL, G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. **J Clin Microbiol**, 39, n. 2, p. 498-505, Feb 2001.
- ANTWI-AGYEI, P.; BIRAN, A.; PEASEY, A.; BRUCE, J. *et al.* A faecal exposure assessment of farm workers in Accra, Ghana: a cross sectional study. **BMC Public Health**, 16, p. 587, 07 2016.
- APHA. **Standard Methods For The Examination of Water and Wastewater**. 23rd edition ed. Washington D.C.: American Public Health Association, American Water Works Association and Water Env. Federation., 2017.
- ARABI, M.; SBAA, M.; VANCLOOSTER, M.; DARMOUS, A. Impact of the Municipal Solid Waste Typology on Leachate Flow under Semi-Arid Climate – A Case Study. **J. Ecol. Eng.**, 21, n. 6, p. 94-101, 2020.
- ASSIS, A. S. F.; FUMIAN, T. M.; MIAGOSTOVICH, M. P.; DRUMOND, B. P. *et al.* Adenovirus and rotavirus recovery from a treated effluent through an optimized skimmed-milk flocculation method. **Environ Sci Pollut Res Int**, 25, n. 17, p. 17025-17032, Jun 2018.
- BARRETO, L. V.; BARROS, F. M.; BONOMO, P.; ROCHA, F. A. *et al.* Eutrofização em rios brasileiros. **Enciclopédia Biosfera**, 9, n. 16, 2013.
- BASTUG, A.; ALTAS, A. B.; KOC, B. T.; BAYRAKDAR, F. *et al.* Molecular characterization of human adenoviruses associated with respiratory infection in Turkey. **APMIS**, 129, n. 1, p. 23-31, Jan 2021.
- BENYOUCEF, F.; MAKAN, A.; EL GHMARI, A.; OUATMANE, A. Solid household waste characterization and fresh leachate treatment: Case of Kasba Tadla city, Morocco. **Environmental Engineering Research**, 20, n. 4, p. 363-369, 2015.

BERK, A. J. Adenoviridae: The Viruses and Their Replication. *In*: KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 5 ed. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 2356-2394.

BISHOP, R. F.; DAVIDSON, G. P.; HOLMES, I. H.; RUCK, B. J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. **Lancet**, 2, n. 7841, p. 1281-1283, Dec 1973.

BLACKLOW, N. R.; GREENBERG, H. B. Viral gastroenteritis. **N Engl J Med**, 325, n. 4, p. 252-264, Jul 1991.

BOFILL-MAS, S.; RUSIÑOL, M.; FERNANDEZ-CASSI, X.; CARRATALÀ, A. *et al.* Quantification of human and animal viruses to differentiate the origin of the fecal contamination present in environmental samples. **Biomed Res Int**, 2013, p. 192089, 2013.

BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L. *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol**, 28, n. 3, p. 495-503, Mar 1990.

BOSCH, A. **Human viruses in water**. 1st ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 2007.

BRASIL. Lei 12.305, de 2 de ago. de 2010. Política Nacional de Resíduos Sólidos. Brasília, DF. 2010.

BRASIL. Lei Nº 14.026, de 15 de jul. de 2020. Brasília, DF. 2020.

BROOKS, J. P.; MCLAUGHLIN, M. R.; GERBA, C. P.; PEPPER, I. L. Land application of manure and Class B biosolids: an occupational and public quantitative microbial risk assessment. **J Environ Qual**, 41, n. 6, p. 2009-2023, 2012 Nov-Dec 2012.

BROOKS, J. P.; TANNER, B. D.; JOSEPHSON, K. L.; GERBA, C. P. *et al.* A national study on the residential impact of biological aerosols from the land application of biosolids. **J Appl Microbiol**, 99, n. 2, p. 310-322, 2005.

BUCARDO, F.; LINDGREN, P. E.; SVENSSON, L.; NORDGREN, J. Low prevalence of rotavirus and high prevalence of norovirus in hospital and community wastewater after introduction of rotavirus vaccine in Nicaragua. **PLoS One**, 6, n. 10, p. e25962, 2011.

BUCHFINK, B.; REUTER, K.; DROST, H. G. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. **Nat Methods**, 18, n. 4, p. 366-368, Apr 2021.

BULC, T. G. Long term performance of a constructed wetland for landfill leachate treatment. **Ecological Engineering**, 26, n. 4, p. 365-374, 2006.

CALGUA, B.; FUMIAN, T.; RUSIÑOL, M.; RODRIGUEZ-MANZANO, J. *et al.* Detection and quantification of classic and emerging viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas. **Water Res**, 47, n. 8, p. 2797-2810, May 2013.

CALGUA, B.; MENGEWEIN, A.; GRUNERT, A.; BOFILL-MAS, S. *et al.* Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. **J Virol Methods**, 153, n. 2, p. 79-83, Nov 2008.

CALGUA, B.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; HUNDESA, A.; SUÑEN, E. *et al.* New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. **J Virol Methods**, 187, n. 2, p. 215-221, Feb 2013.

CARDUCCI, A.; DONZELLI, G.; CIONI, L.; FEDERIGI, I. *et al.* Quantitative Microbial Risk Assessment for Workers Exposed to Bioaerosol in Wastewater Treatment Plants Aimed at the Choice and Setup of Safety Measures. **Int J Environ Res Public Health**, 15, n. 7, 07 2018.

CARDUCCI, A.; DONZELLI, G.; CIONI, L.; VERANI, M. Quantitative Microbial Risk Assessment in Occupational Settings Applied to the Airborne Human Adenovirus Infection. **Int J Environ Res Public Health**, 13, n. 7, 07 2016.

CARDUCCI, A.; FEDERIGI, I.; VERANI, M. Virus occupational exposure in solid waste processing facilities. **Ann Occup Hyg**, 57, n. 9, p. 1115-1127, Nov 2013.

CHEN, P. S.; TORIBARA, T. Y.; WARNER, H. Microdetermination of Phosphorus. **Anal Chem**, 28, n. 11, p. 1756–1758, 1956.

CHERRIE, J. W.; SEMPLE, S.; CHRISTOPHER, Y.; SALEEM, A. *et al.* How important is inadvertent ingestion of hazardous substances at work? **Ann Occup Hyg**, 50, n. 7, p. 693-704, Oct 2006.

