

cadernos técnicos engenharia sanitária e ambiental

Órgão Oficial de Informação Técnica da ABES - Rio de Janeiro

**Roteiros para análises e determinações
em amostras de esgoto**

ESA

A Revista Engenharia Sanitária e Ambiental, em conjunto com Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Estações Sustentáveis de Esgotamento Sanitário (INCT ETEs Sustentáveis), deu vida aos Cadernos de Nota Técnica ESA apresentado, onde tem por objetivo a publicação de contribuições técnicas e científicas nas áreas de saneamento, e suas interfaces. As contribuições são publicadas após aprovação do conselho editorial formado exclusivamente para este fim. Os artigos publicados não refletem necessariamente a opinião da Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental (ABES).

Diretor Responsável

Alceu Guérios Bittencourt

Editor Geral

André Bezerra dos Santos

Editor Geral Adjunto

Maurício Alves da Motta Sobrinho

Coordenação

Allan Rodrigues

INCT ETEs Sustentáveis

Coordenação Geral

Carlos Augusto de Lemos Chernicharo

Cesar Rossas Mota Filho

Juliana Calabria Araújo

Coordenadores Institucionais

Carlos Augusto de Lemos Chernicharo

André Bezerra dos Santos

Isaac Volschan Jr

Gustavo Rafael Collere Possetti

Lourdinha Florêncio

Paula Loureiro Paulo

Roque Passos Pivelli

Cadernos Técnicos ESA

Colaboração

Câmara Técnica de Tratamento de Esgoto (CTTE) da ABES

Conselho Editorial Geral

Carlos Augusto de Lemos Chernicharo

Rodrigo Moruzzi

Editores associados

Juliana Calabria Araújo

Lourdinha Florêncio

Sávia Gavazza

Editores Executivos

Lariza dos Santos Azevedo

Livia Cristina da Silva Lobato

Revisão, validação e editoração

Livia Cristina da Silva Lobato

Tiago Borges Ferreira

Vera Tainá Franco Vidal Mota

Correspondência

Avenida Beira Mar, 216, 13º andar

CEP: 20021-060 - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

Tel.: (21) 2277-3900 - E-mail: esa@abes-dn.org.br

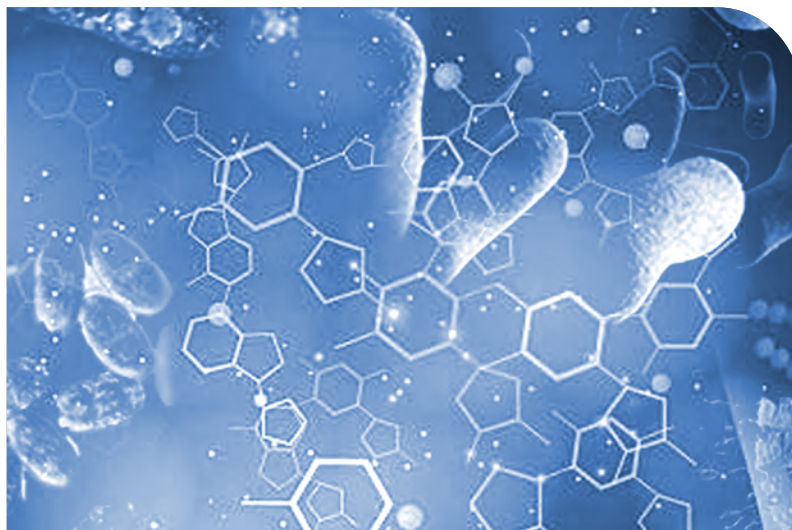
PRODUÇÃO EDITORIAL



Estatuto em Vigor: Alteração de Estatuto referendado pela Assembleia Geral Extraordinária realizada no Rio de Janeiro (RJ) em 08 de julho de 2011. Essa nova versão do Estatuto recebeu protocolo número 201108081358447 e foi averbada na matrícula número 1244 do Registro Civil de Pessoas Jurídicas do Rio de Janeiro em 25 de agosto de 2011.

cadernos técnicos engenharia sanitária e ambiental

Cadernos Técnico Eng Sanit Ambient | v2. n4. Especial | 2022 | jul/set



CORPO EDITORIAL PERMANENTE

Editor Geral: André Bezerra dos Santos, Universidade Federal do Ceará, Brasil

Editor Geral Adjunto: Maurício Alves da Motta Sobrinho, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

Editor Coordenador: Allan Rodrigues, Abes, Brasil

EDITORES ASSOCIADOS:

André Luiz de Oliveira, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil

Davi Gasparini Fernandes Cunha, Universidade de São Paulo, Brasil

Eraldo Henriques de Carvalho, Universidade Federal de Goiás, Brasil

João Paulo Bassin, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil

Jorge M.G.P. Isidoro, Universidade do Algarve, Portugal

Lisete Celina Lange, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil

Lucas Meili, Universidade Federal de Alagoas, Brasil

Luciana Paulo Gomes, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Brasil

Luciano Matos Queiroz, Universidade Federal da Bahia, Brasil

Luewton Lemos F. Agostinho, NHL Stenden University of Applied Sciences, Holanda

Luiza Girard Teixeira, Universidade Federal do Pará, Brasil

Marcelo Motta Veiga, Escola Nacional de Saúde Pública, Brasil

Maurício Alves da Motta Sobrinho, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

Pablo Heleno Sezerino, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

Paulo Sérgio Scalize, Universidade Federal de Goiás, Brasil

Raul Muñoz, Universidad de Valladolid, Spain

Rodrigo Moruzzi, Universidade Estadual Paulista, Brasil

Revista Engenharia Sanitária e Ambiental Fundada com o título Engenharia Sanitária em 1962 (vol.1, n.1, jun de 1962) com formato 18,0 x 26,0 cm, até o vol.12, n.3, quando foi adotado o formato A4. A partir do vol.28, abr./jun. de 1989, passou a chamar-se BIO, com o formato 21,0 x 28,0 cm, sendo a Engenharia Sanitária transformada em encarte técnico da BIO. A partir de 1996, retorna a Engenharia Sanitária, desta feita incorporando a palavra Ambiental (Ano I, n.1, jan./mar. 1996).

DIRETORIA NACIONAL

Presidente: Alceu Guérios Bittencourt; **Vice-Presidente:** Mario Cezar Guerino; **Secretário Geral:** Marcel Costa Sanches; **Secretário Adjunto:** Rafael Carvalho de O. Santos; **Tesoureiro Geral:** Maria Lúcia B. Coelho Silva; **Tesoureiro Adjunto:** Álvaro José Menezes da Costa; **Diretor Sul:** Edgard Faust Filho; **Diretora Sudeste:** Célia Regina Alves Rennó; **Diretor Centro-Oeste:** Marcos Elano F. Montenegro; **Diretora Nordeste:** Vanessa Britto Silveira Cardoso; **Diretor Norte:** Haroldo Costa Bezerra; **Coordenador de Relações Internacionais:** Carlos Alberto Rosito; **Coordenador do Programa Jovens Profissionais do Saneamento:** Witan Silva.

CONSELHO FISCAL

Efetivos: Carlos Alberto Rosito (RJ); Edson Melo Filizzola (GO); Miguel Mansur Aisse (PR).

Suplentes: Carlos Roberto Soares Mingione (SP); Hélio Nazareno Padula Filho (SP); Reynaldo Eduardo Young Ribeiro (SP)

CONSELHO DIRETOR

Membros Natos: Antônio César da Costa e Silva (SP), Antônio Marsiglia Netto (SP), Carlos Alberto Rosito (RJ), Cassilda Teixeira de Carvalho (MG), Clovis Francisco do Nascimento Filho (RJ), Dante Ragazzi Pauli (SP), Hugo de Mattos Santos (RJ), João Alberto Viol (SP), José Aurélio Boranga (SP), José Carlos Vieira (RJ), Lineu Rodrigues Alonso (SP), Luiz

Otávio Mota Pereira (PA), Nelson Rodrigues Nucci (SP), Paulo Cezar Pinto (RJ), Roberval Tavares de Souza (SP) e Walter Pinto Costa (RJ).

Membros Eleitos 2020/2022

Mario Cezar Guerino
Marcel Costa Sanches
Rafael Carvalho de O Santos
Maria Lúcia B. Coelho Silva
Álvaro José Menezes da Costa
Edgard Faust Filho
Célia Regina Alves Rennó
Marcos Heleno F. Montenegro
Vanessa Britto Silveira Cardoso
Haroldo Costa Bezerra
Carlos Alberto Rosito
Witan Silva

Presidentes das Seções Estaduais 2019/2021

Ana Catarina Pires de Azevedo Lopes (AL)
Rainier Pedraça de Azevedo (AM)
Arnor de Oliveira Fernandes Junior (BA)
Francisco Humberto de Carvalho Junior (CE)
Sergio Antonio Gonçalves (DF)

Edumar Ramos Cabral Coelho (ES)
Marisa Pignataro de Sant'anna (GO)
Nelson José Bello Cavalcante (MA)
Rogerio Pena Siqueira (MG)
Aroldo Ferreira Galvão (MS)
Rosidelma Francisca Guimarães Santos (MT)
Vanessa Souza Alvares de Mello (PA)
Jaqueline Pequeno da Silva (PB)
Sergio Xavier dos Santos (PE)
Carlos Ernando da Silva (PI)
Luiz Henrique Bucco (PR)
Miguel Alvarenga Fernández Y Fernández (RJ)
Maria Geny Formiga de Farias (RN)
Jussara Kalil Pires (RS)
Andreia May (SC)
Marcio Gonçalves de Oliveira (SP)

Representantes das Seções Estaduais 2019/2021

Ana Catarina Pires de Azevedo Lopes (AL)
Silvio Roberto Magalhães Orrico (BA)
Sergio Antonio Gonçalves (DF)

Divino Lazaro de Souza Aguiar (GO)
Fabio Julian de Sousa (GO)
Maria do Carmo Varella Bastos (MG)
Ronaldo Vasconcellos Novais (MG)
Antonio Carlos Gerardi (PR)
Antonio Roberto Sartor (PR)
Miguel Alvarenga Fernández Y Fernández (RJ)
Eduardo Pacheco Jordão (RJ)
Geraldo Antonio Reichert (RS)
Jairo Tardelli Filho (SP)
Monica Ferreira do Amaral Porto (SP)
Oswaldo Ioshio Niida (SP)
Antonio Carlos da Costa Lino (SP)
Vasti Ribeiro Facincani (SP)
Ricardo Toledo Silva (SP)
Sadalla Domingos (SP)
Alvaro Diogo Sobral Teixeira (SP)
João Cesar Queiroz Prado (SP-SUB)
Fábio Severo (SP-SUB)
Antonio Rodrigues da Grela Filho (SP-SUB)
Tsunao Matsumoto (SP-SUB)
Jorge Luiz Monteiro (SP-SUB)

ROTEIROS PARA ANÁLISES E DETERMINAÇÕES EM AMOSTRAS DE ESGOTO PROTOCOLS FOR ANALYSIS AND DETERMINATIONS IN SEWAGE SAMPLES

- 1 Editorial - ESA**
Rodrigo Moruzzi e André Bezerra dos Santos
- 3 Editorial - INCT ETEs Sustentáveis**
Carlos Augusto de Lemos Chernicharo
- 5 Apresentação**
- 7 Roteiro 1 - Quantificação e identificação de bactérias heterotróficas totais (BHT) e resistentes a antibióticos (BRA)**
Protocol 1 - Quantification and identification of total heterotrophic (THB) and antibiotic resistant bacteria (ARB)
Elayne Cristina Machado, Juliana Calábria de Araújo
- 13 Roteiro 2 - Quantificação de genes de resistência a antibióticos (GRA)**
Protocol 2 - Antibiotic resistance genes (ARGs) quantification
Deborah Leroy Freitas, Juliana Calábria de Araújo
- 21 Roteiro 3 - Determinação de bactérias do ciclo do nitrogênio por PCR em tempo real (qPCR)**
Protocol 3 - Determination of bacteria and genes of the nitrogen cycle by qPCR
Alyne Duarte Pereira, Juliana Calábria de Araújo
- 27 Roteiro 4 - Quantificação de colifágos F específicos e somáticos**
Protocol 4 - Quantification of F-specific and somatic coliphages
Maria Fernanda Espinosa, César Rossas Mota Filho
- 33 Roteiro 5 - Concentração e quantificação do novo coronavírus por técnicas moleculares**
Protocol 5 - Concentration and quantification of the new coronavirus by molecular techniques
Cíntia Dutra Leal, Maria Fernanda Espinosa, Juliana Calábria de Araújo
- 41 Roteiro 6 - Quantificação de adenovírus por PCR em tempo real (qPCR)**
Protocol 6 - Quantification of human adenovirus by qPCR
Bruna Coelho Lopes, Maria Fernanda Espinosa, Matthew Eric Verbyla, César Rossas Mota Filho
- 49 Roteiro 7 - Determinação de ovos de helmintos**
Protocol 7 - Determination of helminth eggs
Shyrlane Veras, Lourdinha Florencio, Adriana M. Zerbini
- 55 Roteiro 8 - Determinação de oocisto de *Cryptosporidium* spp.**
*Protocol 8 - Determination of *Cryptosporidium* spp. oocysts*
Shyrlane Veras, Sávvia Gavazza, Lourdinha Florencio, Tânia L. M. Stamford
- 61 Roteiro 9 - Gerenciamento de resíduos sólidos e líquidos de laboratórios de análises de esgoto**
Protocol 9 - Management of solid and liquid waste from wastewater analysis laboratories
Fabricio Motteran, Iago da Silva, Danubia Freitas, Ronaldo Fonseca, Simone Machado-Santos, Cíntia Dutra Leal, Juliana Calábria Araújo, Lourdinha Florencio

ESA*

Desde sua fundação em 1962, a Revista Engenharia Sanitária e Ambiental (ESA) tem como missão a disseminação do conhecimento produzido na academia, empresas de pesquisa, concessionárias e empresas de saneamento, órgãos governamentais, profissionais técnicos, entre outros, por meio da publicação de artigos técnicos, revisões críticas e notas técnicas.

Os desafios na área da engenharia sanitária e ambiental são enormes e dinâmicos. Ao longo de sua história a ESA tem se adaptado às novas demandas e desafios, visando manter sua missão de publicar materiais técnicos e científicos de elevada qualidade e relevância nacional. Inicialmente, os artigos voltavam-se majoritariamente para soluções técnicas da Engenharia, aplicadas à área de Saneamento Básico. O crescente interesse pela área de meio ambiente ampliou o universo de atuação da Engenharia e trouxe novas dimensões para as pesquisas, abrindo portas para diferentes abordagens, com aumento significativo de contribuições à ESA. Mais recentemente, a ampliação da pós-graduação no Brasil e as exigências associadas aos seus programas e as agências de fomento à pesquisa aumentaram ainda mais o fluxo de artigos, exigindo grande esforço de todo corpo editorial e revisores voluntários.

Estruturalmente a ESA também se modernizou. A adoção de nova plataforma de gerenciamento, a definição de regras claras e rígidas de revisão por pares, a padronização das decisões do corpo editorial e a redução significativa do tempo de avaliação permitiram enfrentar os novos desafios e reforçar a qualidade dos manuscritos publicados. Entretanto, para além da sua história, tradição e reconhecimento dos pares, a reputação de um periódico é também aferida por meio de métricas internacionais, tal como o fator de impacto.

O fator de impacto tem grande importância na escolha do periódico pelos cientistas, pois afere sobre a visibilidade e a qualidade dos manuscritos publicados. Entretanto, são enormes os desafios de ampliar o fator de impacto de um periódico de circulação restrita nacional, dada a abrangência e o acesso limitados. Assim sendo, entendemos que a internacionalização da ESA é premente.

Todavia, a tarefa de internacionalizar uma revista com a importância da ESA no cenário nacional é árdua e encontra resistências legítimas, que não podem ser desconsideradas. Internacionalizar é muito mais que publicar manuscritos na língua inglesa; envolve abrir as fronteiras da ESA para divulgação científica aberta ao público internacional, incluindo seu corpo/conselho editorial e quadro de revisores. A maior resistência à internacionalização da ESA advém da sua maior virtude, ou seja, sua importância e reconhecimento no contexto brasileiro.

Dessa forma, os Cadernos Técnicos ESA foram uma saída construída pelo conjunto da ABES, diretoria e corpo editorial da ESA, que oportuniza a divulgação a disseminação de conhecimento voltados aos problemas técnicos nacionais, sem conflitar com o movimento de internacionalização científica da ESA. Afortunadamente, o lançamento dos cadernos técnicos foi abrilhantado pela parceria com o INCT ETEs Sustentáveis, por meio da divulgação de contribuição técnico-científica de alto nível e de extrema relevância ao contexto brasileiro. Nos orgulha fazer parte desse novo marco para a ESA!

Rodrigo Moruzzi
Editor Geral – ESA

André Bezerra dos Santos
Editor Geral Adjunto – ESA

INCT ETEs Sustentáveis*

Prezados leitores,

O INCT ETEs Sustentáveis foi criado em 2017 com o intuito de se tornar um centro de referência para questões relacionadas ao tratamento de esgoto sanitário, de forma a contribuir para a promoção de mudanças estruturais e estruturantes por meio da capacitação profissional, do desenvolvimento de soluções tecnológicas apropriadas às diversas realidades nacionais, da construção e transmissão de conhecimento para a sociedade, órgãos governamentais e empresariais.