COMLURB. Caracterização bacteriológica dos resíduos sólidos domiciliares coletados pela COMLURB no Município do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ: Companhia Municipal de Limpeza Urbana 2012.

COMLURB. Principais características do lixo domiciliar: composição gravimétrica percentual, peso específico e teor de umidade segundo Áreas de Planejamento (AP) do Município do Rio de Janeiro entre 1995-2019. 1494. COMLURB - Companhia Municipal de Limpeza Urbana - Rio de Janeiro, RJ.: Data.Rio - Instituto Pereira Passos 2020a.

COMLURB. Total do lixo domiciliar coletado por ano, segundo Áreas de Planejamento (AP), Regiões de Planejamento (RP) e Regiões Administrativas (RA) - Município do Rio de Janeiro - 2010 - 2019. COMLURB - Companhia Municipal de Limpeza Urbana - Rio de Janeiro, RJ.: Data.Rio - Instituto Pereira Passos 2020b.

COMLURB. Resíduos sólidos provenientes dos serviços de coleta e extensão de varrição de sarjeta - Município do Rio de Janeiro - 2003-2019. 2668. COMLURB - Companhia Municipal de Limpeza Urbana - Rio de Janeiro, RJ.: Data.Rio - Instituto Pereira Passos 2021a.

COMLURB. Unidades de Processamento de Resíduos Sólidos Urbanos segundo tipo, início de operação, licença ambiental, operação e volume de resíduo recebido por tipo – Município do Rio de Janeiro – 2019. 2694. COMLURB - Companhia Municipal de Limpeza Urbana - Rio de Janeiro, RJ.: Data.Rio - Instituto Pereira Passos 2021b.

CONAMA. RESOLUÇÃO Nº 430, de 13 de mai. de 2011. Brasília, DF.: Conselho Nacional do Meio Ambiente, Ministério do Meio Ambiente 2011.

COOPER, R. C.; POTTER, J. L.; LEONG, C. Virus survival in solid waste leachates. **Water Research**, 9, n. 8, p. 733-739, 1975.

CORRAO, C. R.; MAZZOTTA, A.; LA TORRE, G.; DE GIUSTI, M. Biological risk and occupational health. **Ind Health**, 50, n. 4, p. 326-337, 2012.

COSTA, A. M.; ALFAIA, R. G. S. M.; CAMPOS, J. C. Landfill leachate treatment in Brazil - An overview. **J Environ Manage**, 232, p. 110-116, Feb 2019.

COSTA, A. M.; DA COSTA E SILVA, C. A. M.; ALVES DAFLON, S. D.; QUINTAES, B. R. *et al.* Evaluation of toxic potential of leachate originating from experimental landfill cells containing household waste and healthcare waste. **Waste Manag Res**, 37, n. 10, p. 1003-1011, Oct 2019.

COUDRAY-MEUNIER, C.; FRAISSE, A.; MARTIN-LATIL, S.; GUILLIER, L. *et al.* Discrimination of infectious hepatitis A virus and rotavirus by combining dyes and surfactants with RT-qPCR. **BMC Microbiol**, 13, p. 216, Oct 2013.

CRUVINEL, V. R. N.; ZOLNIKOV, T. R.; TAKASHI OBARA, M.; OLIVEIRA, V. T. L. *et al.* Vector-borne diseases in waste pickers in Brasilia, Brazil. **Waste Manag**, 105, p. 223-232, Mar 15 2020.

D-WASTE. **Waste Atlas**. 2021. Disponível em: <http://www.atlas.d-waste.com/>. Acesso em: 30/04/2021.

DESSELBERGER, U. Rotaviruses. **Virus Res**, 190, p. 75-96, Sep 2014.

EDUARDO, J. **Avaliação das características microbiológicas e físico-químicas do lixiviado (chorume) no processo de tratamento do Aterro Metropolitano de Gramacho (Rj - Brasil)**. 2007. (Dissertação de Mestrado) - Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

ELMAADAWY, K.; LIU, B.; HU, J.; HOU, H. *et al.* Performance evaluation of microbial fuel cell for landfill leachate treatment: Research updates and synergistic effects of hybrid systems. **J Environ Sci (China)**, 96, p. 1-20, Oct 2020.

EMENIKE, C. U.; FAUZIAH, S. H.; AGAMUTHU, P. Whole Effluent Toxicity from Active and Inactive Landfills: Variation of Leachate Impact on Fish (*Pangasius sutchi*). **Advanced Science Letters**, 19, n. 9, p. 2681-2689.

FERNANDEZ-CASSI, X.; TIMONEDA, N.; MARTÍNEZ-PUCHOL, S.; RUSIÑOL, M. *et al.* Metagenomics for the study of viruses in urban sewage as a tool for public health surveillance. **Sci Total Environ**, 618, p. 870-880, Mar 2018.

FLEWETT, T. H.; BRYDEN, A. S.; DAVIES, H. Letter: Virus particles in gastroenteritis. **Lancet**, 2, n. 7844, p. 1497, Dec 1973.

FONGARO, G.; HERNÁNDEZ, M.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. C.; BARARDI, C. R. *et al.* Propidium Monoazide Coupled with PCR Predicts Infectivity of Enteric Viruses in Swine Manure and Biofertilized Soil. **Food Environ Virol**, 8, n. 1, p. 79-85, Mar 2016.

FOX, J.; WEISBERG, S. Model Selection (chapter 4.5). *In: An R Companion to Applied Regression*. Thousand Oaks CA, 2011.

FUMIAN, T. M.; LEITE, J. P.; CASTELLO, A. A.; GAGGERO, A. *et al.* Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. **J Virol Methods**, 170, n. 1-2, p. 42-46, Dec 2010.

FUMIAN, T. M.; LEITE, J. P.; ROSE, T. L.; PRADO, T. *et al.* 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**, 45, n. 17, p. 5755-5763, Nov 01 2011.

FUMIAN, T. M.; VICTORIA, M.; VIEIRA, C. B.; FIORETTI, J. M. *et al.* Enteric viruses' dissemination in a private reserve of natural heritage. **Lett Appl Microbiol**, 66, n. 4, p. 313-320, Apr 2018.