As estações convencionais de tratamento de esgoto, de maneira geral, apresentam fluxogramas de tratamento que consideram o lançamento do efluente tratado em algum corpo d'água receptor e, portanto, são concebidas levando-se em consideração apenas a legislação de proteção das coleções hídricas. Se adequadamente projetadas, construídas e operadas, podem alcançar elevadas eficiências de remoção de matéria orgânica, nutrientes e patógenos, cumprindo o seu papel principal de controle da poluição da água. No entanto, essa não é a situação usual no Brasil, onde a maioria das estações apresenta algum tipo de problema operacional, que resulta na elevação dos custos do tratamento, na perda de eficiência e no não cumprimento da legislação ambiental. Ademais, os subprodutos sólidos (lodo e espuma) e gasosos (notadamente biogás) gerados durante o tratamento apresentam rotas de destinação final que usualmente são os aterros sanitários e a queima para a atmosfera. Embora sejam rotas de destinação de subprodutos aceitas no Brasil, sabidamente não são as mais adequadas, face aos impactos ambientais que podem ser causados na atmosfera, no solo e nas águas subterrâneas. Ainda, é de conhecimento amplo que os subprodutos do tratamento apresentam elevado potencial de aproveitamento, mas os esforços nesse sentido são incipientes e, quando realizados, ocorrem de forma desarticulada, normalmente abordando poucas das possibilidades existentes.

Em 4 anos de atuação, o INCT ETEs Sustentáveis desenvolveu pesquisas básicas e aplicadas visando propiciar o desenvolvimento de sistemas integrados e sustentáveis de tratamento de esgoto, com recuperação e valoração dos subprodutos do tratamento. Os resultados das pesquisas desenvolvidas no âmbito do Instituto, em adição à consolidação do conteúdo já existente, possibilitaram a elaboração de cerca de 50 notas técnicas, com tópicos relacionados ao aproveitamento e utilização dos subprodutos gerados a partir do tratamento de esgoto, além de maior eficiência e melhoria dos processos. A partir da parceria firmada entre a ESA e o INCT ETEs Sustentáveis, de forma a ampliar o alcance dos conteúdos e estabelecer melhor integração da academia com profissionais e empresas do setor de saneamento ambiental, essas notas técnicas foram agrupadas em 8 cadernos técnicos de acordo com a temática, a fim de apresentar de forma consolidada e integrada o conteúdo produzido.

Esperamos que a publicação via cadernos técnicos, com ilustrações didáticas e linguagem menos acadêmica, possibilite a efetiva transmissão e apropriação do conhecimento pelos profissionais que atuam no setor. Fica nossa forte expectativa de que o conhecimento disponibilizado possa induzir as transformações necessárias na nossa área, com reflexos na melhoria da gestão, dos projetos, da construção e da operação e manutenção dos sistemas de esgotamento sanitário. Enfim, que o grande esforço empreendido por mais de 100 colegas (autores, coautores, revisores e validadores das diversas notas técnicas), aos quais agradeço imensamente, possa contribuir para a melhoria da sustentabilidade do saneamento, notadamente na área de esgotamento sanitário. Valeu a pena, pessoal!

Boa leitura!

Carlos Augusto de Lemos Chernicharo
Coordenador Geral – INCT ETEs Sustentáveis

*Editorial publicado nos Cadernos Técnicos Eng Sanit Ambient, v.1 n.1, 2021, <https://doi.org/10.5327/2764557601010001>.

Apresentação

Esta coletânea, intitulada “Roteiros para análises e determinações em amostras de esgoto”, reúne metodologias e informações sobre técnicas de microbiologia convencionais e moleculares comumente utilizadas para analisar e quantificar diferentes grupos de microrganismos (bactérias, vírus, protozoários e helmintos) em amostras de esgoto bruto e tratado.

A avaliação da comunidade microbiana presente no esgoto sanitário, bem como nas unidades de tratamento biológico é de grande importância para os gestores públicos e técnicos operacionais das estações de tratamento de esgoto (ETEs). O monitoramento de microrganismos no esgoto bruto de uma determinada população pode fornecer informações relevantes sobre a circulação e prevalência de patógenos específicos (sentinela) que comprometem a saúde da população. Já nas unidades de tratamento biológico das ETEs, o monitoramento da comunidade microbiana fornece informação valiosa sobre a dinâmica dos grupos tróficos envolvidos na estabilização da matéria orgânica, na eficiência dos processos de tratamento e na qualidade do efluente final.

Destaca-se que as metodologias aqui apresentadas não estão descritas no *Standard Methods* (APHA, 2017), mas vêm sendo empregadas em vários laboratórios de microbiologia e de saneamento ambiental no Brasil e no exterior. Algumas das metodologias apresentadas foram adaptadas de métodos previamente descritos para outras matrizes. Cada roteiro descreve de forma sucinta e objetiva os procedimentos de análise, os controles necessários, bem como sistematiza os materiais, reagentes e equipamentos necessários para a sua realização.

O compartilhamento destas informações visa contribuir para a disseminação de metodologias consolidadas

e testadas no âmbito do INCT ETEs Sustentáveis, de forma a auxiliar aqueles laboratórios que atuam na área de Saneamento Ambiental e necessitam dessas informações para avaliar a comunidade microbiana no esgoto sanitário.

Os roteiros foram organizados na seguinte sequência e usados para a realização de:

1. Determinação, quantificação e identificação de bactérias resistentes a antibióticos (BRA) por meio de isolamento e cultivo em meio seletivo.
2. Quantificação de genes de resistência a antibióticos (GRA) por meio da técnica de PCR em tempo real.
3. Quantificação de bactérias do ciclo do nitrogênio (como bactérias oxidadoras de amônia, oxidadoras de nitrito, desnitrificantes e oxidadoras anaeróbias da amônia-anammox), por meio da quantificação de genes funcionais e/ou do gene RNAr16S para estes grupos.
4. Determinação e quantificação de colifágos por meio do método de cultivo em dupla camada de ágar.
5. Detecção e quantificação do novocoronavírus (SARS-CoV2) por meio da técnica de RT-qPCR.
6. Quantificação de adenovírus (HADV) por meio da técnica de PCR em tempo real.
7. Identificação e quantificação de ovos de helmintos em amostras de esgoto por análise microscópica.
8. Determinação e quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* por meio de separação imunomagnética (IMS) e detecção por microscopia de epifluorescência.
9. Gerenciamento dos resíduos líquidos e sólidos gerados nos laboratórios de Saneamento e de Microbiologia de água e esgoto.

Na **Tabela 1** são destacados os roteiros que compõem essa coletânea.

Tabela 1 – Roteiros para análises e determinações em amostras de esgoto.

Roteiro	Autoria
Roteiro 1: Quantificação e identificação de bactérias heterotróficas totais (BHT) e resistentes a antibióticos (BRA).	Machado e Araujo (2022)
Roteiro 2: Quantificação de genes de resistência a antibióticos (GRA).	Leroy-Freitas e Araújo (2022)
Roteiro 3: Determinação de bactérias do ciclo do nitrogênio por PCR em tempo real (qPCR).	Pereira e Araújo (2022)
Roteiro 4: Quantificação de colifágos F específicos e somáticos.	Espinosa e Mota (2022)
Roteiro 5: Concentração e quantificação do novo coronavírus por técnicas moleculares.	Leal <i>et al.</i> (2022)
Roteiro 6: Quantificação de adenovírus por PCR em tempo real (qPCR).	Lopes <i>et al.</i> (2022)
Roteiro 7: Determinação de ovos de helmintos.	Veras <i>et al.</i> (2022a)
Roteiro 8: Determinação de oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp.	Veras <i>et al.</i> (2022b)
Roteiro 9: Gerenciamento de resíduos sólidos e líquidos de laboratórios de análises de esgoto.	Motteran <i>et al.</i> (2022)

REFERÊNCIAS

MACHADO, E. C.; ARAÚJO, J. C. Roteiros para análises e determinações em amostras de esgoto. Roteiro 1: Quantificação e identificação de bactérias heterotróficas totais (BHT) e resistentes a antibióticos (BRA). *Cadernos Técnicos Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 2, n. 4 Especial, p. 7-11, 2022.

LEROY-FREITAS, D.; ARAÚJO, J. C. Roteiros para análises e determinações em amostras de esgoto. Roteiro 2: Quantificação de genes de resistência a antibióticos (GRA). *Cadernos Técnicos Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 2, n. 4 Especial, p.13-20, 2022.

PEREIRA, A. D.; ARAÚJO, J. C. Roteiros para análises e determinações em amostras de esgoto. Roteiro 3: Determinação de bactérias do ciclo do nitrogênio por PCR em tempo real (qPCR). *Cadernos Técnicos Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 2, n. 4 Especial, p. 21-26, 2022.

ESPINOSA, M. F.; MOTA FILHO, C. R. Roteiros para análises e determinações em amostras de esgoto. Roteiro 4: Quantificação de colifágos F específicos e somáticos. *Cadernos Técnicos Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 2, n. 4 Especial, p. 28-32, 2022.

LEAL, C. D.; ESPINOSA, M. F.; ARAÚJO, J. C. Roteiros para análises e determinações em amostras de esgoto. Roteiro 5: Concentração e quantificação do novo coronavírus por técnicas moleculares.

Cadernos Técnicos Revista Engenharia Sanitária e Ambiental, v. 2, n. 4 Especial, p. 33-40, 2022.

LOPES, B. C.; ESPINOSA, M. F.; VERBYLA, M. E.; MOTA FILHO, C. R. Roteiros para análises e determinações em amostras de esgoto. Roteiro 6: Quantificação de adenovírus por qPCR. *Cadernos Técnicos Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 2, n. 4 Especial, p. 41-47, 2022.

VERAS, S.; FLORENCIO, L.; ZERBINI, A. M. Roteiros para análises e determinações em amostras de esgoto. Roteiro 7: Determinação de ovos de helmintos. *Cadernos Técnicos Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 2, n. 4 Especial, p. 49-53, 2022a.

VERAS, S.; GAVAZZA, S.; FLORENCIO, L.; STAMFORD, T. L. M. Roteiros para análises e determinações em amostras de esgoto. Roteiro 8: Determinação de oocisto de *Cryptosporidium* spp. *Cadernos Técnicos Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 2, n. 4 Especial, p. 55-60, 2022b.

MOTTERAN, F.; SILVA, I.; FREITAS, D.; FONSECA, R.; MACHADO-SANTOS, S.; LEAL, C. D.; ARAÚJO, J. C.; FLORENCIO, L. Roteiros para análises e determinações em amostras de esgoto. Roteiro 9: Gerenciamento de resíduos sólidos e líquidos de laboratórios de análises de esgoto. *Cadernos Técnicos Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 2, n. 4 Especial, p. 61-70, 2022.



Roteiros para análises e determinações em amostras de esgoto

Roteiro 1 – Quantificação e identificação de bactérias heterotróficas totais (BHT) e resistentes a antibióticos (BRA)

*Protocols for analysis and determinations in sewage samples
Protocol 1 – Quantification and identification of total
heterotrophic (THB) and antibiotic resistant bacteria (ARB)*

Elayne Cristina Machado¹, Juliana Calábria de Araújo^{2*}

1. DEFINIÇÃO DE TERMOS

ETE Estação de tratamento de esgoto
BHT Bactérias heterotróficas totais
BRA Bactérias resistentes a antibióticos
PCR Reação em cadeia da polimerase

2. OBJETIVO

O objetivo deste roteiro é disponibilizar uma metodologia de processamento de amostras de esgoto bruto e tratado para a quantificação e identificação de bactérias heterotróficas totais e resistentes a antibióticos (BHT e BRA, respectivamente).

3. CONCEITOS BÁSICOS

A técnica de cultura de bactérias consiste basicamente em promover a multiplicação de colônias de organismos microbianos *in vitro*. Utilizando a cultura de bactérias é possível estimar o número de microrganismos de determinada amostra, estudar as características específicas dos microrganismos de forma individual ou em grupo e, também, isolar estirpes para identificação bioquímica ou molecular.

Diversas áreas da microbiologia e da biologia molecular utilizam com frequência as técnicas de cultura bacteriana. Para a biologia molecular, por exemplo, a cultura é importante para isolar colônias puras (UFC - Unidades Formadoras de Colônias) e, a partir daí, identificá-las.

Os procedimentos de processamento de amostras de esgoto e a análise via cultivo bacteriano, para a quantificação e identificação de BHT e BRA, são passos fundamentais para a avaliação da resistência a antibióticos em determinada população. Este roteiro apresenta uma metodologia que permite isolar culturas puras (resistentes a antibióticos) a partir de amostras de esgoto (bruto e tratado), sendo possível sua análise quantitativa e qualitativa, e foi baseado na metodologia utilizada e descrita em Machado (2019) e Machado *et al.* (2020).

4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

O processamento das amostras de esgoto para a quantificação de BHT e BRA envolve três procedimentos: (i) diluição das amostras em água destilada estéril; (ii) plaqueamento/inoculação da diluição apropriada em meios específicos; e

¹Bióloga pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-MG). Mestre em Ciências dos Alimentos pela Universidade Federal de Lavras (UFLA). Doutora em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

²Bióloga pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Mestre e Doutora em Hidráulica e Saneamento pela Universidade de São Paulo (EESC-USP). Professora associada do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG. Subcoordenadora do INCT ETEs Sustentáveis.

*Endereço para correspondência: Avenida Antônio Carlos 6627 - Universidade Federal de Minas Gerais - Escola de Engenharia - Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - Bloco 1. Belo Horizonte, MG. CEP: 31270-901. e-mail: juliana@desa.ufmg.br

(iii) quantificação das UFC. Todo o material utilizado nas três etapas deve ser previamente esterilizado por método de autoclavagem.

Para a identificação de BHT e BRA são necessários basicamente quatro procedimentos: (i) seleção, isolamento e conservação de colônias puras, das placas Petri que foram quantificadas, em solução de água destilada e glicerina; (ii) crescimento da colônia selecionada em caldo de cultivo enriquecido (p. ex.: BHI, do inglês *brain heart infusion*) para o aumento do número de indivíduos; (iii) extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) das colônias pelo método fenol/clorofórmio (adaptado de TAKEUCHI *et al.*, 1997); e (iv) envio do DNA purificado para sequenciamento de Sanger.

Todo o material utilizado nas quatro etapas deve ser previamente esterilizado por autoclavagem.

5. INTERFERENTES/CUIDADOS

Os procedimentos de diluição de amostras de esgoto, inoculação, quantificação e identificação de BHT e BRA devem atender a algumas considerações importantes para a obtenção de resultados confiáveis e de elevada qualidade:

- As amostras devem ser devidamente homogeneizadas antes das diluições.
- A cada diluição deve-se padronizar a homogeneização e realizar a troca das ponteiras.
- Na inoculação (adotar método *spread plate*), deve-se padronizar os movimentos com a alça de Drigalski (MADIGAN *et al.*, 2016).
- Sempre incubar as amostras com as placas Petri invertidas e por período de 48 horas à temperatura de 37,5 °C.
- No momento da seleção das culturas puras, escolher colônias morfologicamente distintas e as mais isoladas.
- Após a extração do DNA das colônias, realizar a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) e submeter o produto desta amplificação a um gel de agarose para certificar de que são colônias bacterianas.

Todo o material utilizado (tubos, placas Petri, alças de Drigalski, ponteiras) deve estar estéril e o uso de luvas é

imprescindível durante todas as etapas, a fim de se evitar qualquer tipo de contaminação.

6. APLICAÇÃO DO MÉTODO

Este método é aplicável a matrizes ambientais líquidas como, por exemplo, amostras de água provenientes de corpos hídricos, água para abastecimento humano e esgoto bruto e tratado.

7. FLUXOGRAMA DO MÉTODO

Na **Figura 1** é apresentado o fluxograma simplificado do método de quantificação e identificação de bactérias heterotróficas totais e resistentes a antibióticos (BHT e BRA).

8. MATERIAIS

8.1. Aparelhagem

- Capela de fluxo laminar.
- Autoclave.
- Estufa.
- Freezers -20 °C e -80 °C.
- Cuba de eletroforese horizontal.
- Espectrofotômetro.
- Incubadora Shaker.

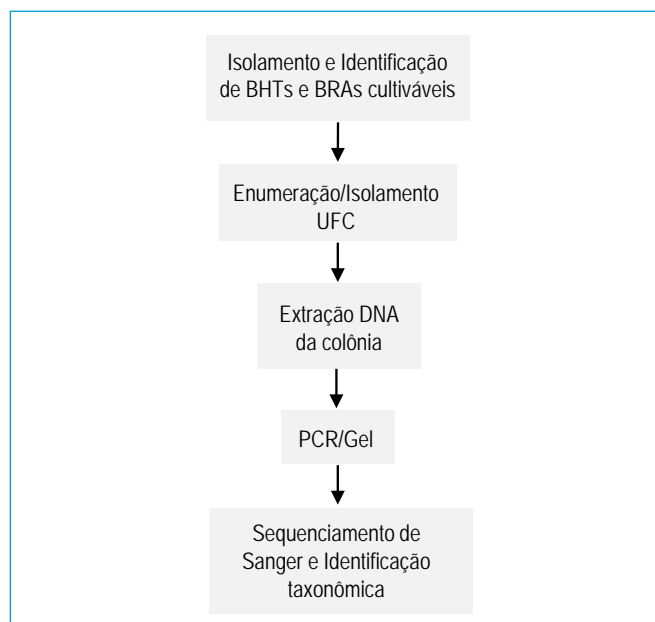


Figura 1 – Etapas do método de quantificação e identificação de bactérias heterotróficas totais e resistentes a antibióticos (BHT e BRA).

- Termociclador para PCR convencional.
- Transiluminador de LED.
- Agitador de tubos tipo Vórtex.

8.2. Outros Materiais

- Alça de Drigalski.
- Caixa de isopor para transporte de amostra.
- Frasco de coleta (1.000 mL).
- Gelo.
- Jaleco.
- Micropipetas e ponteiros (1.000 μ L, 200 μ L, 10 μ L).
- Provetas (10 mL, 100 mL e 500 mL).
- Luvas.
- Papel craft.
- Fita de autoclave.
- Papel toalha.
- Pinças.
- Placas Petri.
- Tubos com tampa de rosca (2 mL).
- Tubos tipo Eppendorf (2 mL).
- Meio de cultura PCA (do inglês, *plate count agar*).
- Caldo BHI.
- Padrões de antibióticos, preferencialmente da marca Sigma ou similar.

9. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE ESGOTO

9.1. Coleta e transporte

As coletas devem ser realizadas utilizando-se frascos estéreis de, ao menos, 1.000 mL, contendo identificação com o código da amostra e data da coleta. Sugere-se que a amostragem seja feita de maneira composta. O transporte ao laboratório deve ser feito sob refrigeração, em caixa de isopor com gelo.

9.2. Inoculação e isolamento

1. Homogeneizar as amostras, se possível, dentro de capela de fluxo laminar.
2. Pipetar 1 mL da amostra bruta e depositar imediatamente no primeiro tubo da diluição (9 mL de água destilada estéril), constituindo a diluição 10^{-1} .

3. Homogeneizar a diluição 10^{-1} , pipetar 1 mL e transferir para o tubo 2, constituindo a diluição 10^{-2} , e assim sucessivamente (**Figura 2**).
4. Para o isolamento das BHT: inocular/depositar 100 μ L da diluição desejável sobre o meio de cultivo PCA (sem antibióticos) e homogeneizar com auxílio da Alça de Drigalski (Figura 2). Recomenda-se a realização em duplicata.
5. Para o isolamento das BRA: inocular/depositar 100 μ L da diluição desejável sobre o meio de cultivo PCA (com adição de antibióticos; a concentração destes deverá ser definida para cada antibiótico – consultar a literatura) e homogeneizar com auxílio da Alça de Drigalski (Figura 2). Recomenda-se a realização em duplicata.
6. Incubar as placas Petri de forma invertida em estufa a $37,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas.
7. Realizar a contagem das UFC, após 48 horas, nas placas Petri que possuírem entre 30 e 300 UFCs, e uma segunda contagem após 5 dias em temperatura ambiente.
8. Selecionar entre 5 e 10 UFCs por placa Petri para o isolamento.

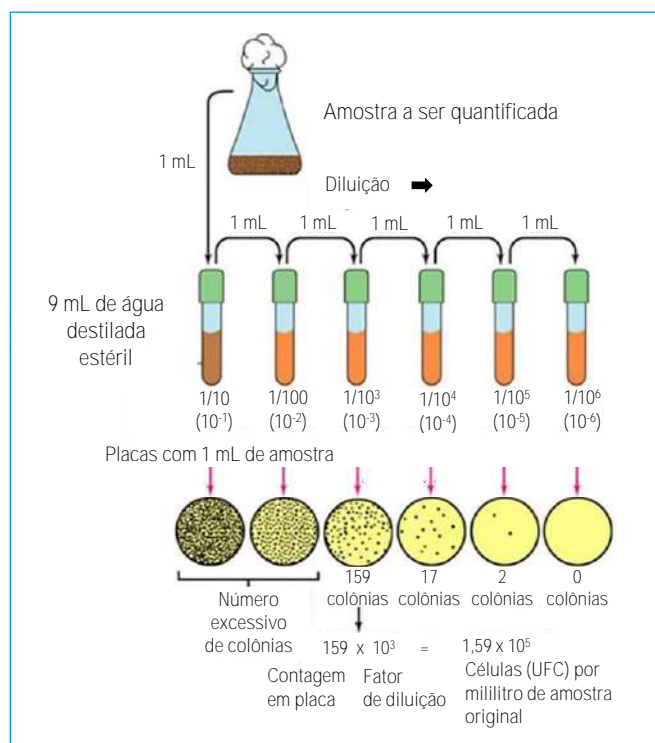


Figura 2 – Fluxograma de diluições e inoculações.

9. Com auxílio de uma alça estirada, “pescar” as colônias individuais e depositar em tubos de 100 µL contendo água destilada e glicerina.
10. Armazenar os tubos em freezer a -80 °C.
11. Resultados esperados: a concentração das BRA em esgoto bruto pode variar de 3,0 a 6,0 log₁₀ UFC·mL⁻¹ dependendo do antibiótico testado e no esgoto tratado de 2,0 a 5,0 log₁₀ UFC·mL⁻¹ (MACHADO, 2019; MACHADO *et al.*, 2020).

9.3. Extração de DNA a partir das colônias isoladas

As amostras (colônias isoladas) preservadas devem ser submetidas a extração de DNA genômico. O DNA das bactérias isoladas (BHT e BRA) deve ser extraídos segundo o protocolo de Takeuchi *et al.* (1997) modificado.

Para iniciar o procedimento da extração deve-se:

1. Cultivar as colônias (uma colônia por tubo) em 1,0 mL de caldo BHI, durante 18 horas sob agitação constante de 130 rotações por minuto (rpm), à temperatura de 37 °C.
2. Após o período de crescimento, centrifugar as amostras a 4.000 rpm por 20 minutos, descartar o sobrenadante.
3. Lavar os *pellets* com solução tampão fosfato-salino (PBS 1X NaCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, pH 7,2), centrifugar novamente a 4.000 rpm por 10 minutos.
4. As demais etapas de extração seguirão o protocolo de Takeuchi *et al.* (1997).

A quantificação do material genético extraído deve ser realizada (ng·µL⁻¹), e recomenda-se a utilização de espectrofotômetro *NanoDrop™ Lite* (Thermo Scientific®).

9.4. Amplificação do gene RNAr 16S pela técnica da PCR

Após extração do DNA das BHT e BRA selecionadas, realizar a reação da PCR para amplificação do DNA extraído com os iniciadores: 341F (5' - CCT ACG GGA GGC AGC AG - 3' - SIMMONS *et al.*, 2004) e 1492R (5' - ACG GTT ACC TTG TTA CGA CTT - 3' - SIMMONS *et al.*, 2004) que amplificam a região V3 a V8 do gene RNAr 16S de bactéria. Poderão ser utilizados também os iniciadores 27F (5' - AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG - 3') e 1492R (5' - TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACTT - 3'

- LANE, 1991) para que se possa amplificar a maior parte do gene RNAr16S (cerca de 1.500 pares de base).

As PCRs devem ser efetuadas em 50 µL de solução com os seguintes componentes: 25 µL de Pré-mix 2x IB (Phoneutria, Brasil); 3,0 µL Soro Albumina Bovina (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) (5µg·µL⁻¹); 18 µL de água ultrapura (Ambion, Life Technology, Frankfurt, Germany); 0,5 µL de cada *primer* (25 µM); e 3 µL do DNA de cada amostra (concentração 30 ng·µL⁻¹).

As condições de amplificação para os iniciadores selecionados são: desnaturação a 94 °C por 1 minuto; anelamento a 49 °C por 1 minuto; extensão a 72 °C por 3 minutos durante 30 ciclos; e extensão final de 7 minutos a 72 °C. Para o controle negativo, substituir a amostra de DNA por 2 µL de água Milli-Q estéril (Millipore, Brasil) para verificação da pureza dos reagentes utilizados.

Os fragmentos do gene rRNA 16S amplificados devem ser analisados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,2% (Invitrogen Life Technologies, Brasil), utilizando alíquota de 4,0 µL do produto de PCR corado com 2,0 µL de *loading buffer* e o padrão de peso molecular 1 Kb DNA Plus Ladder (Invitrogen Life Technologies, Brasil).

9.5. Sequenciamento do gene RNAr 16S para identificação dos isolados

Os produtos da PCR, purificados e quantificados, devem ser enviados para sequenciamento unidirecional de Sanger (existem várias empresas que prestam este serviço no Brasil e no exterior, a exemplo da MacroGen Inc., Coreia - em Sequenciador 3730XL).

As sequências de nucleotídeos obtidas devem ser analisadas e editadas, manualmente, utilizando o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 6.0.3 (Isis Pharmaceuticals, Inc.), e alinhamentos múltiplos devem ser realizados através do programa *Clustal W*.

As sequências obtidas serão comparadas com as sequências disponibilizadas no banco de dados *GenBank*, utilizando o programa BLAST do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) (ALTSCHUL *et al.*, 1990) para a identificação filogenéticas das mesmas.

Diferentes gêneros bacterianos já foram identificados como sendo bactérias resistentes a antibióticos presentes em

esgoto bruto e tratado, tais como: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Acidovorax*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Salmonella*, *Cloacibacterium*, entre outros (MACHADO, 2009; MACHADO *et al.*, 2020).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio recebido do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

– CNPq, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Estações Sustentáveis de Tratamento de Esgoto – INCT ETEs Sustentáveis.

Este trabalho faz parte da série de publicações do INCT ETEs Sustentáveis

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.; LIPMAN, D. Basic local alignment search 408 tool. *Journal of molecular biology*, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. E. Stackebrandt; M. Goodfellow (Ed.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. London: Willey, 1991. p. 115-175.
- MACHADO, E. C. *Ocorrência, Prevalência e Remoção de bactérias resistentes a Antibióticos em diferentes tipologias de sistemas compactos de tratamento de esgoto sanitário*. 2019. 103 f. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.
- MACHADO, E. C.; LEAL, C. D.; COELHO, B. L.; CHERNICHARO, C. A. L.; ARAÚJO, J. C. Detecção e quantificação de bactérias resistentes aos antibióticos ampicilina e cloranfenicol em estações de tratamento de esgoto doméstico. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 25, n.6, p. 847-857, 2020.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. *Microbiologia de Brock*. 14ª Edição. Porto Alegre, Brasil: Artmed Editora, 2016. 1032 p.
- SIMMONS, S. L.; SIEVERT, S. M.; FRANKEL, R. B.; BAZYLINSKI, D. A.; EDWARDS, K. J. Spatiotemporal distribution of marine magnetotactic bacteria in a seasonally stratified coastal salt pond. *Applied and environmental microbiology*, v. 70, n. 10, p. 6230-6239, 2004.
- TAKEUCHI, S.; HASHIZUME, N.; KINOSHITA, T.; KAIDOH, T.; TAMURA, Y. Detection of 479 Clostridium septicum hemolysin gene by polymerase chain reaction. *Journal of veterinary medical 480 science*, v. 59, n. 9, p. 853-855, 1997.



Roteiros para análises e determinações em amostras de esgoto

Roteiro 2 – Quantificação de genes de resistência a antibióticos (GRA)

Protocols for analysis and determinations in sewage samples
Protocol 2 – Antibiotic resistance genes (ARGs) quantification

Deborah Leroy Freitas¹, Juliana Calábria de Araújo^{2*}

1. DEFINIÇÃO DE TERMOS

DNA Ácido desoxirribonucleico
ETE Estação de tratamento de esgoto
GRA Genes de resistência a antibióticos
qPCR Reação em cadeia da polimerase em tempo real

2. OBJETIVO

O objetivo deste roteiro é disponibilizar uma metodologia prática e funcional de processamento de amostras de esgoto bruto e tratado para análises de biologia molecular, especificamente para a quantificação de genes de resistência a antibióticos (GRA).

3. CONCEITOS BÁSICOS

A expressão dos genes em uma célula bacteriana pode acarretar diversos processos metabólicos, dentre os quais se destacam os relacionados à resistência. Genes que conferem resistência a uma ampla variedade de antibióticos são frequentemente evidenciados em pesquisas relacionadas a matrizes ambientais, em especial no esgoto sanitário. Os procedimentos de processamento das amostras de esgoto e análise via técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR, do inglês *quantitative real-time polymerase chain reaction*),

para a quantificação de GRA, são passos fundamentais para a avaliação da resistência a antibióticos em uma determinada população. Este protocolo permite o acesso ao ácido desoxirribonucleico (DNA) bacteriano total presente em amostras de esgoto (bruto ou tratado), sendo possível sua análise via qPCR para a quantificação de genes de resistência a antibióticos, e foi baseado em metodologia adaptada por Leroy-Freitas (2020).

4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

O processamento de amostras de esgoto e a quantificação de GRA envolvem, basicamente, três procedimentos básicos: (i) filtração das amostras líquidas; (ii) extração de DNA total; e (iii) quantificação de GRA por qPCR (que envolve as etapas de PCR convencional, clonagem, padronização de curva-padrão e amplificação do DNA presente nas amostras). Para este fim, as extrações de DNA e o qPCR são geralmente realizados utilizando-se kits comerciais. Todo o material utilizado nas três etapas deve ser previamente esterilizado por método de autoclavagem.

5. INTERFERENTES/CUIDADOS

Os procedimentos de filtração das amostras de esgoto, extração de DNA total e quantificação de GRA por qPCR

¹Bióloga pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela UFMG.

²Bióloga pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Mestre e Doutora em Hidráulica e Saneamento pela Universidade de São Paulo (EESC-USP). Professora associada do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG. Subcoordenadora do INCT ETEs Sustentáveis.

*Endereço para correspondência: Avenida Antônio Carlos 6.627 - Universidade Federal de Minas Gerais - Escola de Engenharia - Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - Bloco 1. Belo Horizonte, MG. CEP: 31270-901. e-mail: juliana@desa.ufmg.br

devem atender a algumas considerações importantes para a obtenção de resultados confiáveis e de qualidade:

- Amostras devem ser devidamente homogeneizadas antes das filtrações.
- Volumes a serem filtrados devem ser obrigatoriamente medidos e registrados.
- Membranas contendo amostras, após filtração, devem ser armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até que sejam submetidas à extração de DNA.
- DNA total extraído deve ser armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (para tempo superior a 4 meses).
- Produtos da clonagem bacteriana devem ser armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Reagentes de PCR convencional, qPCR e clonagem bacteriana devem ser armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, quando em uso, devem ser mantidos em *racks* refrigeradas.

Todo o material utilizado (aparatos de filtração, pinças, ponteiras, tubos, placas) deve estar estéril e o uso de luvas é imprescindível durante todas as etapas, a fim de se evitar qualquer tipo de contaminação.

6. APLICAÇÃO DO MÉTODO

Este método é aplicável a matrizes ambientais líquidas como, por exemplo, amostras de água provenientes de corpos hídricos, água para abastecimento humano, esgoto bruto e tratado.

7. FLUXOGRAMA DO MÉTODO

Na **Figura 1** é apresentado o fluxograma simplificado do método de quantificação de GRA.

8. MATERIAIS

8.1. Aparelhagem

- Bomba a vácuo.
- Centrífuga para microplacas.
- Cuba de eletroforese horizontal.
- Espectrofotômetro (*NanoDrop™ Lite* Thermo Scientific®).
- Estufa.
- Freezers $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Microcentrífuga.
- Microdesmembrador (*Bead-beater*).

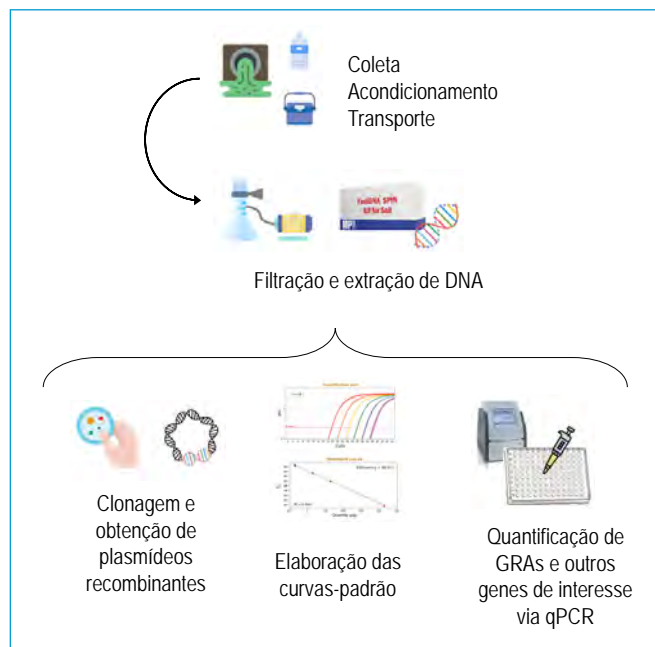


Figura 1 – Etapas simplificadas para a quantificação de GRA.

- Provetas (100 mL e 500 mL).
- Shaker.
- Sistema de filtração.
- Termociclador para PCR convencional.
- Termociclador para qPCR.
- Transiluminador de LED.
- Agitador de tubos tipo Vórtex.

8.2. Outros materiais

- Alça de Drigalski.
- Caixa de isopor para transporte de amostra.
- Filme selante para microplacas.
- Frasco de coleta (1.000 mL).
- Gelo.
- Jaleco.
- Membrana de mistura de ésteres de celulose ($0,22\text{ }\mu\text{m}$).
- Micropipetas e ponteiras (1.000 μL , 200 μL , 10 μL).
- Luvas.
- Papel craft.
- Papel toalha.
- Pinças.
- Placas Petri.
- Tubos com tampa de rosca (2 mL).
- Tubos tipo Eppendorf (2 mL).

9. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE ESGOTO

9.1. Coleta e transporte

As coletas devem ser realizadas utilizando-se frascos estéreis de, ao menos, 1.000 mL, contendo identificação com código da amostra e data da coleta. Sugere-se que a amostragem seja feita de maneira composta. O transporte ao laboratório deve ser feito sob refrigeração (temperatura entre 2 e 8 °C).

9.2. Filtração e armazenamento

1. Utilizar sistemas de filtração e pinças (embalados em papel craft) autoclavados.
2. Montar os aparatos de filtração, inserindo as membranas de mistura de ésteres nos filtros e acoplando as bombas a vácuo nos sistemas de filtração correspondentes.
3. Ambientar provetas com cerca de 10 mL da amostra de esgoto, e descartar o líquido.
4. Medir volumes entre 10 mL e 500 mL (variável, de acordo com a turbidez e cor da amostra).
5. Verter a amostra no sistema e iniciar a filtração (registrar o volume filtrado).
6. Após finalizar a filtração, retirar a membrana com auxílio de pinças estéreis e armazenar em tubos com tampa de rosca estéreis (2 mL) a -80 °C.

10. EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras preservadas devem ser submetidas à extração de DNA genômico, de acordo com as instruções do fabricante do kit comercial a ser utilizado. Sugere-se a utilização do kit *FastDNA® SPIN Kit for Soil* (MPBiomedicals®), conforme protocolo descrito a seguir:

1. Adicionar amostra retida em filtro de membrana a um tubo Lysing Matrix E.
2. Adicionar 978 µL de tampão fosfato salino (do inglês, *sodium phosphate buffer*) à amostra no tubo Lysing Matrix E.
3. Adicionar 122 µL de tampão MT.
4. Homogeneizar no instrumento FastPrep (adaptado, *bead deater*) por 40 segundos (adaptado, 60 segundos) a uma velocidade de 6,0 (adaptado, velocidade máxima).
5. Centrifugar a 14.000 rotações por minuto (rpm) por período entre 5 e 10 minutos (adotado, 10 minutos) para obtenção de *pellet*.
6. Transferir o sobrenadante para um tubo de 2,0 mL de microcentrífuga limpo. Adicionar 250 µL de PPS (do inglês, *protein precipitation solution*) e homogeneizar invertendo o tubo 10 vezes.
7. Centrifugar a 14.000 rpm por 5 minutos para obter um *pellet* precipitado. Transferir o sobrenadante para um tubo limpo de 2,0 mL.
8. Ressuspender a suspensão Binding Matrix e adicionar 1,0 mL ao sobrenadante em tubo de 2,0 mL.
9. Submeter à rotação, ou inverter com as mãos, por 2 minutos, para permitir a ligação ao DNA. Colocar o tubo em uma *rack* por 3 minutos para permitir a sedimentação da matriz de sílica.
10. Remover e descartar 500 µL do sobrenadante, tomando o cuidado de evitar o sedimentado de Binding Matrix.
11. Gentilmente ressuspender Binding Matrix na quantidade restante de sobrenadante. Transferir aproximadamente 600 µL da mistura para um Spin™ Filter e centrifugar a 14.000 rpm por 1 minuto. Descartar o filtrado e adicionar o restante da mistura ao Spin™ Filter e centrifugar como anteriormente. Descartar o filtrado novamente.
12. Adicionar 500 µL de solução SEWS-M preparado com etanol, e ressuspender gentilmente o *pellet* usando a pressão do líquido pela pipeta.
13. Centrifugar a 14.000 rpm por 1 minuto. Descartar o filtrado.
14. Sem nenhuma adição de líquido, centrifugar novamente a 14.000 rpm para “secar” a matriz residual da solução de lavagem. Descartar o tubo de coleta e substituir por um tubo de 1,5 mL limpo.
15. Secar o Spin™ Filter ao ar por 5 minutos a temperatura ambiente.
16. Ressuspender gentilmente a Binding Matrix (abaixo do Spin™ Filter) em volume entre 50 e 100 µL (adotado, 100µL) de DES (do inglês *DNase/Pyrogen-Free Water*)
17. Centrifugar a 14.000 rpm por 1 minuto para filtrar o DNA eluído para o tubo de coleta limpo. Descartar o

Spin™ Filter. DNA agora está pronto para PCR e outras aplicações correlatas. Preservar por -20 °C por períodos estendidos ou 4 °C até o uso.

A quantificação do material genético extraído ($\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) deve ser realizada em espectrofotômetro de qualquer marca ou similar ao *NanoDrop™ Lite* (Thermo Scientific®).

11. QUANTIFICAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

A técnica da qPCR é utilizada para se estimar o número de cópias dos genes de interesse. Nesta metodologia, o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado Ciclo de *Threshold* (Ct), que permite a quantificação exata e reprodutível de acordo com a fluorescência emitida. A intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de produto gerado na reação, e os resultados são visualizados em gráfico de amplificação. As etapas utilizadas para a quantificação dos genes são descritas nos itens seguintes.

11.1. Obtenção dos plasmídeos recombinantes para as curvas-padrão de qPCR

Plasmídeos recombinantes contendo os genes de interesse devem ser utilizados para elaboração das curvas padrão dos ensaios de qPCR. Os plasmídeos são obtidos por método de clonagem, no qual se realiza a ligação do produto da qPCR amplificado em vetor plasmidial e inserção em células competentes. Sugere-se a utilização do protocolo de clonagem bacteriana e reagentes do kit *pGEM®-T Easy Vector* (Promega; Madison, WI), como descrito a seguir.

11.1.1. Protocolo da reação de ligação

1. Centrifugar brevemente os tubos de *pGEM®-T Easy Vector* e o *Control Insert* para coletar o conteúdo que fica na parte inferior dos tubos.
2. Montar as reações de ligação conforme descrito na **Tabela 1**.
3. Incubar as reações durante 1 hora à temperatura ambiente. Alternativamente, pode-se incubar overnight a 4 °C.

Tabela 1 – Reações de ligação.

Componente da Reação	Reação Padrão	Controle positivo	Background Control
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5 μL	5 μL	5 μL
pGEMR-T ou pGEMR-T Easy Vector (50 ng)	1 μL	1 μL	1 μL
Produto de PCR ⁽¹⁾	X μL ⁽²⁾	-	-
Control Insert DNA	-	2 μL	-
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/ μL)	1 μL	1 μL	1 μL
Água livre de nucleases para completar o volume	q.s.p.10 μL	q.s.p.10 μL	q.s.p.10 μL

Notas: ⁽¹⁾Uma alíquota da reação de PCR deve ser analisada em um gel de agarose antes de usar na reação de ligação para verificar que a reação produziu o fragmento desejado. O produto de PCR a ser ligado deve ser purificado, utilizando-se os kits da Promega de purificação do gel ou produto da PCR. A exposição de produtos de PCR à luz ultravioleta (UV) deve ser minimizada a fim de evitar a formação de dímeros de pirimidina. ⁽²⁾A razão molar entre o produto da PCR/vetor pode requerer otimização.

11.1.2. Otimização da razão molar inserto/vetor

O kit *pGEM®-T Easy Vector* foi otimizado usando uma relação molar 1:1 do inserto de controle para os vetores. No entanto, as proporções de 8:1 a 1:8 foram utilizadas com sucesso. Se as experiências iniciais com o produto de PCR não forem boas, a otimização da razão pode ser necessária. Razões de 3:1 a 1:3 fornecem bons parâmetros iniciais. A concentração de produto de PCR deve ser estimada em comparação com padrões de massa de DNA em um gel. A quantidade apropriada de produto de PCR (inserto) para colocar na reação de ligação pode ser obtida pela **Equação 1**:

$$\text{ng de inserto} = \frac{\text{ng de vetor} \times \text{tamanho do inserto (kb)}}{\text{tamanho do vetor (kb)}} \times \text{razão molar inserto:vetor} \quad (1)$$

11.1.3. Transformação usando a reação de ligação

Materiais

- Meio Luria Bertani (LB) acrescido de Ampicilina, IPTG e X-Gal.
- Meio SOC (retirar da geladeira alguns minutos antes de usar).
- Reação de ligação.

Preparo do meio de cultura

- Preparar a quantidade de Ágar LB necessária (fazer em duplicata cada reação de ligação e 2 placas para

o controle do DNA) e autoclavar por 15 minutos a 121 °C.

- Deixar esfriar o meio até 50 °C e adicionar a Ampicilina na concentração de 100 µg·mL⁻¹.
- Colocar cerca de 30 a 35 mL de meio de cultura em placas de Petri com diâmetro de 85 mm.
- Deixar endurecer e estocar a 4 °C por até 1 mês.

Solução Estoque IPTG a 0,1 M

Pesar 1,2 g de IPTG e adicionar água Milli-Q para um volume final de 50 mL. Esterilizar a solução usando filtro de seringa de 0,22 µm. Estocar a 4 °C.

X-Gal (2 mL)

Pesar 100 mg de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside e dissolver em 2 mL de N,N'-Dimetil-Formamida. Armazenar em frasco âmbar, ou cobrir com alumínio para proteger da luz, e estocar a -20 °C.

Placas de ágar LB com Ampicilina, IPTG e X-Gal

Os reagentes IPTG e X-Gal podem ser incorporados de duas formas ao ágar LB:

- Com o ágar ainda líquido acrescido de Ampicilina, incorporar por *pour-plate* 0,5 mM IPTG e 80 µg·mL⁻¹ de X-Gal; ou
- Com o ágar já pronto (sólido) com Ampicilina, colocar sobre a placa 100 µL de IPTG (100 mM) e 20 µL de X-Gal (50 mg·mL⁻¹). Espalhar em toda a superfície da placa (*spread-plate*) e deixar a 37 °C por 30 minutos para os reagentes serem absorvidos. Este procedimento deve ser feito antes de usar o meio de cultura.

11.1.4. Protocolo de Transformação

1. Preparar duas placas de ágar LB com Ampicilina/IPTG/X-Gal para cada reação de ligação, mais duas placas para determinar a eficiência da transformação. Deixar as placas em temperatura ambiente antes do uso.
2. Centrifugar brevemente os tubos contendo a reação de ligação e coletar o conteúdo da parte inferior. Adicionar 2 µL de cada reação de ligação em um microtubo estéril de 1,5 mL e deixar em banho de gelo.

Preparar um tubo com 0,1 ng do plasmídeo não cortado como controle da eficiência de transformação.

3. Retirar do freezer -80 °C as células competentes do kit (JM109) e deixar também no banho de gelo por 5 minutos. Misturar gentilmente o tubo. Evitar excessivas pipetagens (congelar e descongelar, pois as células competentes são extremamente frágeis).
4. Cuidadosamente, transferir 50 µL das células para cada tubo com a reação de ligação que ficou no banho de gelo (Passo 2). Para a determinação da eficiência de transformação, use 100 µL de células para o controle do plasmídeo não cortado.
5. Misture os tubos gentilmente e coloque no banho de gelo por mais 20 minutos.
6. Faça um choque térmico nas células por período de 45 a 50 segundos no banho maria a 42 °C exatamente. **Não misturar.**
7. Imediatamente, retorne os tubos para o banho de gelo por 2 minutos.
8. Adicione 950 µL do meio SOC à temperatura ambiente no tubo contendo as células transformadas mais a reação de ligação e 900 µL no tubo controle com o plasmídeo não cortado.
9. Incubar por 1h30 minutos à 37 °C em estufa com agitação (Shaker) de aproximadamente 150 rpm.
10. Plaquear, em duplicata, 100 µL de cada reação de transformação na placa de ágar LB com ampicilina/IPTG/X-Gal. Para o controle do plasmídeo não cortado, é recomendado diluir o tubo com o meio SOC 1:10 e plaquear.
11. Incubar as placas *over-night* (de 16 a 24 horas) a 37 °C. Selecionar as colônias brancas.

As colônias brancas devem ser repicadas em placas Petri contendo ágar LB e, posteriormente, submetidas à reação de PCR convencional com os *primers* específicos para os genes de interesse, para confirmação do êxito da transformação e clonagem pela análise de bandas em gel de eletroforese. As linhagens clonadas podem ser preservadas em caldo LB estéril (10% de glicerol) a -80 °C.

Para extração do DNA plasmidial, os clones recombinantes devem ser cultivados em 400 µL de caldo LB estéril

com ampicilina em concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e incubados por um período de 16 a 19 horas a 35 °C. A extração plasmidial pode ser realizada utilizando-se *mini-preps* caseiros (sugere-se, neste caso, a utilização do kit *GenElute™ HP Five-Minute Plasmid Miniprep* - Sigma Aldrich; St. Louis, MO). É necessário quantificar o DNA (plasmídeo + inserto) extraído (sugere-se utilizar *NanoDrop™ Lite*, Thermo Scientific®), e preservar a -20 °C para elaboração das curvas-padrão nos ensaios de PCR em tempo real.

Sabendo que 1 mol de par de base (pb) possui 649 g (sendo 1 mol equivalente a $6,022 \times 10^{23}$ moléculas ou cópias) e que o tamanho do plasmídeo recombinante é igual ao tamanho do plasmídeo (3015 pb, kit *pGEM®-T Easy Vector*) mais inserto (equivalente ao tamanho do *amplicon*, que é variável de acordo com o gene de interesse), o cálculo para a obtenção da concentração dos plasmídeos (em nº de cópias· μL^{-1}) no primeiro ponto das curvas-padrão é efetuado conforme a **Equação 2**.

$$\text{N}^\circ \text{ de cópias} \cdot \mu\text{L}^{-1} = \frac{\text{Concentração do plasmídeo recombinante (g} \cdot \mu\text{L}^{-1}) \times 6,022 \times 10^{23} \text{ (cópias)}}{\text{Tamanho do plasmídeo recombinante em pb} \times 649 \text{ (g)}} \quad (2)$$

Após se estimar a quantidade de DNA do inserto (em nanogramas), deve-se realizar diluições seriadas do DNA plasmidial (para os gene-alvo) em água ultrapura em proporção variável (p. ex.: 1:10; 1:5), para a calibração e padronização das curvas-padrão. Utiliza-se um volume de 2,0 μL de DNA a partir de cada diluição, que será adicionado na reação de qPCR. A reação de amplificação (para cada concentração de DNA/diluição) será feita em triplicata, e as respectivas curvas de amplificação são utilizadas para elaboração da equação linear do experimento.

11.2. PCR em tempo real

A quantificação absoluta de genes de resistência a antibióticos é realizada por meio de qPCR (sugere-se o equipamento *Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System* acoplado a *7500 Software v2.3*, ThermoFisher®). Emprega-se pares de iniciadores (*primers*) referentes aos genes-alvo, como, por exemplo, os que conferem resistência a sulfonamidas (*sul1*), tetraciclina (*tetA*), β -lactâmicos (*blaTEM*), macrolídeos (*ermB*), quinolonas (*qnrB*), entre outros. As condições de amplificação utilizadas para a quantificação de cada gene estão descritas na **Tabela 2**.

O programa se encerra com a elaboração da curva de *melting* (ou de dissociação), útil para checar a pureza dos produtos amplificados, com a geração de um gráfico no qual, idealmente, se observa um pico único. Tal etapa é crucial para se verificar a possível ocorrência de amplificação de produtos inespecíficos (p. ex.: dímeros de *primer*), que poderiam super ou subestimar os resultados. Esta etapa, comum para todas as reações de qPCR, deve seguir as diretrizes indicadas em cada equipamento (para o aparelho sugerido, esta etapa consistiu em 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C, 30 segundos a 95 °C e 15 segundos a 60 °C).

As reações devem ser realizadas em triplicata, tanto para as amostras, quanto para os controles negativos e diluições das curvas padrão. O volume final de cada reação consiste em 20 μL contendo 10 μL de mix (sugere-se *Power™ SYBR® Green PCR Master Mix* ou *PowerUP™ SYBR® Green Master Mix - Thermo Fisher Scientific*), 2,0 μL de amostra de DNA e *primers* com concentrações indicadas pelo fabricante do mix. O volume final é alcançado completando-se as reações com água ultrapura. Os *master mixes* contêm tampão de PCR, MgCl_2 , enzima *Taq polimerase* (de tipo particular para cada *mix*), dNTPs, e corantes *ROX™* e *SYBR® Green*.

O *SYBR® Green* é um composto fluorescente amplamente utilizado em reações de qPCR, o qual se liga na fita dupla de DNA de maneira altamente específica, e emite fluorescência conforme transcorre a reação de amplificação. A fluorescência emitida é captada pelo equipamento, sendo medida no final de cada ciclo de amplificação para determinar, relativa ou absolutamente, a quantidade de DNA amplificado através da conversão de emissão luminosa em dados numéricos.

Para se estimar o número de cópias dos genes por reação, utiliza-se as equações da reta obtidas a partir das curvas-padrão, conforme explicitado na **Equação 3**. O logaritmo de cada concentração conhecida na série de diluição (eixo X) é plotado contra o valor de *Ct* para essa concentração (eixo Y). A partir desta curva-padrão, informações sobre o desempenho da reação (eficiência), bem como vários parâmetros da reação (incluindo inclinação – *slope*, ordenada na origem – *Y-intercept* e coeficiente de correlação – r^2) podem ser derivadas. As concentrações escolhidas para a curva-padrão devem

abranger a faixa de concentração esperada do alvo nas amostras experimentais.

$$Y = aX + b \quad (3)$$

Na qual: Y - valor de Ct; a - inclinação da reta (*slope*); X - log (nº de cópias); b - ordenada na origem (*Y-intercept*).

No método de quantificação por curva-padrão, a inclinação da reta dita a eficiência da reação de qPCR, e os dados são calibrados a partir da ordenada na origem. Neste método, os valores de Ct (utilizados para se calcular o número inicial de cópias de DNA) são transformados em dados quantitativos (nº de cópias do gene de interesse). A eficiência da reação, idealmente, deve apresentar um percentual entre 90% e 110%, o que corresponde a uma inclinação entre -3,58 e -3,10. O coeficiente de correlação (r^2) é uma medida que determina o quão bem os dados se ajustam à curva-padrão, e seu valor reflete a linearidade da curva. Idealmente, seguindo o modelo de regressão linear,

$r^2 = 1$; contudo, para a análise dos dados de qPCR, geralmente são considerados valores de r^2 superiores a 0,99.

Os resultados finais podem ser expressos em número de cópias·mL⁻¹ após aplicação de fatores de conversão. Para tal, os dados obtidos através do *7500 Software v2.3* em nº de cópias são primeiramente convertidos a nº de cópias presentes no volume de solução de eluição contendo DNA total (nº de cópias·100 µL de DNA⁻¹), produto da etapa de extração, considerando: (i) a concentração do material genético no estoque (em ng·µL⁻¹) e após a diluição para ajuste de concentração ideal para a qPCR (aproximadamente 5,0 ng·µL⁻¹); (ii) o volume de DNA utilizado na reação (2,0 µL); e (iii) o volume total de solução contendo DNA total (100 µL). Os resultados são, então, convertidos a nº de cópias·mL⁻¹ considerando-se o volume de amostra filtrado.

As concentrações de GRA determinadas em esgoto bruto variam de 4,0 a 8,0 log₁₀ cópias·mL, e de 3,0 a 7,0 log₁₀ cópias·mL em efluente tratado dependendo do gene de resistência investigado (LEROY-FREITAS, 2020).

Tabela 2 – Condições adotadas para a quantificação de GRA por ensaios de qPCR.

Gene	Primers e seqüências	Amplicon (pb)	Condições	Referência
RNAr 16S ⁽¹⁾	1055-F ATGGCTGTCGTCAGCT 1392-R ACGGGCGGTGTGTAC	337	95 °C por 10 min (1 ciclo); 95 °C por 15 s, 50 °C por 1 min e 72 °C por 1 min (30 ciclos)	Ferris <i>et al.</i> (1996)
<i>int1</i> ⁽¹⁾	<i>int1</i> -F CCTCCCGCACGATGATC <i>int1</i> -R TCCACGCATCGTCAGGC	280	95 °C por 10 min (1 ciclo); 95 °C por 15 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 10 s (40 ciclos)	Goldstein <i>et al.</i> (2001)
<i>suII</i> ⁽¹⁾	<i>suII</i> -F CGCACCGGAAACATCGCTGCAC <i>suII</i> -R TGAAGTCCGCCCAAGGCTCG	163	95 °C por 5 min (1 ciclo); 95 °C 15 s, 60 °C por 1 min (40 ciclos)	Mao <i>et al.</i> (2015)
<i>tetA</i> ⁽¹⁾	<i>tetA</i> -F GCTACATCCTGCTTGCCTTC <i>tetA</i> -R CATAGATCGCCGTAAGAGG	210	94 °C por 5 min (1 ciclo); 94 °C por 30 s, 55 °C por 1 min e 72 °C por 30 s (40 ciclos)	Mao <i>et al.</i> (2015)
<i>bla</i> TEM ⁽¹⁾	<i>bla</i> TEM-F GCACGAGTGGGTTACATCGA <i>bla</i> TEM-R GGTCCTCCGATCGTTGTCAG	311	95 °C por 10 min (1 ciclo); 95 °C 15 s, 60 °C por 1 min (40 ciclos)	Carlson <i>et al.</i> (1999)
<i>ermB</i> ⁽²⁾	<i>ermB</i> -F CGTGCGTCTGACATCTATCTGA <i>ermB</i> -R CTGTGGTATGGCGGGTAAGTT	190	95 °C por 10 min (1 ciclo); 95 °C por 10 s, 57 °C por 30 s e 72 °C por 30 s (40 ciclos)	Mao <i>et al.</i> (2015)
<i>qnrB</i> ⁽²⁾	<i>qnrB</i> -F GCGACGTTCACTGTTTCAG <i>qnrB</i> -R TGTCCTCACTAACGCCTTGTA	148	95°C por 10 min (1 ciclo); 95°C por 10 s, 57°C por 30 s e 72°C por 30 s (40 ciclos)	Mao <i>et al.</i> (2015)

Nota: ⁽¹⁾Power™ SYBR® Green PCR Master Mix. ⁽²⁾PowerUp™ SYBR® Green Master Mix.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio recebido do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, da Fundação de Amparo à Pesquisa

do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Estações Sustentáveis de Tratamento de Esgoto – INCT ETEs Sustentáveis.

Este trabalho faz parte da série de publicações do INCT ETEs Sustentáveis.

REFERÊNCIAS

CARLSON, S. A.; BOLTON, L. F.; BRIGGS, C. E.; HURD, H. S.; SHARMA, V. K.; FEDORKA-CRAY, P. J.; JONES, B. D. Detection of multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104 using multiplex and fluorogenic PCR. *Molecular and cellular probes*, v. 13, n. 3, p. 213-222, 1999.

FERRIS, M. J.; MUYZER, G.; WARD, D. M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and environmental microbiology*, v. 62, n. 2, p. 340-346, 1996.

LEROY-FREITAS, D. *Elementos genéticos de resistência a antibióticos, composição microbiana total e de potenciais patógenos em diferentes estações de tratamento de esgotos sanitários*. Belo Horizonte, 2020. 100 p. Dissertação (Mestrado em Saneamento,

Meio Ambiente e Recursos Hídricos). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

GOLDSTEIN, C.; LEE, M. D.; SANCHEZ, S.; HUDSON, C.; PHILLIPS, B.; REGISTER, B.; GRADY, M.; LIEBERT, C.; SUMMERS, A. O.; WHITE, D. G.; MAURER, J. J. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 3, p. 723-726, 2001.

MAO, D.; YU, S.; RYSZ, M.; LUO, Y.; YANG, F.; LI, F.; HOU, J.; MU, Q.; ALVAREZ, P. Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, v. 85, p. 458-466, 2015.



Roteiros para análises e determinações em amostras de esgoto

Roteiro 3 – Determinação de bactérias do ciclo do nitrogênio por PCR em tempo real (qPCR)

*Protocols for analysis and determinations in sewage samples
Protocol 3 – Determination of bacteria and genes
of the nitrogen cycle by qPCR*

Alyne Duarte Pereira¹, Juliana Calábria de Araújo^{2*}

1. DEFINIÇÃO DE TERMOS

DNA Ácido desoxirribonucleico
ETE Estação de tratamento de esgoto
GRA Genes de resistência a antibióticos
qPCR Reação em cadeia da polimerase em tempo real

2. OBJETIVO

O objetivo deste roteiro é apresentar a metodologia para a identificação e quantificação de bactérias do ciclo do nitrogênio por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR, do inglês *quantitative real-time polymerase chain reaction*) em amostras de lodo e de esgoto.

3. CONCEITOS BÁSICOS

A reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polimerase chain reaction*) é uma metodologia independente de cultivo, que possibilita a síntese de fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA), usando a enzima DNA-polimerase. Esta enzima sintetiza uma sequência complementar de DNA, após a ligação de um pequeno fragmento (o iniciador, ou *primer*) a uma das cadeias do DNA alvo no ponto escolhido para início da síntese. A reação é realizada dentro de um termociclador, onde ocorrem etapas de desnaturação

do DNA, possibilitando posteriormente o anelamento dos iniciadores à fita de DNA e a extensão dessa fita. Estas etapas são realizadas em diferentes temperaturas dentro do termociclador. Como resultado, é obtida a amplificação de determinada sequência de DNA (dependendo do iniciador utilizado) com milhões de cópias deste fragmento.

4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

A qPCR é capaz de monitorar o progresso da PCR enquanto ela é realizada. Os dados são coletados ao longo da reação, o que revoluciona completamente o método de abordagem da quantificação de DNA e ácido ribonucleico (RNA) pela PCR. A PCR em tempo real utiliza o momento do ciclo da reação no qual a amplificação de um alvo é detectada pela primeira vez, ao invés da quantidade de alvo acumulado, após um determinado número de ciclos. Quanto mais alto o número de cópias iniciais do ácido nucleico alvo, mais rápido será observado o aumento significativo na fluorescência.

5. INTERFERENTES/CUIDADOS

Os procedimentos de centrifugação das amostras de lodo, extração de DNA total e quantificação de genes das

¹Bióloga pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Mestre e doutora em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Integrante do INCT em Estações Sustentáveis de Tratamento de Esgotos (INCT ETEs Sustentáveis).

²Bióloga pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Mestre e Doutora em Hidráulica e Saneamento pela Universidade de São Paulo (EESC-USP). Professora associada do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG. Subcoordenadora do INCT ETEs Sustentáveis.

*Endereço para correspondência: Avenida Antônio Carlos 6627 - Universidade Federal de Minas Gerais - Escola de Engenharia - Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - Bloco 1. Belo Horizonte, MG. CEP: 31270-901. e-mail: juliana@desa.ufmg.br

bactérias do ciclo do nitrogênio por qPCR devem atender as seguintes considerações importantes para a obtenção de resultados confiáveis e de qualidade:

- Amostras devem ser devidamente homogeneizadas antes das centrifugações.
- Volumens a serem centrifugados devem ser obrigatoriamente medidos e registrados para o cálculo posterior da qPCR.
- Os *pellets* provenientes da centrifugação das amostras devem ser armazenados, preferencialmente, a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até que sejam submetidos à extração de DNA.
- DNA total extraído deve ser armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Produtos da clonagem bacteriana devem ser armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Reagentes de PCR convencional, qPCR e clonagem bacteriana devem ser armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, quando em uso, devem ser mantidos em *racks* refrigeradas.

Todo o material utilizado (aparatos de filtração, pinças, ponteiros, tubos, placas) deve estar estéril e o uso de luvas é imprescindível durante todas as etapas, a fim de se evitar qualquer tipo de contaminação. Para a montagem da reação de qPCR, as luvas devem ser sem talco.

6. APLICAÇÃO DO MÉTODO

O método se aplica a determinação e a quantificação de genes de bactérias do ciclo do nitrogênio (gene RNAr 16S

de bactérias anammox, RNAr 16S de *Nitrobacter*, RNAr 16S de *Nitrospira*, gene *amoA* que codifica a enzima amônia monoxigenase de bactérias oxidadoras de amônia - BOA e gene óxido nitroso redutase de bactérias desnitrificantes) em amostras de lodo e esgoto. Este método foi testado e aplicado para a quantificação de bactérias do ciclo do nitrogênio presentes em reatores com atividade anammox (LEAL *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2019).

7. FLUXOGRAMA DO MÉTODO

Na **Figura 1** é apresentado o fluxograma simplificado do método de determinação e a quantificação de genes de bactérias do ciclo do nitrogênio por qPCR.

8. COLETA/AMOSTRAGEM, ACONDICIONAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS

As amostras de lodo devem ser coletadas em frascos de 50 a 100 mL e transportadas até o laboratório em caixa de isopor contendo gelo. Ao chegar ao laboratório, as amostras devem ser centrifugadas a 10.000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos. Após a centrifugação, as amostras devem ser lavadas três vezes com tampão fosfato-salino (PBS 1X, NaCl, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , pH entre 7,2 e 7,4), sendo centrifugadas novamente após cada lavagem. Após lavagem, transferir uma alíquota contendo 0,5 g de

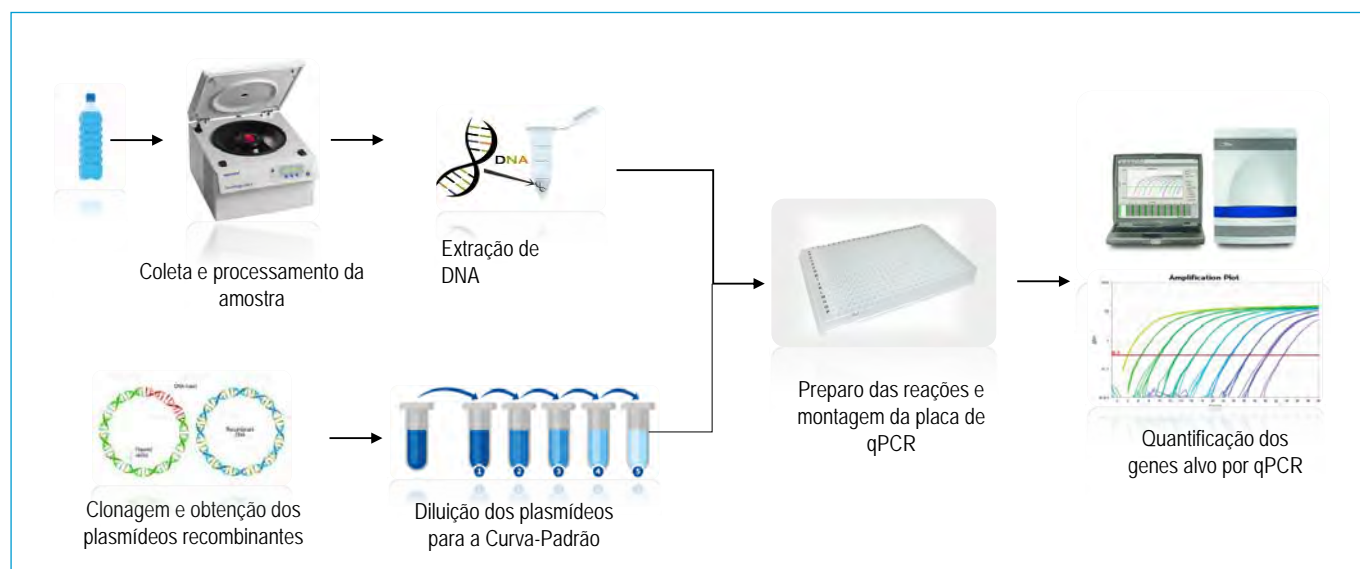


Figura 1 – Etapas da quantificação por qPCR.

lodo para tubo do tipo Eppendorf (2 mL). Identificar cada tubo com o nome da amostra e a data da coleta. Caso a amostra não seja processada após a lavagem (para a extração de DNA), armazenar a -20 °C. Posteriormente, o lodo deve ser submetido ao processo de extração de DNA, utilizando a metodologia descrita pelo fabricante do kit utilizado. O DNA extraído deve ser armazenado a -80 °C.

9. MATERIAIS

9.1. Aparelhagem

- Termociclador.
- Centrífuga.
- Microcentrífuga para placa de PCR.
- Agitador de tubos tipo Vórtex.
- Espectrofotômetro NanoDrop.
- Capela de Fluxo Laminar.

9.2. Reagentes, padrões e material certificado

- Tampão fosfato-salino (PBS 1X, NaCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, pH = 7,2-7,4).
- Master mix para qPCR (inclui os reagentes para a qPCR: tampão, MgCl₂, a enzima Taq polimerase Hot start, dNTPs, o corante SYBR Green I e o corante de referência passiva ROX).
- Iniciadores *foward* e *reverse* (ver **Tabela 4**).
- Plasmídeos recombinantes (para construção das curvas padrão).
- Água ultrapura para biologia molecular.

9.3. Outros materiais

- Tubos tipo Eppendorf (2 mL).
- Tubos tipo Eppendorf (500 µL).
- Microplacas para qPCR.
- Suporte para microplacas.
- Micropipetas e ponteiras (1.000 µL, 200 µL, 10 µL).
- Jaleco.
- Luvas.
- Tubos de centrifugação tipo Falcon (50 mL).
- Frasco de coleta (100 mL).
- Caixa de isopor para transporte de amostra.
- Gelo em gel.

10. PROCEDIMENTO

10.1. Montagem das curvas padrão

As curvas padrão são construídas a partir de plasmídeos recombinantes contendo os genes específicos dos organismos alvo. Os plasmídeos utilizados nas curvas padrão para identificação de bactérias do ciclo do nitrogênio, disponíveis no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA), foram obtidos por MacConell (2014). Caso seja necessário realizar a clonagem para obtenção de novos plasmídeos recombinantes, consultar o protocolo para Clonagem bacteriana utilizando o kit *pGEM[®]-T Easy Vector* (Promega) e o *buffer 2x Rapid Ligation* (Promega), seguindo instruções do fabricante.

O Plasmídeo recombinante (plasmídeo + inserto) deve ser quantificado em espectrofotômetro NanoDrop e, a partir do resultado obtido, calcula-se a massa do inserto de acordo com as etapas seguintes:

- Calcula-se a concentração (em número de cópias·µL⁻¹) dos plasmídeos no primeiro ponto das curvas-padrão, considerando que 1 mol de par de base (pb) possui 649 g (sendo 1 mol equivalente a 6,022 × 10²³ moléculas ou cópias) e que o tamanho do plasmídeo recombinante é igual ao tamanho do plasmídeo (3015 pb) + inserto (variável de acordo com o grupo alvo – ver **Tabela 1**), conforme Equação 1.

$$\text{N}^{\circ} \text{ de cópias} \cdot \mu\text{L}^{-1} = \frac{\text{Concentração do plasmídeo recombinante (g} \cdot \mu\text{L}^{-1}) \times 6,022 \times 10^{23} (\text{cópias})}{\text{Tamanho do plasmídeo recombinante em pb} \times 649 (\text{g})} \quad (1)$$

- O número de cópias por µL do plasmídeo recombinante (plasmídeo + inserto) é o mesmo do inserto, assim tem-se a concentração inicial da curva-padrão.
- Após a estimativa da concentração (em n° de cópias·µL⁻¹) do inserto são realizadas diluições sucessivas do plasmídeo recombinante em água ultrapura. As diluições podem ser nas proporções 1:5 ou 1:10 ou em outra proporção, a depender do plasmídeo a ser utilizado e, também, da quantidade de DNA alvo esperado nas amostras. Recomenda-se a utilização de 6 pontos na curva- padrão.

Na **Tabela 1** são apresentados os plasmídeos utilizados nas curvas padrão para identificação de microrganismos do domínio Bactéria e do ciclo do nitrogênio.

10.2. Preparo das reações para a realização da PCR em tempo real

A concentração dos reagentes utilizados na reação de qPCR é apresentada na **Tabela 2**.

A partir das informações da Tabela 2, calcula-se os volumes dos reagentes a serem pipetados, conforme exemplo apresentado na **Tabela 3**.

Tabela 1 - Plasmídeos utilizados para as curvas padrão.

Gene alvo	Tamanho do inserto	Tamanho do plasmídeo + inserto
Domínio Bacteria	337	3352
RNAr 16S de Anammox	621	3636
RNAr 16S de Nitrobacter	397	3412
RNAr 16S de Nitrospira	151	3166
NosZ de Bactérias desnitrificantes	500	3515
AmoA de Bactérias oxidadoras de amônia	491	3506

Tabela 2 - Concentração de reagentes utilizados na reação de qPCR.