GENSBERGER, E. T.; KOSTIĆ, T. Novel tools for environmental virology. **Curr Opin Virol**, 3, n. 1, p. 61-68, Feb 2013.

GERBA, C. P.; BETANCOURT, W. Q. Viral Aggregation: Impact on Virus Behavior in the Environment. **Environ Sci Technol**, 51, n. 13, p. 7318-7325, Jul 2017.

GERBA, C. P.; CASTRO-DEL CAMPO, N.; BROOKS, J. P.; PEPPER, I. L. Exposure and risk assessment of Salmonella in recycled residuals. **Water Sci Technol**, 57, n. 7, p. 1061-1065, 2008.

GERBA, C. P.; TAMIMI, A. H.; PETTIGREW, C.; WEISBROD, A. V. *et al.* Sources of microbial pathogens in municipal solid waste landfills in the United States of America. **Waste Manag Res**, 29, n. 8, p. 781-790, Aug 2011.

GHOSH, P.; GUPTA, A.; THAKUR, I. S. Combined chemical and toxicological evaluation of leachate from municipal solid waste landfill sites of Delhi, India. **Environ Sci Pollut Res Int**, 22, n. 12, p. 9148-9158, Jun 2015.

GHOSH, P.; THAKUR, I. S.; KAUSHIK, A. Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: A review. **Ecotoxicol Environ Saf**, 141, p. 259-270, Jul 2017.

GOPALKRISHNA, V.; GANORKAR, N. N.; PATIL, P. R. Identification and molecular characterization of adenovirus types (HAdV-8, HAdV-37, HAdV-4, HAdV-3) in an epidemic of keratoconjunctivitis occurred in Pune, Maharashtra, Western India. **J Med Virol**, 88, n. 12, p. 2100-2105, 12 2016.

GORMAN NG, M.; SEMPLE, S.; CHERRIE, J. W.; CHRISTOPHER, Y. *et al.* The relationship between inadvertent ingestion and dermal exposure pathways: a new integrated conceptual model and a database of dermal and oral transfer efficiencies. **Ann Occup Hyg**, 56, n. 9, p. 1000-1012, Nov 2012.

GRISEY, E.; BELLE, E.; DAT, J.; MUDRY, J. *et al.* Survival of pathogenic and indicator organisms in groundwater and landfill leachate through coupling bacterial enumeration with tracer tests **Desalination**, 261, n. 1-2, p. 162-168, 2010.

GROUP, W. B. Occupational and Environmental Health Issues of Solid Waste Management Special Emphasis on Middle- and Lower-Income Countries. 1818 H Street NW Washington, DC 20433: The International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank 2006.

GUO, J.; BOLDUC, B.; ZAYED, A. A.; VARSANI, A. *et al.* VirSorter2: a multi-classifier, expert-guided approach to detect diverse DNA and RNA viruses. **Microbiome**, 9, n. 1, p. 37, 02 2021.

GUTIERREZ, M. B.; FIALHO, A. M.; MARANHÃO, A. G.; MALTA, F. C. *et al.* Rotavirus A in Brazil: Molecular Epidemiology and Surveillance during 2018-2019. **Pathogens**, 9, n. 7, Jun 2020.

HAAS, C. N.; ROSE, J. B.; GERBA, C. P. **Quantitative Microbial Risk Assessment**. New Jersey: 2014. 441 p.

HARAMOTO, E.; KITAJIMA, M.; HATA, A.; TORREY, J. R. *et al.* A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. **Water Res**, 135, p. 168-186, 05 2018.

HENDGES, L. T.; REINHER, R. C. R.; LEICHTWEIS, J.; FERNANDES, E. J. *et al.* Disposição final de lodo de estação de tratamento de água e de esgoto: uma revisão. Anais do 9º Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão - SIEPE. Santana do Livramento: Universidade Federal do Pampa 2017.

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

HEWITT, J.; GREENING, G. E.; LEONARD, M.; LEWIS, G. D. Evaluation of human adenovirus and human polyomavirus as indicators of human sewage contamination in the aquatic environment. **Water Res**, 47, n. 17, p. 6750-6761, Nov 2013.

HOORNWEG, D.; BHADA-TATA, P. What a waste: a global review of solid waste management. Urban Development Series. Washington, DC: World Bank Group 2012.

HSE. **Inadvertent ingestion exposure in the workplace. Phase I - Literature review**. Research Park North, Riccarton Edinburgh, EH14 4AP: Institute of Occupational Medicine, 2007. (Health and Safety Executive).

HUNDESA, A.; MALUQUER DE MOTES, C.; BOFILL-MAS, S.; ALBINANA-GIMENEZ, N. *et al.* Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. **Appl Environ Microbiol**, 72, n. 12, p. 7886-7893, Dec 2006.

IACONELLI, M.; VALDAZO-GONZÁLEZ, B.; EQUESTRE, M.; CICCAGLIONE, A. R. *et al.* Molecular characterization of human adenoviruses in urban wastewaters using next generation and Sanger sequencing. **Water Res**, 121, p. 240-247, 09 2017.

ICTV. ICTV 9th Report - Adenoviridae. 2011.

ICTV. **Virus Taxonomy: 2020 Release.** 2020. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.

INEA. NT-202.R-10 - Critérios e padrões para lançamento de efluentes líquidos. Estado do Rio de Janeiro: Instituto Estadual do Ambiente, Governo do Estado do Rio de Janeiro 1986.

INEA. NOP-INEA-45. Conema N° 90, 8 de fev. de 2021. Estado do Rio de Janeiro: Instituto Estadual do Ambiente - Governo do Estado do Rio de Janeiro 2021.

IPP. Lista de bairros e áreas de planejamento (AP). Município do Rio de Janeiro, RJ: Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro, Instituto Pereira Passos - IPP 2012.

ITURRIZA GÓMARA, M.; WONG, C.; BLOME, S.; DESSELBERGER, U. *et al.* Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. **J Virol**, 76, n. 13, p. 6596-6601, Jul 2002.

IVENS, U. I.; BREUM, N. O.; EBBEHØJ, N.; NIELSEN, B. H. *et al.* Exposure-response relationship between gastrointestinal problems among waste collectors and bioaerosol exposure. **Scand J Work Environ Health**, 25, n. 3, p. 238-245, Jun 1999.

IZQUIERDO-LARA, R.; ELSINGA, G.; HEIJNEN, L.; MUNNINK, B. B. O. *et al.* Monitoring SARS-CoV-2 Circulation and Diversity through Community Wastewater Sequencing, the Netherlands and Belgium. **Emerg Infect Dis**, 27, n. 5, p. 1405-1415, 05 2021.

JAHNE, M. A.; ROGERS, S. W.; HOLSEN, T. M.; GRIMBERG, S. J. Quantitative microbial risk assessment of bioaerosols from a manure application site. **Aerobiologia**, 31, n. 1, p. 73-87, 2015.

JANEIRO, R. D. Lei N° 8.598, de 31 de out. de 2019. Estado do Rio de Janeiro: Governo do Estado do Rio de Janeiro 2019.

JANEIRO, R. D. Lei N° 9.055, de 8 de out. de 2020. Estado do Rio de Janeiro: Governo do Estado do Rio de Janeiro 2020.

JAYAWARDHANA, Y.; KUMARATHILAKA, P.; HERATH, I.; VITHANAGE, M. Municipal solid waste biochar for prevention of pollution from landfill leachate. *In: Environmental materials and waste*: Academic Press, 2016. p. 117-148.

JUNIOR, S. F. S.; AMARAL, I. C. C.; MANNARINO, C. F.; HAUSER-DAVIS, R. A. *et al.* Long-term landfill leachate exposure modulates antioxidant responses and causes cytogenotoxic effects in *Eisenia andrei* earthworms. 117351, 2021.

KAAS, L.; OGORZALY, L.; LECELLIER, G.; BERTEAUX-LECELLIER, V. *et al.* Detection of Human Enteric Viruses in French Polynesian Wastewaters, Environmental Waters and Giant Clams. **Food Environ Virol**, 11, n. 1, p. 52-64, 03 2019.

KATAYAMA, H.; SHIMASAKI, A.; OHGAKI, S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. **Appl Environ Microbiol**, 68, n. 3, p. 1033-1039, Mar 2002.

KAZA, S.; YAO, L.; BHADA-TATA, P.; WOERDEN, F. V. **What a waste 2.0: a global snapshot of solid waste management to 2050**. International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank. 1818 H Street NW, Washington, DC 20433, p. 295. 2018.

KIVIRANTA, H.; TUOMAINEN, A.; REIMAN, M.; LAITINEN, S. *et al.* Exposure to airborne microorganisms and volatile organic compounds in different types of waste handling. **Ann Agric Environ Med**, 6, n. 1, p. 39-44, 1999.

KOUAMÉ, P. K.; NGUYEN-VIET, H.; DONGO, K.; ZURBRÜGG, C. *et al.* Microbiological risk infection assessment using QMRA in agriculture systems in Côte d'Ivoire, West Africa. **Environ Monit Assess**, 189, n. 11, p. 587, Oct 2017.

KOVAC, K.; GUTIÉRREZ-AGUIRRE, I.; BANJAC, M.; PETERKA, M. *et al.* A novel method for concentrating hepatitis A virus and caliciviruses from bottled water. **J Virol Methods**, 162, n. 1-2, p. 272-275, Dec 2009.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C. *et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Mol Biol Evol**, 35, n. 6, p. 1547-1549, 06 2018.

LABADIE, T.; BATÉJAT, C.; LECLERCQ, I.; MANUGUERRA, J. C. Historical Discoveries on Viruses in the Environment and Their Impact on Public Health. **Intervirology**, 63, n. 1-6, p. 17-32, 2020.

LANZARINI, N. M.; MARINHO MATA, R.; MENDES SAGGIORO, E.; COSTA MOREIRA, J. *et al.* Evaluation of Viral Recovery Methodologies from Solid Waste Landfill Leachate. **Food Environ Virol**, Jun 2020.

LAUSCH, K. R.; WESTH, L.; KRISTENSEN, L. H.; LINDBERG, J. *et al.* Rotavirus is frequent among adults hospitalised for acute gastroenteritis. **Dan Med J**, 64, n. 1, Jan 2017.

LEIFELS, M.; CHENG, D.; SOZZI, E.; SHOULTS, D. C. *et al.* Capsid integrity quantitative PCR to determine virus infectivity in environmental and food applications - A systematic review. **Water Res X**, 11, p. 100080, May 2021.

LEIFELS, M.; HAMZA, I. A.; KRIEGER, M.; WILHELM, M. *et al.* From Lab to Lake - Evaluation of Current Molecular Methods for the Detection of Infectious Enteric Viruses in Complex Water Matrices in an Urban Area. **PLoS One**, 11, n. 11, p. e0167105, 2016.

LI, D.; LUO, R.; LIU, C. M.; LEUNG, C. M. *et al.* MEGAHIT v1.0: A fast and scalable metagenome assembler driven by advanced methodologies and community practices. **Methods**, 102, p. 3-11, 06 2016.

LI, Q.; QIU, Y.; PANG, X. L.; ASHBOLT, N. J. Spiked Virus Level Needed To Correctly Assess Enteric Virus Recovery in Water Matrices. **Appl Environ Microbiol**, 85, n. 12, Jun 2019.

LIMA, L. S. M. S.; DE ALMEIDA, R.; QUINTAES, B. R.; BILA, D. M. *et al.* Evaluation of humic substances removal from leachates originating from solid waste landfills in Rio de Janeiro State, Brazil. **J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng**, 52, n. 9, p. 828-836, Jul 2017.

LIPPI, M.; LEY, M. B. R. G.; MENDEZ, G. P.; JUNIOR, R. A. F. C. State of Art of Landfill Leachate Treatment: Literature Review and Critical Evaluation. **Ciência e Natura**, 40, n. e78, 2018.

LIU, S. J.; XI, B. D.; QIU, Z. P.; HE, X. S. *et al.* Succession and diversity of microbial communities in landfills with depths and ages and its association with dissolved organic matter and heavy metals. **Sci Total Environ**, 651, n. Pt 1, p. 909-916, Feb 15 2019.