Reagente	Concentração da solução estoque	Concentração final por 20 µL de reação	Volume por reação (µL)
Água ultra-pura	-	-	75
Master mix ⁽¹⁾	2x	1x	10
Iniciador forward	30 pmol/ µL	375 nM	0,25
Iniciador reverse	30 pmol/ µL	375 nM	0,25
Amostra de DNA	2	0,5 ng/ µL	2,0

Nota: ⁽¹⁾O Master mix inclui: tampão, MgCl₂, a enzima *Taq* polimerase *Hot start*, dNTPs, o corante *SYBR Green I* e o corante de referência passiva ROX.

Preparar o mix para a reação da PCR em tubo tipo Eppendorf (2 mL) dentro da capela de fluxo laminar. Para o preparo do mix, pipetar no tubo a quantidade correspondente ao volume total da água ultrapura, do master mix, do iniciador *forward* e do iniciador *reverse*. Distribuir 18 µL do mix em cada poço da placa de qPCR destinado aos pontos da curva-padrão, branco e amostras. Uma representação da placa é mostrada na **Figura 2**.

10.3. Quantificação de genes de bactérias do ciclo do nitrogênio por qPCR

A qPCR para quantificação absoluta de genes específicos de bactérias do ciclo do nitrogênio é realizada por meio do equipamento *Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System* acoplado a *7500 Software v2.3* (ThermoFisher®). São utilizados pares de iniciadores (*primers*) referentes aos genes-alvo, de acordo com o microrganismo que se deseja quantificar. Os iniciadores são apresentados na **Tabela 4**. As condições

Tabela 3 - Cálculo do volume dos reagentes a serem pipetados.

Reação da qPCR (MIX)		
Reagentes	Volume por reação (µL)	Volume total ⁽¹⁾ (ex.: 96 reações)
Água ultra-pura	75	720
Master Mix (2x)	10	960
Iniciador forward	0,25	24
Iniciador reverse	0,25	24
Amostra de DNA ⁽²⁾	2,0	-

Notas: ⁽¹⁾De acordo com o total de reações. ⁽²⁾A amostra de DNA deve ser adicionada fora da capela de fluxo laminar para evitar a contaminação da capela.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP 1	CP 1	CP 1	A1	A1	A1	A10	A10	A10	A18	A18	A18
B	CP 2	CP 2	CP 2	A2	A2	A2	A11	A11	A11	A19	A19	A19
C	CP 3	CP 3	CP 3	A3	A3	A3	A12	A12	A12	A20	A20	A20
D	CP 4	CP 5	CP 6	A4	A4	A4	A13	A13	A13	A21	A21	A21
E	CP 5	CP 5	CP 5	A5	A5	A5	A14	A14	A14	A22	A22	A22
F	CP 6	CP 6	CP 6	A6	A6	A6	A15	A15	A15	A23	A23	A23
G				A7	A7	A7	A16	A16	A16	A24	A24	A24
H	Branco	Branco	Branco	A8	A8	A8	A17	A17	A17	A25	A25	A25

CP: Curva-padrão; A: Amostra

Figura 2 - Representação da Placa de qPCR com a localização da curva padrão, branco e amostras.

Tabela 4 – Condições adotadas para a quantificação de genes de bactérias do ciclo do nitrogênio por ensaios de qPCR.

Gene	Primers e sequências	Amplicon (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
RNAr 16S do domínio Bactéria	1055-F ATGGCTGTCGTCAGCT 1392-R ACGGGCGGTGTGTAC	337	53	Ferris <i>et al.</i> (1996)
RNAr 16S de Bactérias Anammox	<i>Pla 46F</i> GGATTAGGCATGCAAGTC <i>Amx 667R</i> ACCAGAAGTTCCACTCTC	621	56	Van der Star <i>et al.</i> (2007)
Enzima Amônia monooxigenase (AmoA) de BOA	<i>AmoA-1F</i> GGGGTTTCTACTGGTGG <i>AmoA-1R</i> CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	491	57	Rotthauwe <i>et al.</i> (1997)
RNAr 16S de <i>Nitrobacter</i>	<i>Nitro-1198F</i> ACCCCTAGCAAATCTCAAAAAACCG <i>Nitro-1423R</i> CTTCACCCAGTCGCTGACC	397	58	Graham <i>et al.</i> (2007)
RNAr 16S de <i>Nitrospira</i>	<i>NTSPAF</i> CGCAACCCCTGCTTTCAGT NTSPAR CGTTATCCTGGGCAGTCCTT	151	60	Kindaichi <i>et al.</i> (2006)
Enzima óxido nítrico redutase (nosZ) de bactérias desnitrificantes	<i>nosZF</i> CGYTGTTTCMTCGACAGCCAG <i>nosZ1622R</i> CGSACCTTSTTGCCSTYGCG	500	55	Enwall <i>et al.</i> (2005)

de amplificação usadas no programa consistem em 40 ciclos de desnaturação por 1 minuto (94 °C), anelamento dos iniciadores por 1 minuto (temperatura de acordo com os iniciadores, conforme especificado na Tabela 4) e extensão por 1 minuto. O programa se encerra com a elaboração da curva de *melting* (ou de dissociação), a fim de avaliar a pureza dos produtos amplificados. Esta etapa consiste em 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C e 15 segundos a 60 °C.

Para se estimar o número de cópias dos genes por reação, são utilizadas as equações da reta obtidas a partir das curvas-padrão, conforme **Equação 2**. O logaritmo de cada concentração conhecida na série de diluição (eixo X) é plotado contra o valor de Ct (*Ciclo threshold*) para essa concentração (eixo Y). A partir desta curva-padrão, informações sobre o desempenho da reação (eficiência), bem como vários parâmetros da reação (incluindo inclinação – *slope*, ordenada na origem – *Y-intercept* e coeficiente de correlação – r^2) podem ser derivadas. As concentrações

escolhidas para a curva-padrão devem abranger a faixa de concentração esperada do alvo nas amostras experimentais.

$$Y = aX + b \quad (2)$$

Na qual: Y - valor de Ct; a - inclinação da reta (*slope*); X - log (nº de cópias); b - ordenada na origem (*Y-intercept*).

No método de quantificação por curva-padrão, a inclinação da reta dita a eficiência da reação de qPCR, e os dados são calibrados a partir da ordenada na origem. Neste método, os valores de Ct (utilizados para se calcular o número inicial de cópias de DNA) são transformados em dados quantitativos (nº de cópias do gene de interesse). A eficiência da reação, idealmente, deve apresentar um percentual entre 90% e 110%, o que corresponde a uma inclinação entre -3,58 e -3,10. O coeficiente de correlação (r^2) é uma medida que determina

o quão bem os dados se ajustam à curva-padrão, e seu valor reflete a linearidade da curva. Idealmente, seguindo o modelo de regressão linear, $r^2 = 1$; contudo, para a análise dos dados de qPCR, geralmente são considerados valores de r^2 superiores a 0,99.

Os resultados finais podem ser expressos em nº de cópias·g⁻¹ de lodo após aplicação de fatores de conversão. Para isso, os resultados obtidos por meio do 7500 Software v2.3 em nº de cópias·µL⁻¹ devem ser multiplicados pelo volume de DNA utilizado na reação (2 µL) e, em seguida, multiplicado pelo volume total de DNA obtido na extração de DNA (100 µL) a partir de 0,5 g de lodo. A concentração de bactérias do ciclo do nitrogênio determinada por este método dependerá das condições operacionais do

reator bem como do tipo de efluente a ser tratado (LEAL *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.* 2019).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio recebido do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Estações Sustentáveis de Tratamento de Esgoto – INCT ETEs Sustentáveis.

Este trabalho faz parte da série de publicações do INCT ETEs Sustentáveis.

REFERÊNCIAS

- ENWALL, K.; PHILIPPOT, L.; HALLIN, S. Activity and Composition of the Denitrifying Bacterial Community Respond Differently to Long-Term Fertilization. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 12, p. 8.335-8.343, 2005.
- FERRIS, M. J.; MUYZER, G.; WARD, D. M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and environmental microbiology*, v. 62, n. 2, p. 340-346, 1996.
- FERNANDES, L. A.; PEREIRA, A. D.; LEAL, C. D.; DAVENPORT, R.; WERNER, D.; MOTA, C. R.; RIBEIRO, T. B.; CHERNICHARO, C. A.; DE ARAÚJO, J. C. Effect of temperature on microbial diversity and nitrogen removal performance of an anammox reactor treating anaerobically pretreated municipal wastewater. *Bioresource Technology*, v. 256, p. 365, 2018.
- GRAHAM, D. W.; KNAPP, C. W.; VLECK, E. S. VAN; BLOOR, K.; LANE, T. B.; GRAHAM, C. E. Experimental demonstration of chaotic instability in biological nitrification. *The ISME Journal*, v. 1, n. 5, p. 385-393, 2007.
- KINDAICHI, T.; KAWANO, Y.; ITO, T.; SATOH, H.; OKABE, S. Population dynamics and in situ kinetics of nitrifying bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by real-time quantitative PCR. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 94, n. 6, p. 1.111-1.121, 2006.
- LEAL, C. D.; PEREIRA, A. D.; NUNES, F. T.; FERREIRA, L. O.; COELHO, A. C.; BICALHO, S.; CONELL, E. F. A. M.; RIBEIRO, T. B.; CHERNICHARO, C. A.; ARAÚJO, J. C. Anammox for nitrogen removal from anaerobically pre-treated municipal wastewater: Effect of COD/N ratios on process performance and bacterial community structure. *Bioresource Technology*, v. 211, p. 257-266, 2016.
- MAC CONELL, E. F. A. *Caracterização da comunidade bacteriana de filtros biológicos percoladores tratando efluente anaeróbio*. 2014, 159 f. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.
- PEREIRA, A. D.; FERNANDES, L. A.; CASTRO, H. M.; LEAL, C. D.; CARVALHO, B. P.; DIAS, M. F.; NASCIMENTO, A. A.; CHERNICHARO, C. A. L.; DE ARAÚJO, J. C. Nitrogen removal from food waste digestate using partial nitrification-anammox process: effect of different aeration strategies on performance and microbial community dynamics. *Journal of Environmental Management*, v. 251, p. 109562, 2019.
- ROTHAUWE, J. H.; WITZEL, K. P.; LIESACK, W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and environmental microbiology*, v. 63, n. 12, p. 4704-4712, 1997.
- VAN DER STAR, W. R. L.; ABMA, W. R.; BLOMMERS, D.; MULDER, J.; TOKUTOMI, T.; STROUS, M.; PICIOREANU, C.; LOOSDRECHT, M. C. M. VAN. Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. *Water Research*, v. 41, p. 4149-4163, 2007.



Roteiros para análises e determinações em amostras de esgoto

Roteiro 4 - Quantificação de colifágos F específicos e somáticos

Protocols for analysis and determinations in sewage samples
Protocol 4 - Quantification of F-specific and somatic coliphages

Maria Fernanda Espinosa¹, César Rossas Mota Filho^{2*}

1. DEFINIÇÃO DE TERMOS

ETE	Estação de tratamento de esgoto
PBW	<i>Phosphate Buffered Water</i>
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFP	Unidades formadoras de placas
VEH	Vírus entéricos humanos

2. OBJETIVO

O objetivo deste roteiro é disponibilizar uma metodologia de processamento de amostras de esgoto bruto ou tratado para a quantificação de colifagos F-específicos e somáticos.

3. CONCEITOS BÁSICOS

Os colifagos são vírus que infectam células de bactérias do grupo coliformes incluindo *Escherichia Coli* (*E. Coli*). Geralmente são encontrados no intestino, sendo excretados nas fezes de humanos e outros animais de sangue quente. Os colifagos têm-se tornado modelos, ou melhor, indicadores de Vírus Entéricos Humanos (VEH),

porque compartilham algumas características similares com os VEH, como estrutura, composição, morfologia, tamanho e lugar de réplica e outras propriedades como remoção e resistência a processos de desinfecção (GRABOW, 2001; JOFRE *et al.*, 2016; DIAS *et al.*, 2018). São facilmente detectáveis e quantificáveis com técnicas de cultivo rápidas, simples e de baixo custo (GRABOW, 2001; JOFRE *et al.*, 2016).

Os colifagos são detectados e enumerados usando o método quantitativo de placas (ADAMS, 1959), que pode ser realizado usando camada simples ou dupla de ágar. O método baseia-se na quantificação de placas, formadas devido à lise celular que pode ocorrer por um único virion ou por um aglomerado de virions, que dão origem a uma única unidade formadora de placa (UFP) (JOFRE *et al.*, 2016).

4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Um volume de amostra (500 µL), previamente filtrada (filtros de seringa de membrana de polietersulfona - PES

¹Engenheira Civil pela Universidad de Cuenca, Equador. Mestre e Doutora em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

²Engenheiro Civil pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Mestre em Engenharia Civil e Ambiental pela University of Nevada, EUA. Doutor em Engenharia Civil e Ambiental pela North Carolina State University, EUA. Professor associado do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG. Subcoordenador do NCT INCT ETES Sustentáveis.

*Endereço para correspondência: Avenida Antônio Carlos 6.627 - Universidade Federal de Minas Gerais - Escola de Engenharia - Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - Bloco 1. Belo Horizonte, MG. CEP: 31270-901. e-mail: cesar@desa.ufmg.br

de 0,22 μm) para remover sólidos suspensos e bactérias indesejadas, é complementado com as bactérias hospedeiras. No meio de ágar fundido (15 mL) é colocada uma camada inferior (5 mL) que contém a amostra e o hospedeiro. Depois que a camada de ágar e a amostra que contém as bactérias hospedeiras se solidificam, a placa é incubada a 37 °C durante a noite (14 horas) para que ocorra o desenvolvimento de zonas circulares formadas pela lise da célula bacteriana (placas). Tais placas de lise são contadas e a concentração de colifagos é calculada como unidades formadoras de placas (UFP) por unidade de volume de amostra. O método de dupla camada de ágar aqui apresentado é baseado nos protocolos descritos em 9224B e 9224C dos *Standard Methods* (APHA/AWWA/WEF, 2017).

5. INTERFERENTES/CUIDADOS

Os procedimentos de diluição de amostras de esgoto e quantificação de colifagos devem atender a algumas considerações importantes para a obtenção de resultados confiáveis e de qualidade:

- As amostras devem ser devidamente homogêneas antes das diluições.
- A cada diluição deve-se padronizar a homogeneização e realizar a troca das ponteiras.
- Sempre incubar as amostras com as placas Petri invertidas e por período de 16 a 18 horas à temperatura de 37,5 °C.
- A faixa recomendada de placas de lise por placa Petri para contagem e quantificação deve ser entre 20 e 200 UFP. Placas Petri com menos de 20 placas de lise podem gerar resultados subestimados, e placas Petri com mais de 200 placas podem gerar resultados superestimados.

Todo o material utilizado (tubos, placas, filtros, ponteiras) deve estar estéril e o uso de luvas é imprescindível durante todas as etapas, a fim de se evitar qualquer tipo de contaminação.

6. APLICAÇÃO DO MÉTODO

Este método é aplicável a matrizes ambientais líquidas como esgoto bruto e tratado, e matrizes sólidas como lodo de estações de tratamento de esgoto (ETEs).

7. FLUXOGRAMA DO MÉTODO

Na **Figura 1** é apresentado o fluxograma simplificado do método de dupla camada de ágar para enumeração de colifagos F-específicos e somáticos.

8. MATERIAIS

8.1. Aparelhagem

- Autoclave.
- Capela de fluxo laminar.
- Estufa.
- Freezer, -20 °C.
- Geladeira, 4 °C.
- Incubadora *Shaker*.
- Agitador de tubos tipo Vórtex.

8.2. Cepas das bactérias hospedeiras

- *E. Coli* Famp (ATCC#700891) para colifagos F-específicos.
- *E. Coli* CN13 (ATCC#700609) para colifagos somáticos.

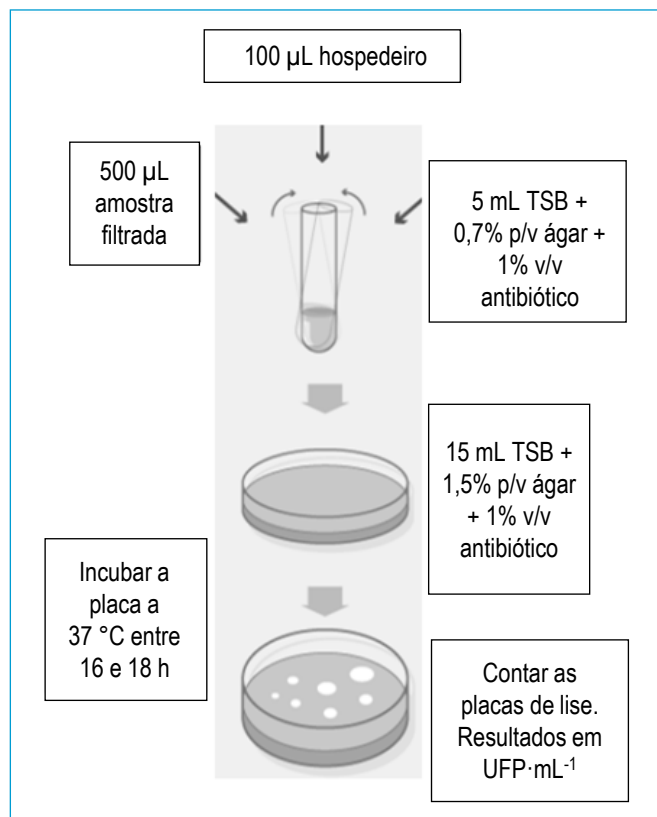


Figura 1 – Fluxograma do método de dupla camada de ágar para enumeração de colifagos F-específicos e somáticos.