LIZASOAIN, A.; TORT, L. F. L.; GARCÍA, M.; GILLMAN, L. *et al.* Human enteric viruses in a wastewater treatment plant: evaluation of activated sludge combined with UV disinfection process reveals different removal performances for viruses with different features. **Lett Appl Microbiol**, 66, n. 3, p. 215-221, Mar 2018.

LOPEZ, G. U.; GERBA, C. P.; TAMIMI, A. H.; KITAJIMA, M. *et al.* Transfer efficiency of bacteria and viruses from porous and nonporous fomites to fingers under different relative humidity conditions. **Appl Environ Microbiol**, 79, n. 18, p. 5728-5734, Sep 2013.

LUN, J. H.; CROSBIE, N. D.; WHITE, P. A. Genetic diversity and quantification of human mastadenoviruses in wastewater from Sydney and Melbourne, Australia. **Sci Total Environ**, 675, p. 305-312, Jul 2019.

MADSEN, A. M.; ALWAN, T.; ØRBERG, A.; UHRBRAND, K. *et al.* Waste Workers' Exposure to Airborne Fungal and Bacterial Species in the Truck Cab and During Waste Collection. **Ann Occup Hyg**, 60, n. 6, p. 651-668, Jul 2016.

MADSEN, A. M.; FREDERIKSEN, M. W.; BJERREGAARD, M.; TENDAL, K. Measures to reduce the exposure of waste collection workers to handborne and airborne microorganisms and inflammogenic dust. **Waste Manag**, 101, p. 241-249, Jan 2020.

MANNARINO, C. F.; FERREIRA, J. A.; MOREIRA, J. C. Tratamento combinado de lixiviado de aterros de resíduos sólidos urbanos e esgoto doméstico como alternativa para a solução de um grave problema ambiental e de saúde pública - revisão bibliográfica. **Cad Saúde Colet**, 19, n. 1, p. 11-19, 2011.

MANNARINO, C. F.; MOREIRA, J. C.; FERREIRA, J. A.; ARIAS, A. R. [Assessment of impacts of combined treatment of solid urban waste landfill leachate and sewage on aquatic biota]. **Cien Saude Colet**, 18, n. 11, p. 3235-3243, Nov 2013.

MARA, D.; SLEIGH, A. Estimation of norovirus and *Ascaris* infection risks to urban farmers in developing countries using wastewater for crop irrigation. **J Water Health**, 8, n. 3, p. 572-576, Sep 2010.

MARINHO, T. A.; LOPES, C. L.; TELES, S. A.; MATOS, M. A. *et al.* Epidemiology of hepatitis B virus infection among recyclable waste collectors in central Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, 47, n. 1, p. 18-23, 2014 Jan-Feb 2014.

MARINHO, T. A.; LOPES, C. L.; TELES, S. A.; REIS, N. R. *et al.* Prevalence of hepatitis C virus infection among recyclable waste collectors in Central-West Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 108, n. 4, p. 519-522, Jun 2013.

MARTINS, R. M.; FREITAS, N. R.; KOZLOWSKI, A.; REIS, N. R. *et al.* Seroprevalence of hepatitis E antibodies in a population of recyclable waste pickers in Brazil. **J Clin Virol**, 59, n. 3, p. 188-191, Mar 2014.

MARTÍNEZ-PUCHOL, S.; RUSIÑOL, M.; FERNÁNDEZ-CASSI, X.; TIMONEDA, N. *et al.* Characterisation of the sewage virome: comparison of NGS tools and occurrence of significant pathogens. **Sci Total Environ**, 713, p. 136604, Apr 2020.

MASCIOPINTO, C.; DE GIGLIO, O.; SCRASCIA, M.; FORTUNATO, F. *et al.* Human health risk assessment for the occurrence of enteric viruses in drinking water from wells: Role of flood runoff injections. **Sci Total Environ**, 666, p. 559-571, May 2019.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; MCDONALD, S. M.; ATTOUI, H. *et al.* Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Arch Virol**, 156, n. 8, p. 1397-1413, Aug 2011.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; RAHMAN, M.; ATTOUI, H. *et al.* Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Arch Virol**, 153, n. 8, p. 1621-1629, 2008.

MATTIOLI, M. C.; DAVIS, J.; BOEHM, A. B. Hand-to-mouth contacts result in greater ingestion of feces than dietary water consumption in Tanzania: a quantitative fecal exposure assessment model. **Environ Sci Technol**, 49, n. 3, p. 1912-1920, Feb 2015.

MAVROPOULOS, A. Saúde desperdiçada: o caso dos lixões. ISWA. 2015.

MCCALL, C.; WU, H.; MIYANI, B.; XAGORARAKI, I. Identification of multiple potential viral diseases in a large urban center using wastewater surveillance. **Water Res**, 184, p. 116160, Oct 2020.

MEDEMA, G. J.; WULLINGS, B.; ROELEVELD, P.; KOUIJ, D. Risk assessment of *Legionella* and enteric pathogens in sewage treatment works. **Water Science and Technology: Water Supply**, 4, n. 2, 2004.

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**, 49, p. 461-487, 1995.

MICHEN, B.; GRAULE, T. Isoelectric points of viruses. **J Appl Microbiol**, 109, n. 2, p. 388-397, Aug 2010.

MOL, M. P. G.; CAIRNCROSS, S.; GRECO, D. B.; HELLER, L. Urban Waste Collectors in Belo Horizonte, Brazil: Their Perceptions of Occupational Health Risk. **Qual Health Res**, 29, n. 3, p. 371-381, 02 2019.

MOL, M. P. G.; CALDAS, S. Can the human coronavirus epidemic also spread through solid waste? **Waste Manag Res**, 38, n. 5, p. 485-486, May 2020.

NEMEROW, G. R.; STEWART, P. L.; REDDY, V. S. Structure of human adenovirus. **Curr Opin Virol**, 2, n. 2, p. 115-121, Apr 2012.

NOGUEIRA, I. D. A. Recuperação De Lixões: Proposta De Metodologia De Apoio À Tomada De Decisão. Juiz de Fora, MG: Universidade Federal de Juiz de Fora 2015.

OKOH, A. I.; SIBANDA, T.; GUSHA, S. S. Inadequately treated wastewater as a source of human enteric viruses in the environment. **Int J Environ Res Public Health**, 7, n. 6, p. 2620-2637, 06 2010.