8.3. Outros materiais

- 4 Erlenmeyer de 100 mL estéril (autoclavado a 121 °C por 15 min).
- Frascos tipo Schott de 500 mL e 250 mL.
- Agitador magnético estéril (autoclavado a 121 °C por 15 min).
- Ponteiras de 10 e 1.000 µL estéreis.
- Placas Petri estéreis.
- Seringas de 10 ou 20 mL.
- Filtro para seringa KASVI, Membrana PES 0.22 µm estéril - K18-230.
- Luvas.
- Jaleco.
- Micropipetas e ponteiras (1.000 µL, 200 µL, 10 µL).
- Papel craft.
- Fita de autoclave.
- Papel toalha.
- Tubos com tampa de rosca (2 mL).
- Meio de cultura TSB (do inglês, *tryptic soy broth*).
- Ágar bacteriológico.

9. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE ESGOTO

9.1. Coleta e transporte

As coletas devem ser realizadas utilizando-se frascos estéreis de, ao menos, 1.000 mL, contendo identificação, incluindo código da amostra e data da coleta. Sugere-se que a amostragem seja feita de maneira composta (coletar cerca de 1 L de amostra a cada 20 minutos, por período de 1h; ao final misturar essas amostras compondo uma única). O transporte ao laboratório deve ser feito sob refrigeração (temperatura entre 2 e 8 °C).

9.2. Preparação de antibióticos

Estoque de antibiótico ampicilina/estreptomicina para hospedeiro FAMP (ATCC#700891):

1. Dissolver 0,15 g de sal de ampicilina sódica e 0,15 g de sulfato de estreptomicina em 100 mL de água destilada.
2. Esterilizar a solução por meio de filtração. Usar filtro de seringa de membrana PES de 0,22 µm estéril.
3. Dispensar 5 mL em tubos tipo Falcon estéreis de 15 mL. Colocar a data da preparação nos tubos, e

armazenar congelado a -20 °C (pode ser conservado por até um ano).

4. Antes da utilização: descongelar em temperatura ambiente ou aquecer em banho-maria a 36 °C e homogeneizar bem.

Estoque de antibiótico com ácido nalidíxico para hospedeiro CN13 (ATCC#700609):

1. Dissolver 1,0 g de ácido nalidíxico em 100 mL de água destilada.
2. Esterilizar a solução por meio de filtração. Usar filtro de seringa de membrana PES de 0,22 µm estéril.
3. Dispensar 5 mL em tubos tipo Falcon estéreis de 15 mL. Colocar a data da preparação nos tubos, e armazenar congelado a -20 °C (pode ser conservado por até um ano).

Antes da utilização dos antibióticos: descongelar à temperatura ambiente e homogeneizar bem.

9.3. Preparação de meios de cultura

9.3.1. Preparação do caldo TSB para crescimento das bactérias hospedeiras overnight e fase log

1. Em um frasco tipo Schott de 250 mL, adicionar 3 g de pó TSB para cada 100 mL de água destilada.
2. Misturar bem, aquecendo lentamente para dissolver.
3. Para crescimento *overnight* (de 18 a 20 horas de incubação) e para crescimento da fase log (4 horas de incubação), verter 25 mL em 4 Erlenmeyer de 100 mL.
4. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.
5. Deixar esfriar em banho-maria a 55 °C.
6. Colocar 1% (v/v) do antibiótico para cada hospedeiro, respectivamente.
7. Guardar na geladeira (4 °C) até o uso. Máximo 1 mês.

9.3.2. Preparação do caldo TSB + ágar (TSA, do inglês *tryptic soy agar*) para placas Petri e camada de ágar overlay

Placas Petri com TSA:

1. Preparar o caldo em um frasco tipo Schott de 500 mL, usando a relação de 3 g de pó TSB para cada 100 mL água destilada. O volume de água destilada pode ser determinado pela **Equação 1**:

$$\text{Volume (mL)} = (\text{n}^\circ \text{ de placas} \times 16 \text{ mL}) + 10\% \quad (1)$$

Na qual: 16 mL é o volume equivalente aproximado que será vertido em cada placa Petri; 10% é o fator de segurança devido a perdas.

- Adicionar ágar bacteriológico a 1,5% (p/v) no caldo TSB (p. ex.: 1,5 g de ágar para cada 100 mL de caldo TSB), aquecer durante a mistura.
- Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.
- Deixar esfriar em banho-maria (55 °C).
- Adicionar 1% (v/v) de antibiótico respectivo para cada hospedeiro.
- Verter entre 15 e 17 mL em cada placa Petri.
- Deixar a placa esfriar à temperatura ambiente até o meio ficar sólido.
- Colocar as placas em saquinhos e identificar com o tipo de meio (TSA), data e responsável. Guardar a 4 °C até o uso (máximo um mês).

Tubos com TSA overlay:

- Preparar o caldo em um frasco tipo Schott de 500 mL, usando a relação de 3 g do meio de cultura TSB para cada 100 mL de água destilada. O volume de água destilada pode ser determinado pela **Equação 2:**

$$\text{Volume (mL)} = (\text{n}^\circ \text{ de placas} \times 16 \text{ mL}) + 10\% \quad (2)$$

Na qual: 6 mL é o volume equivalente aproximado que será vertido em cada tubo overlay; 10% é o fator de segurança devido a perdas.

- Adicionar ágar a 0,7% (p/v) no caldo TSB, aquecer durante a mistura.
- Verter 5 a 6 mL em tubos pequenos de vidro e colocar a tampa meia rosca.
- Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.
- Deixar esfriar em banho-maria à temperatura de 55 °C.
- Adicionar 1% (v/v) de antibiótico respectivo para cada hospedeiro.
- Fazer apenas um dia antes da análise e guardar na estufa a 60 °C para não endurecer.

Importante: Não adicionar os antibióticos (ampicilina/estreptomicina ou ácido nalidíxico) ao TSB até que a

temperatura esteja em 55 °C ou inferior (superior a 35 °C para evitar endurecer o ágar). Os antibióticos só poderão ser adicionados no dia do plaquamento.

9.4. Preparação de reagentes para diluição

Água Tamponada Fosfato (PBW, do inglês Phosphate Buffered Water): utilizada para diluição de amostras

Soluções estoque de KH_2PO_4 (Peso Fórmula 136,09):

- Dissolver 34,0 g para 500 mL de água destilada.
- Ajustar o pH para $7,2 \pm 0,2$, e depois diluir a 1 L.
- Esterilizar por autoclavagem durante 15 minutos a 121 °C.

Soluções estoque de MgCl_2 (Peso Fórmula 203,3):

- Dissolver 40,6 g para 500 mL de água destilada.
- Esterilizar por autoclavagem durante 15 minutos a 121 °C.

Solução PBW de trabalho (1X):

(Para preparar um litro)

- Adicionar 1,25 mL da solução estoque KH_2PO_4 e 5,0 mL da solução estoque MgCl_2 a um frasco tipo Schott.
- Adicionar 950 mL água Millipore ao frasco tipo Schott.
- Ajustar o pH para $7,2 \pm 0,2$ com 1N NaOH e 1N HCl.
- Ajustar o volume final para 1,0 L.
- Esterilizar por autoclavagem durante 15 minutos a 121 °C.

9.5. Preparação dos hospedeiros *overnight* e fase log

9.5.1. *E. coli* FAMP de Trabalho (ATCC#700891)

Cultura overnight:

- Usar a preparação do item 4.3.1 (Erlenmeyer com caldo TSB previamente autoclavado e com antibiótico ampicilina/estreptomicina).
- Deixar um tubo de estoque de *E. Coli* FAMP para descongelar.
- Inocular 2 µL de *E. Coli* FAMP descongelada no Erlenmeyer com TSB e ampicilina/estreptomicina.

4. Tampar o Erlenmeyer com papel craft e incubar a 37 °C com agitação de 100 a 150 rpm durante uma noite (entre 18 e 20 horas).
5. Armazenar a 4 °C até o uso.

Cultura Fase Log (em fase de crescimento logarítmico):

1. Inocular 1 mL da *E. Coli* FAMP *overnight* no Erlenmeyer com TSB e ampicilina/ estreptomicina preparado no item 4.3.1.
2. Incubar o Erlenmeyer durante 4 horas com agitação de 100 a 150 rpm a 37 °C.
3. Usar esta cepa imediatamente ou deixar a 4 °C por até, no máximo, 2 horas.

9.5.2. *E. coli* CN-13 de Trabalho (ATCC#700609)

Utilizar mesmo procedimento para *E. Coli* FAMP, somente usando TSB com ácido nalidíxico.

10. QUANTIFICAÇÃO DAS PLACAS

10.1 Análise específica para amostras líquidas de esgoto bruto e efluente tratado.

1. Homogeneizar a amostra e, em tubo de ensaio de 15 mL, estéril, filtrar de 5 a 10 mL da amostra utilizando uma seringa estéril de 20 mL e filtro de seringa estéril de 0,22 µL.
2. Tampar o tubo, identificar a amostra e guardar a 4 ± 1 °C até estar pronto para o ensaio. Usar dentro de 24 h.
3. Preparar as diluições com PBW (item 9.4). Para encontrar o melhor fator de diluição (FD) da amostra, deverão ser testadas pelo menos 3 diluições. Para o esgoto bruto, as diluições recomendadas são: 10:1, 10:2; para efluente tratado: sem diluição, 10:1, 10:2.
4. Remover as placas e os antibióticos da geladeira e deixar em temperatura ambiente uma hora antes da análise.
5. Ligar a luz UV da capela previamente, com período aproximado de 20 min.
6. Checar pipetas e ponteiros de 100, 200 e 1.000 µL
7. Preparar apenas 4 placas de cada vez, pois o ágar overlay endurece rapidamente. O recomendável é fazer as análises por antibiótico e não por amostra. Fica mais ágil.

8. Pegar o tubo pequeno com ágar *overlay* da estufa e adicionar as soluções na seguinte ordem para se evitar a contaminação dos reagentes:
 - 50 µL (0,05 mL) de antibiótico;
 - 100 µL (0,1 mL) de cultura fase log (hospedeiro); e
 - 500 µL (0,5 mL) de amostra líquida (com as respectivas diluições).
9. Agitar o tubo entre as palmas das mãos e verter na placa Petri com cuidado. Homogeneizar a amostra em círculos e deixar secando na capela até o ágar endurecer.
10. Depois colocar invertido na estufa a 37±1,0 °C durante período de 16 a 18 horas.
11. Marcar as placas com o nome da cepa, a data e a diluição.
12. Contar o número de zonas transparentes no tapete de bactérias hospedeiras. Estas são as placas de colifagos que infectaram as bactérias hospedeiras.
13. O resultado pode ser determinado pela **Equação 3**:

$$UFP \cdot mL^{-1} = \frac{FD \times (\text{média entre o número de placas das diluições})}{\text{Volume de amostra (0.5 mL)}} \quad (3)$$

14. Resultado esperado: Geralmente, para amostras de esgoto bruto obtém-se valores de colifagos da ordem de 10³ a 10⁵ UFP·100 mL⁻¹ e para efluente secundário tratado, da ordem de 10² a 10⁴ UFP·100 mL⁻¹, a depender do tipo de sistema biológico de tratamento.

10.2. Análise específica para amostras de lodo de ETEs

Em amostras sólidas, os vírus precisam ser extraídos seguindo o protocolo descrito por Guzmán *et al.* (2007):

1. Preparar 25 mL de amostras de lodo com extrato de carne 10% na proporção de 1:10 (v/v).
2. Para preparar a solução de extrato de carne 10%: 225 mL de água destilada são misturados com 22,5 g de extrato de carne, o pH é ajustado para 7,2 e a solução é esterilizada antes de ser misturada com a amostra.
3. Misturar com a amostra e homogeneizar por agitação magnética (de 500 a 900 rpm) à temperatura ambiente por 20 min.
4. Centrifugar a amostra a 4.000 × g por 30 min.
5. Filtrar o sobrenadante através de membranas de tamanho de poro de 0,22 µm. Este filtrado é utilizado como amostra final do lodo.

6. Continuar com o passo 3 em diante do item 10.1.
7. Os resultados dos colifagos nas amostras de lodo são calculados em UFP·mL⁻¹ e depois ajustados e relatados como UFP·g⁻¹ de matéria seca. É necessário realizar análise de sólidos da amostra para fazer a transformação de unidade.
8. Resultado esperado: geralmente a concentração de colifagos verificada em amostra de lodo está entre 10³ e 10⁴ UFP·g⁻¹, a depender do tipo de sistema de tratamento de origem do lodo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio recebido do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Estações Sustentáveis de Tratamento de Esgoto – INCT ETEs Sustentáveis.

Este trabalho faz parte da série de publicações do INCT ETEs Sustentáveis.

REFERÊNCIAS

ADAMS, M. *Bacteriophages*. New York, USA: Interscience Publishers Inc, 1959. 592 p.

APHA/AWWA/WEF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 23th ed. Washington, USA: American Public Health Association. 2017. 1504 p.

DIAS, E.; EBDON, J.; TAYLOR, H. The application of bacteriophages as novel indicators of viral pathogens in wastewater treatment systems. *Water Research*, v. 129, p. 172-179, 2018.

GRABOW, W. O. K. Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water. *Water SA*, v. 27, n. 2, p. 251-268, 2001.

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

JOFRE, J.; LUCENA, F.; BLANCH, A. R.; MUNIESA, M. Coliphages as model organisms in the characterization and management of water resources. *Water*, v. 8, n. 5, p. 1-21, 2016.



Roteiros para análises e determinações em amostras de esgoto

Roteiro 5 – Concentração e quantificação do novo coronavírus por técnicas moleculares

*Protocols for analysis and determinations in sewage samples
Protocol 5 – Concentration and quantification
of the new coronavirus by molecular techniques*

Cíntia Dutra Leal¹, Maria Fernanda Espinosa², Juliana Calabria de Araújo^{3*}

1. DEFINIÇÃO DE TERMOS

SARS-CoV-2 Síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2.

qPCR Reação em cadeia da polimerase em tempo real.

RT-qPCR Reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcrição reversa.

2. OBJETIVO

O objetivo deste roteiro é descrever a metodologia para concentração e quantificação do novo coronavírus por técnicas moleculares, que possa ser utilizada em vários laboratórios de países em desenvolvimento, já que utiliza equipamentos convencionais para filtração de amostras de água e esgoto.

3. CONCEITOS BÁSICOS

A detecção do novo coronavírus, (SARS-CoV-2, do inglês *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) em amostras de esgoto é realizada pela técnica da reação em cadeia

da polimerase em tempo real com transcrição reversa (RT-qPCR, do inglês *reverse transcription quantitate real-time polymerase chain reaction*). Os *primers* e sondas (oligonucleotídeos marcados com fluorescência) para a detecção do SARS-CoV-2 foram selecionados a partir de regiões do gene da nucleocapsídeo (N) do vírus. Na reação da RT-qPCR ocorre a transcrição reversa do ácido ribonucleico (RNA) isolado das amostras de esgoto para cDNA, por meio de reagentes e enzimas, e posterior amplificação do material genético no equipamento de PCR em tempo real (qPCR). Na técnica de qPCR, o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado Ciclo de *Threshold* (Ct), que permite a quantificação exata e reprodutível de acordo com a fluorescência emitida. A intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de produto gerado na reação, e os resultados são visualizados em gráfico de amplificação. A técnica RT-qPCR é considerada padrão ouro pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para a detecção do novo coronavírus causador da Covid 19.

¹Bióloga pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-MG). Especialista em Microbiologia Ambiental e Industrial pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela UFMG. Técnica responsável pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG.

²Engenheira Civil pela Universidad de Cuenca, Equador. Mestre e Doutora em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela UFMG.

³Bióloga pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Mestre e Doutora em Hidráulica e Saneamento pela Universidade de São Paulo (EESC-USP). Professora associada do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG. Subcoordenadora do NCT INCT ETEs Sustentáveis.

*Endereço para correspondência: Avenida Antônio Carlos 6627 - Universidade Federal de Minas Gerais - Escola de Engenharia - Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - Bloco 1, Belo Horizonte, MG. CEP: 31270-901. e-mail: juliana@desa.ufmg.br

4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

O processamento das amostras de água e esgoto para concentração de partículas virais e quantificação do material genético viral por técnicas moleculares compreende três etapas: (i) concentração do vírus; (ii) extração do RNA viral; e (iii) detecção e quantificação do vírus através da RT-qPCR. Para este fim, as extrações de RNA e o qPCR são geralmente realizados utilizando-se kits comerciais.

A adequabilidade deste protocolo foi demonstrada no âmbito do *Projeto-piloto: Detecção e quantificação do novo coronavírus em amostras de esgoto nas cidades de Belo Horizonte e Contagem, que pode ser acessado em: <https://www.gov.br/ana/pt-br/assuntos/acontece-na-ana/monitoramento-covid-esgotos>*.

5. INTERFERENTES/CUIDADOS

Para manipulação das amostras de esgoto e realização da análise de RT-qPCR para detecção do material genético do vírus, deve-se seguir o Protocolo de Biossegurança disponibilizado pelo Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC, do inglês *Center for Disease Control and Prevention*), disponível em <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab-biosafety-guidelines.html> (CDC, 2019), e os cuidados apresentados a seguir:

- Uso de equipamentos de proteção individual (EPI), tais como luvas, jalecos, touca, protetor facial (*face shield*) e proteção para os olhos.
- Todo o material utilizado (aparatos de filtração, pinças, ponteiros, tubos, placas) deve estar estéril e o uso de luvas é imprescindível durante todas as etapas, a fim de se evitar qualquer tipo de contaminação.
- As amostras devem ser devidamente homogeneizadas antes das filtrações.
- Volumes a serem filtrados devem ser obrigatoriamente medidos e registrados para o cálculo final dos resultados do RT-qPCR.
- Sempre utilizar luvas sem talco para o preparo das reações do qPCR.
- Manipular os reagentes de Biologia Molecular no local adequado e com luvas limpas.
- Manter locais separados fisicamente para cada etapa: (i) extração do RNA; (ii) manipulação dos reagentes;

e (iii) montagem do mix e adição das amostras nas microplacas.