OPEL, K. L.; CHUNG, D.; MCCORD, B. R. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. **J Forensic Sci**, 55, n. 1, p. 25-33, Jan 2010.

O'LEARY, P. R.; TCHOBANOGLOUS, G.; KREITH, F. **Handbook of solid waste management**. New York: McGraw-Hill, 2002.

PARK, D. U.; RYU, S. H.; KIM, S. B.; YOON, C. S. An assessment of dust, endotoxin, and microorganism exposure during waste collection and sorting. **J Air Waste Manag Assoc**, 61, n. 4, p. 461-468, Apr 2011.

PAYNE, S. Methods to Study Viruses. *In*: RESERVED., C. E. I. A. R. (Ed.). **Viruses: From Understanding to Investigation**. Department of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Texas A&M University, College Station, Texas, United States: Academic Press, 2017. p. 37-52.

PENTEADO, C. S. G.; CASTRO, M. A. S. Covid-19 effects on municipal solid waste management: What can effectively be done in the Brazilian scenario? **Resour Conserv Recycl**, 164, p. 105152, Jan 2021.

PINA, S.; JOFRE, J.; EMERSON, S. U.; PURCELL, R. H. *et al.* Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. **Appl Environ Microbiol**, 64, n. 11, p. 4485-4488, Nov 1998.

PLATTS-MILLS, J. A.; LIU, J.; ROGAWSKI, E. T.; KABIR, F. *et al.* Use of quantitative molecular diagnostic methods to assess the aetiology, burden, and clinical characteristics of diarrhoea in children in low-resource settings: a reanalysis of the MAL-ED cohort study. **Lancet Glob Health**, 6, n. 12, p. e1309-e1318, 12 2018.

POULSEN, O. M.; BREUM, N. O.; EBBEHØJ, N.; HANSEN, A. M. *et al.* Collection of domestic waste. Review of occupational health problems and their possible causes. **Sci Total Environ**, 170, n. 1-2, p. 1-19, Aug 1995.

PRADO, T.; DE CASTRO BRUNI, A.; BARBOSA, M. R. F.; GARCIA, S. C. *et al.* Performance of wastewater reclamation systems in enteric virus removal. **Sci Total Environ**, 678, p. 33-42, Aug 15 2019.

PRADO, T.; FUMIAN, T. M.; MANNARINO, C. F.; MARANHÃO, A. G. *et al.* Preliminary results of SARS-CoV-2 detection in sewerage system in Niterói municipality, Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 115, p. e200196, 2020.

PRADO, T.; FUMIAN, T. M.; MANNARINO, C. F.; RESENDE, P. C. *et al.* Wastewater-based epidemiology as a useful tool to track SARS-CoV-2 and support public health policies at municipal level in Brazil. **Water Res**, 191, p. 116810, Mar 2021.

PRADO, T.; FUMIAN, T. M.; MIAGOSTOVICH, M. P.; GASPAR, A. M. Monitoring the hepatitis A virus in urban wastewater from Rio de Janeiro, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 106, n. 2, p. 104-109, Feb 2012.

PRADO, T.; GASPAR, A. M.; MIAGOSTOVICH, M. P. Detection of enteric viruses in activated sludge by feasible concentration methods. **Braz J Microbiol**, 45, n. 1, p. 343-349, 2014.

PRADO, T.; MIAGOSTOVICH, M. P. [Environmental virology and sanitation in Brazil: a narrative review]. **Cad Saude Publica**, 30, n. 7, p. 1367-1378, Jul 2014.

PRADO, T.; SILVA, D. M.; GUILAYN, W. C.; ROSE, T. L. *et al.* Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. **Water Res**, 45, n. 3, p. 1287-1297, Jan 2011.

PURPARI, G.; MACALUSO, G.; DI BELLA, S.; GUCCIARDI, F. *et al.* Molecular characterization of human enteric viruses in food, water samples, and surface swabs in Sicily. **Int J Infect Dis**, 80, p. 66-72, Mar 2019.

RAJAL, V. B.; MCSWAIN, B. S.; THOMPSON, D. E.; LEUTENEGGER, C. M. *et al.* Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. **Water Res**, 41, n. 7, p. 1411-1422, Apr 2007.

RAMAKRISHNAN, M. A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. **World J Virol**, 5, n. 2, p. 85-86, May 2016.

RAMES, E.; ROIKO, A.; STRATTON, H.; MACDONALD, J. Technical aspects of using human adenovirus as a viral water quality indicator. **Water Res**, 96, p. 308-326, 06 2016.

RANDAZZO, W.; LÓPEZ-GÁLVEZ, F.; ALLENDE, A.; AZNAR, R. *et al.* Evaluation of viability PCR performance for assessing norovirus infectivity in fresh-cut vegetables and irrigation water. **Int J Food Microbiol**, 229, p. 1-6, Jul 2016.

RASHEDUZZAMAN, M.; SINGH, R.; HAAS, C. N.; TOLOFARI, D. *et al.* Reverse QMRA as a Decision Support Tool: Setting Acceptable Concentration Limits for *Pseudomonas aeruginosa* and *Naegleria fowleri*. 11, n. 9, 2019.

REIS, T. A.; ASSIS, A. S.; DO VALLE, D. A.; BARLETTA, V. H. *et al.* The role of human adenoviruses type 41 in acute diarrheal disease in Minas Gerais after rotavirus vaccination. **Braz J Microbiol**, 47, n. 1, p. 243-250, 2016 Jan-Mar 2016.

RESENDE, P. C.; MOTTA, F. C.; ROY, S.; APPOLINARIO, L. *et al.* SARS-CoV-2 genomes recovered by long amplicon tiling multiplex approach using nanopore sequencing and applicable to other sequencing platforms. **BioRxiv preprint**, 2020.

RITTER, E.; MANNARINO, C. F.; VAN ELK, A. G.; FERREIRA, J. A. Gestão de Resíduos Sólidos. In: SANTOS, A. S. P. e OHNUMA JR., A. A. (Ed.). **Engenharia e Meio Ambiente - Aspectos Conceituais e Práticos**. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2021. cap. 10, p. 215-237.

ROSARIO, K.; NILSSON, C.; LIM, Y. W.; RUAN, Y. *et al.* Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. **Environ Microbiol**, 11, n. 11, p. 2806-2820, Nov 2009.

ROUX, S. Metagenomics in Virology. **Encyclopedia of Virology**, 1, n. 4, p. 133-140, 2021.

RUSIN, P.; MAXWELL, S.; GERBA, C. Comparative surface-to-hand and fingertip-to-mouth transfer efficiency of gram-positive bacteria, gram-negative bacteria, and phage. **J Appl Microbiol**, 93, n. 4, p. 585-592, 2002.

RUX, J. J.; BURNETT, R. M. Adenovirus structure. **Hum Gene Ther**, 15, n. 12, p. 1167-1176, Dec 2004.

RÖNNQVIST, M.; AHO, E.; MIKKELÄ, A.; RANTA, J. *et al.* Norovirus transmission between hands, gloves, utensils, and fresh produce during simulated food handling. **Appl Environ Microbiol**, 80, n. 17, p. 5403-5410, Sep 2014.

SALES JUNIOR, S. F.; MANNARINO, C. F.; BILA, D. M.; TAVEIRA PARENTE, C. E. *et al.* Lethal and long-term effects of landfill leachate on *Eisenia andrei* earthworms: Behavior, reproduction and risk assessment. **J Environ Manage**, 285, p. 112029, May 2021.

SAMPSON, A.; OWUSU-ANSAH, E. D. G. J.; MILLS-ROBERTSON, F. C.; AYI, I. *et al.* Probabilistic quantitative microbial risk assessment model of farmer exposure to *Cryptosporidium* spp. in irrigation water within Kumasi Metropolis-Ghana. **Microbial Risk Analysis**, 6, p. 1-8, 2017.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Virologia Humana**. Rio de Janeiro: Grupo Gen, 2015.

SATTAR, S. A.; IJAZ, M. K.; GERBA, C. P. Spread of viral infections by aerosols. **Critical Reviews in Environmental Control**, 17, 1987.

SAWAMURA, H.; YAMADA, M.; ENDO, K.; SODA, S. *et al.* Characterization of microorganisms at different landfill depths using carbon-utilization patterns and 16S rRNA gene based T-RFLP. **J Biosci Bioeng**, 109, n. 2, p. 130-137, Feb 2010.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, 27, n. 6, p. 863-864, Mar 2011.

SEIDU, R.; DRECHSEL, P.; AMOAH, P.; LÖFMAN, O. *et al.* Quantitative microbial risk assessment of wastewater and faecal sludge reuse in Ghana. In: Access to sanitation and safe water - Global partnerships and local actions: Proceedings of the 33rd WEDC International Conference, 2008, Accra, Ghana. WEDC, Loughborough University, p. 121-127. Disponível em: <https://hdl.handle.net/2134/30637>.

SHARPS, C. P.; KOTWAL, G.; CANNON, J. L. Human norovirus transfer to stainless steel and small fruits during handling. **J Food Prot**, 75, n. 8, p. 1437-1446, Aug 2012.

SHATKIN, J. A.; SMITH, J.; MOYER, N. Evaluating Children's Health Risk from Exposure to Municipal Solid Waste Truck Leachate in the United States: Complementary Evidence-Based and Risk-Based Assessments. **Journal of Children's Health**, 2, n. 3-4, p. 321-343, 2005.

SILVA, C. A. M. D. C.; CAMPOS, J. C.; FERREIRA, J. A.; MIGUEL, M. A. L. *et al.* Microbiological characterization of leachate from domestic and hospital solid wastes from Rio de Janeiro city. **Eng Sanit Ambient**, 16, n. 2, p. 127-132, 2011.

SILVA, H. D.; PESSOA-DE-SOUZA, M. A.; FONGARO, G.; ANUNCIACÃO, C. E. *et al.* Behaviour and recovery of human adenovirus from tropical sediment under simulated conditions. **Sci Total Environ**, 530-531, p. 314-322, Oct 2015.

SILVA, J. S. **Estudo da interação do adenovírus humano, sorotipo 41 (HAdV-41), com células permissivas**. 2008. (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SINGH, K.; LALE, A.; EONG OOI, E.; CHIU, L. L. *et al.* A prospective clinical study on the use of reverse transcription-polymerase chain reaction for the early diagnosis of Dengue fever. **J Mol Diagn**, 8, n. 5, p. 613-616; quiz 617-620, Nov 2006.

SINIR. **Sistema Nacional de Informações sobre a Gestão dos Resíduos Sólidos 2019**. Disponível em: <https://sinir.gov.br/>.

SMEETS, P. W.; RIETVELD, L. C.; VAN DIJK, J. C.; MEDEMA, G. J. Practical applications of quantitative microbial risk assessment (QMRA) for water safety plans. **Water Sci Technol**, 61, n. 6, p. 1561-1568, 2010.

SNIS. **Diagnóstico do Manejo de Resíduos Sólidos Urbanos**. Brasília: Ministério do Desenvolvimento Regional, 2019. (Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento).

SOARES, H. E. O.; LOPES, C. L.; FREITAS, N. R.; SILVA, A. M. *et al.* High prevalence of hepatitis A antibodies among recyclable waste pickers, Central Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 55, n. 6, p. 433-434, 2013 Nov-Dec 2013.

SOBSEY, M. D. Field survey of enteric viruses in solid waste landfill leachates. **Am J Public Health**, 68, n. 9, p. 858-864, Sep 1978.

SOBSEY, M. D.; WALLIS, C.; MELNICK, J. L. Development of methods for detecting viruses in solid waste landfill leachates. **Appl Microbiol**, 28, n. 2, p. 232-238, Aug 1974.

SOBSEY, M. D.; WALLIS, C.; MELNICK, J. L. Studies on the survival and fate of enteroviruses in an experimental model of a municipal solid waste landfill and leachate. **Appl Microbiol**, 30, n. 4, p. 565-574, Oct 1975.

SOUTO, G. D. Lixiviado de aterros sanitários brasileiros: estudo de remoção do nitrogênio amoniacal por processo de arraste com ar (stripping). Tese de Doutorado, 2009.

SOUTO, G. D. B.; POVINELLI, J. Resíduos Sólidos. *In*: CALIJURI, M. C. e CUNHA, D. G. F. (Ed.). Elsevier, 2013.

- STAGGEMEIER, R.; HECK, T. M. S.; DEMOLINER, M.; RITZEL, R. G. F. *et al.* Enteric viruses and adenovirus diversity in waters from 2016 Olympic venues. **Sci Total Environ**, 586, p. 304-312, May 15 2017.
- STALS, A.; BAERT, L.; VAN COILLIE, E.; UYTTENDAELE, M. Evaluation of a norovirus detection methodology for soft red fruits. **Food Microbiol**, 28, n. 1, p. 52-58, Feb 2011.
- STALS, A.; UYTTENDAELE, M.; BAERT, L.; VAN COILLIE, E. Norovirus transfer between foods and food contact materials. **J Food Prot**, 76, n. 7, p. 1202-1209, Jul 2013.
- TAN, M.; JIANG, X. Norovirus-host interaction: implications for disease control and prevention. **Expert Rev Mol Med**, 9, n. 19, p. 1-22, Jul 2007.
- TANNER, B. D.; BROOKS, J. P.; GERBA, C. P.; HAAS, C. N. *et al.* Estimated occupational risk from bioaerosols generated during land application of class B biosolids. **J Environ Qual**, 37, n. 6, p. 2311-2321, 2008 Nov-Dec 2008.
- TATE, J. E.; BURTON, A. H.; BOSCHI-PINTO, C.; PARASHAR, U. D. *et al.* Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000-2013. **Clin Infect Dis**, 62 Suppl 2, p. S96-S105, May 2016.
- TCHOBANOGLIOUS, G.; KREITH, F. **Handbook of solid waste management**. New York, USA: McGraw-Hill Education, 2002.
- TEAM, R. C. R: A Language and Environment for Statistical Computing. COMPUTING, R. F. F. S. Vienna 2018.
- TEUNIS, P.; SCHIJVEN, J.; RUTJES, S. A generalized dose-response relationship for adenovirus infection and illness by exposure pathway. **Epidemiol Infect**, 144, n. 16, p. 3461-3473, Dec 2016.
- THORN, J.; BEIJER, L.; RYLANDER, R. Airways inflammation and glucan exposure among household waste collectors. **Am J Ind Med**, 33, n. 5, p. 463-470, May 1998.
- TONINI, D.; MANFREDI, S.; BAKAS, I.; BROGAARD, L. K. *et al.* Life Cycle Assessment of Landfilling. In: COSSU, R. e STEGMANN, R. (Ed.). **Solid Waste Landfilling, Concepts, Processes**: Elsevier, 2019. p. 955-972.
- TULADHAR, E.; HAZELEGER, W. C.; KOOPMANS, M.; ZWIETERING, M. H. *et al.* Transfer of noroviruses between fingers and fomites and food products. **Int J Food Microbiol**, 167, n. 3, p. 346-352, Nov 2013.
- USEPA. Viral Persistence in Landfill Leachate. United Nation Environmental Protection Agency. Office of Research and Development Homeland Security Research Program. EPA/600/R-18/077 2018.
- VERANI, M.; FEDERIGI, I.; DONZELLI, G.; CIONI, L. *et al.* Human adenoviruses as waterborne index pathogens and their use for Quantitative Microbial Risk Assessment. **Sci Total Environ**, 651, n. Pt 1, p. 1469-1475, Feb 2019.

VIEIRA, C. B.; DE ABREU CORRÊA, A.; DE JESUS, M. S.; LUZ, S. L. *et al.* Viruses Surveillance Under Different Season Scenarios of the Negro River Basin, Amazonia, Brazil. **Food Environ Virol**, 8, n. 1, p. 57-69, Mar 2016.

VIEIRA, C. B.; MENDES, A. C. D. O.; OLIVEIRA, J. M. D.; GASPAR, A. M. C. *et al.* Vírus entéricos na Lagoa Rodrigo de Freitas. **Oecologia Australis**, 16, n. 3, 2012.

VIRALZONE. Mastadenovirus. 2021.

WANG, D.; URISMAN, A.; LIU, Y. T.; SPRINGER, M. *et al.* Viral discovery and sequence recovery using DNA microarrays. **PLoS Biol**, 1, n. 2, p. E2, Nov 2003.

WILHELMI, I.; ROMAN, E.; SÁNCHEZ-FAUQUIER, A. Viruses causing gastroenteritis. **Clin Microbiol Infect**, 9, n. 4, p. 247-262, Apr 2003.

WONG, K.; MUKHERJEE, B.; KAHLER, A. M.; ZEPP, R. *et al.* Influence of inorganic ions on aggregation and adsorption behaviors of human adenovirus. **Environ Sci Technol**, 46, n. 20, p. 11145-11153, Oct 2012.

WONG, M.; XAGORARAKI, I.; ROSE, J. B. Chapter 13 Recent Advances and Future Needs in Environmental Virology. **Perspect Med Virol**, 17, p. 259-284, 2007.

WYN-JONES, A. P.; SELLWOOD, J. Enteric viruses in the aquatic environment. **J Appl Microbiol**, 91, n. 6, p. 945-962, Dec 2001.

YAN, C.; LENG, Y. L.; WU, J. T. Quantitative microbial risk assessment for occupational health of temporary entrants and staffs equipped with various grade PPE and exposed to microbial bioaerosols in two WWTPs. **Int Arch Occup Environ Health**, Mar 2021.

YOUCAI, Z. **Pollution control Technology for Leachate from Municipal Solid Waste: landfills, incineration plants, and transfer stations.** Butterworth-Heinemann, 2019.

ZAINUDIN, A. **Determination of the factors influencing transfer of chemicals from the work environment to the skin and hence from hands to the peri-oral area.** 2004. (MSc thesis) -, University of Aberdeen, Aberdeen, UK.

ZENG, S. Q.; HALKOSALO, A.; SALMINEN, M.; SZAKAL, E. D. *et al.* One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. **J Virol Methods**, 153, n. 2, p. 238-240, Nov 2008.

ZUUR, A. F.; IENO, E. N.; ELPHICK, C. S. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. **Methods in Ecology and Evolution** 1, p. 3-14, 2010.