- Usar sempre ponteiros com barreiras (filtros).
- Limpar as bancadas, pipetas e equipamentos que serão usados antes e após o uso com solução de álcool 70%.
- Utilizar álcool 70% para descontaminação das bancadas onde houver manipulação de RNA. A solução RNase Away™ deve ser usada para descontaminar as superfícies e pipetadores a fim de evitar contaminação e/ou degradação do RNA.
- Os reagentes do qPCR devem ser mantidos a -20 °C ou conforme a recomendação do fabricante.
- O RNA total extraído e as membranas após a filtração devem ser armazenadas a -80 °C.
- *Primers*, sondas (incluindo alíquotas) e o mix com as enzimas devem ser descongelados e mantidos em *racks* com gelo (*cold block*) durante todo o tempo de preparação e uso.
- O RNA deve ser mantido em *rack* com gelo (*cold block*) durante a preparação e uso, para garantir a estabilidade.

6. APLICAÇÃO DO MÉTODO

Este método é aplicável a amostras ambientais líquidas como, por exemplo, amostras de água provenientes de corpos hídricos, esgoto bruto e tratado.

7. FLUXOGRAMA DO MÉTODO

Na **Figura 1** é apresentado um fluxograma simplificado das etapas para a determinação de SARS-CoV2 em esgoto.

8. MATERIAIS

8.1. Aparelhagem

- Agitador magnético.
- Autoclave.
- Bomba a vácuo.
- Centrífuga para microplacas.
- Espectrofotômetro (*NanoDrop™ Lite* Thermo Scientific®).
- Freezers -20 °C e -80 °C.
- Microcentrífuga.
- Microdesmembrador (*Bead-beater Biospec*).
- Micropipetas (10 µL, 200 µL e 1.000 µL).

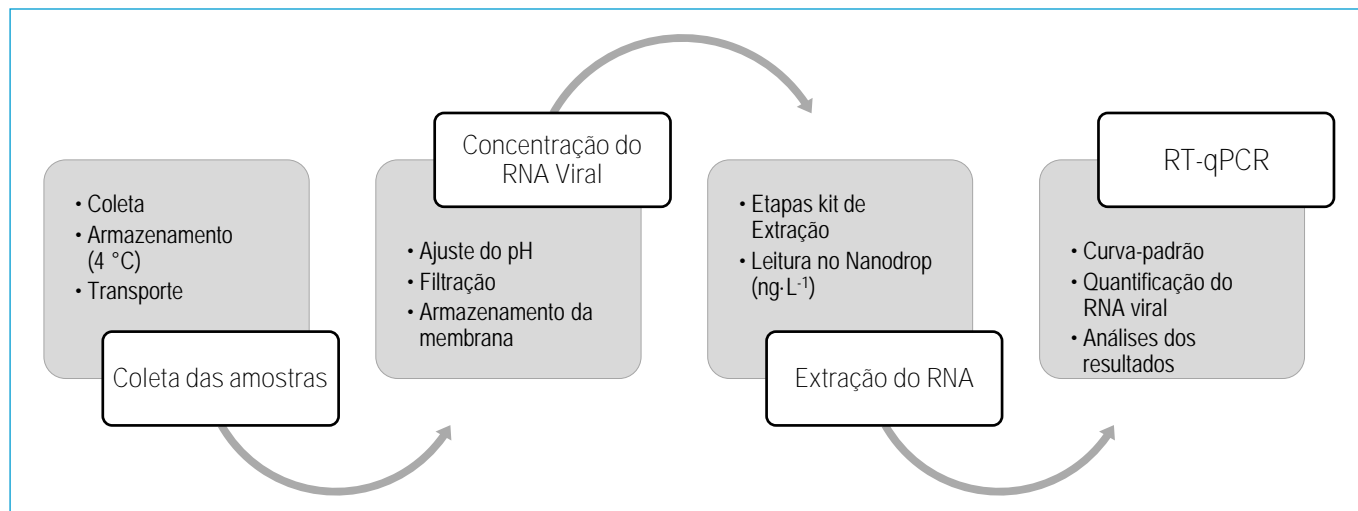


Figura 1 – Fluxograma das etapas para a determinação de SARS-CoV2 em esgoto.

- pHmetro.
- Sistema de filtração.
- Termociclador para qPCR (7500 Real-Time PCR Systems).
- Agitador de tubos tipo Vórtex.

8.2. Outros materiais

- 2-Mercaptoetanol.
- Ácido acético.
- Água para PCR, grau molecular, livre de nucleases.
- Cloreto de magnésio.
- Kits para RT-qPCR (controles, Master mix e *primers*, ver material suplementar).
- Luvas nitrílicas ou de látex sem talco.
- Membrana de éster-celulose, 47 mm diâmetro e poro 0,45 µm (Millipore HAWP04700).
- MicroAmp Optical adhesive Film PCR/Real time PCR compatível com equipamento 7500 *Applied Biosystems*, ref. 4311971, ou com o equipamento de qPCR do laboratório.
- Microplaca de PCR 96 Poços, borda elevada, compatível com equipamento 7500 *Applied Biosystems*, ref. PCR-96-AB-C, ou com o equipamento de qPCR do laboratório.
- Microtubos, estéreis, livres de DNase e RNase (0,2 mL, 1,5 mL e 2,0 mL).
- Pinças estéreis.
- Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNase e RNase.

- Racks para microtubos (tipo Eppendorfs).
- Solução de limpeza RNase Away™ (*Fisher Scientific*; catálogo #21-236-21) ou equivalente.

9. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE ESGOTO

9.1. Coleta e transporte

As coletas devem ser realizadas utilizando-se frascos de polipropileno estéreis de 1.000 mL, contendo identificação, incluindo código da amostra e data da coleta. Sugere-se que a amostragem seja feita de maneira composta. O transporte ao laboratório deve ser feito sob refrigeração, em caixa de isopor com gelo (temperatura de 4 °C).

9.2. Concentração do vírus em amostras de água e esgoto

A escolha do método para concentração e extração do RNA viral considerou artigos científicos prévios, que usaram a mesma metodologia para concentração de vírus entéricos a partir de esgoto, e posterior detecção via análise molecular por qPCR (SYMONDS *et al.*, 2014; AHMED *et al.*, 2015; AHMED *et al.*, 2020). Assim, o protocolo escolhido, de filtração em membrana eletronegativa e extração do RNA viral diretamente da membrana, baseia-se no método de adsorção-eluição modificado, também conhecido como método de adsorção-extração direta (AHMED *et al.*, 2020). As etapas da metodologia são descritas a seguir:

- Medir e transferir um volume de 100 mL para um becker contendo barra magnética, ambos previamente esterilizados por autoclavagem.
- Adicionar à amostra 1 mL de $MgCl_2$ (2,5M), para obter a concentração final de 25 mM. Homogeneizar a amostra com o auxílio de agitador magnético durante 3 minutos e depois medir o pH.
- Acidificar a amostra usando ácido acético (1M) até pH entre 3,0 e 3,5. Para esgoto bruto, o volume de ácido adicionado usualmente varia entre 8 e 20 mL.
- Filtrar a amostra através de membrana eletronegativa de éster de celulose, com poro de $0,45 \mu m$, diâmetro de 47 mm, previamente autoclavada, conectada ao funil de filtração estéril. Filtrar o maior volume possível até a membrana colmatar (filtrar o mínimo de 10 mL para esgoto bruto e 100 mL para água de rios).
- Colocar a membrana (dobrada) dentro do tubo PowerBead, primeiro tubo específico do kit de extração de RNA.
- Adicionar 600 μL da solução PM1 do kit de extração e 6 μL de 2-mercaptoetanol, a fim de minimizar riscos de degradação do RNA. Este passo deve ser realizado dentro de capela de exaustão, pois o 2-mercaptoetanol é tóxico.
- Armazenar a membrana (no tubo com as soluções) a $-80^\circ C$ até posterior extração do RNA.

Na **Figura 2** são ilustradas as etapas e procedimentos para concentração de RNA viral usando o método de filtração em membrana eletronegativa.

10. EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL

A extração do RNA é realizada seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante do kit comercial, nesse caso o AllPrep PowerViral DNA/RNA (Qiagen®, Hilden, Alemanha), com algumas adaptações, conforme descrito a seguir:

- Os tubos com as membranas (tubos com as *beads*, PM1 e 2-mercaptoetanol) armazenadas devem ser deixados à temperatura ambiente antes de começar a extração.
- Para melhor a fragmentação da membrana, sugere-se utilizar o equipamento *BeadBeater16*® (Biospec Products) ao invés do vórtex. Deixar de 5 a 10 minutos (o tempo é variável, deixar até fragmentar a membrana). Nesta etapa, o tubo tende a esquentar, por isso, é necessário dividir o tempo, e entre as etapas deixar no gelo para a preservação do material genético.
- Após essa etapa de fragmentação, centrifugar a 14.000 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos, para ser possível a retirada do sobrenadante sem os fragmentos da membrana.

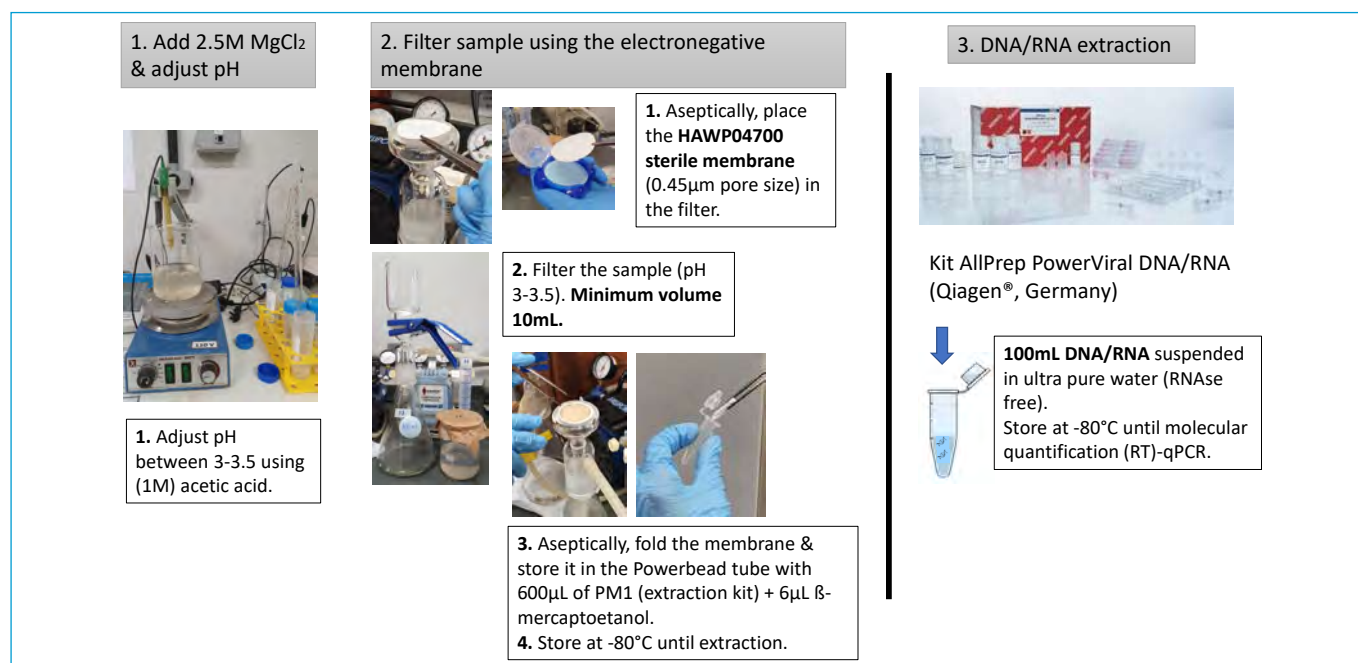


Figura 2 - Processo de concentração de RNA viral pelo método de filtração com membrana eletronegativa.

- Transferir o sobrenadante para um tubo limpo de 2 mL e prosseguir a extração conforme descrito pelo fabricante do kit Qiagen a partir da etapa 8.

Ao final de cada extração, o RNA é eluído em 100 μL de água ultrapura (livre de RNAses). Em seguida, o RNA total da amostra é quantificado usando o NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Califórnia, EUA). Congelar a amostra a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ até a quantificação por RT-qPCR.

11. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO SARS-COV-2 POR RT-QPCR

O protocolo apresentado a seguir foi adaptado para as amostras de esgoto e é baseado no Protocolo do CDC (2019).

11.1. Preparação da reação de RT-qPCR

11.1.1. Diluição dos controles

Os controles utilizados no projeto já vêm ressuspensos em tubo contendo 250 μL (200.000 cópias· μL^{-1}) em TE (10mM Tris e 0,1mM EDTA) pH 8,0. Para utilização, os controles devem ser diluídos para concentrações menores, conforme as instruções do fabricante.

Os Plasmídeos controle podem ser diluídos em tampão TE (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA), pH 8,0.

A diluição sugerida pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Minas Gerais (DESA/UFMG) para o controle positivo 2019-nCoV_N é a de 100x, assim obtém-se alíquota de trabalho com a concentração de 2.000 cópias· μL^{-1} (1º ponto da curva). Para os outros controles (SARS, MERS e HsRPP 30), sugere-se a diluição de 1.000x para alíquotas de trabalho com concentração de 200 cópias· μL^{-1} . Essas diluições podem variar de acordo com cada laboratório, equipamento e mix utilizados.

Algumas observações:

- Os controles são transportados à temperatura ambiente, mas devem ser armazenados de -15 a $-30\text{ }^\circ\text{C}$ em temperatura constante.
- O controle concentrado de 200.000 cópias· μL^{-1} deve ser manuseado com extremo cuidado, longe dos locais de extração e preparação de amostras e, também, dos

equipamentos de qPCR, para minimizar o risco de contaminação.

- Ciclos repetidos de congelamento e descongelamento devem ser evitados. O ideal é dividir em alíquotas menores para uso.

11.1.2. Preparação da curva-padrão

As curvas-padrão são preparadas com o controle positivo 2019-nCoV_N para ambos os alvos (N1 e N2). Consistem em diluições seriadas da alíquota de trabalho do controle positivo diluído. São realizadas somente nas análises quantitativas.

No caso das amostras de esgoto coletadas nas cidades de Belo Horizonte e Contagem, padronizou-se o primeiro ponto da curva-padrão com uma diluição de 100x, conforme sugerido na etapa de diluição dos controles.

Algumas observações:

- O volume mínimo a ser pipetado deve ser 2 μL a fim de evitar erros de pipetagem.
- É desejável que a curva-padrão tenha pelo menos 5 pontos.
- A curva-padrão pode ser diluída em água para uso em Biologia Molecular (livre de DNAses e RNAses) ou em algum tipo de carreador como diluente (p. ex.: Yeast tRNA 100 ng· μL^{-1}).
- A cada pipetagem, os microtubos devem ser homogeneizados brevemente no vórtex.
- Sugere-se que a curva-padrão seja preparada antes da montagem da placa.
- As reações devem ser realizadas em triplicata para cada ponto da curva-padrão e de acordo com o protocolo de amplificação.
- Não é necessário fazer curva-padrão para o controle RNase P (Controle Interno, HsRPP 30).

11.1.3. Procedimentos para a amplificação

Para as reações da qPCR utilizou-se o MasterMix Itaq Universal Probes One Step Kit (Biorad). Esse mix possui uma combinação de iScript RNase H⁺ transcriptase reversa e a DNA polimerase iTaq hot-start para completar as reações em tempo real em única etapa. Os reagentes utilizados na reação e suas respectivas concentrações estão detalhados na **Tabela 1**, sendo as concentrações utilizadas

sugeridas pelo fabricante. Cada laboratório deve estabelecer um protocolo de acordo com o kit escolhido.

O volume final de cada reação foi igual a 20 µL. As reações foram realizadas em triplicata, tanto para as amostras, quanto para os controles negativos e diluições das curvas-padrão (controle positivo).

Para a especificação dos reagentes e kits utilizados na reação de RT-qPCR, bem como para verificar a sequência dos *primers* e sondas usados, consultar a nota técnica 02/2020, disponível em <https://www.gov.br/ana/pt-br/assuntos/acontece-na-ana/monitoramento-covid-esgotos>.

São distribuídos 15 µL da mistura dos reagentes em cada poço da microplaca de 96 poços. Antes de mover a microplaca para a área de manipulação dos ácidos nucleicos, preparar o Controle Negativo (NTC, do inglês *No Template Control*) pipetando 5 µL de água livre de nucleases em cada reação. Em bancada separada, distribuir 5 µL das amostras/controles em cada poço contendo a reação. Cada laboratório deve padronizar a distribuição das amostras e controles na microplaca.

Após montagem da microplaca, vedar com o selante óptico (*MicroAmp Optical adhesive Film PCR*) e centrifugar brevemente a microplaca (30 segundos, 500 x g) para remover as bolhas. Na **Tabela 2** é apresentado o protocolo de ciclagem utilizado pelo Laboratório de Microbiologia DESA/UFMG e sugerido pelos fabricantes dos mix e *primers/probes* utilizados. As temperaturas e os passos podem variar de acordo com o mix utilizado; apenas a temperatura de anelamento dos *primers* (55 °C) deve ser obrigatoriamente mantida. Após programar as etapas de ciclagem, os dados da fluorescência (FAM) devem ser coletados no passo de 55 °C.

Algumas observações:

- Todos os alvos (N1, N2 e RNaseP) utilizados neste protocolo possuem o mesmo programa de amplificação e a mesma temperatura de anelamento, portanto, podem ser colocados na mesma placa. Porém, as reações devem ser preparadas separadamente.
- Cada laboratório deve definir o número de replicatas por amostras a serem testadas conforme seus procedimentos internos.
- Todas as placas devem conter um controle negativo (NTC, sem DNA) para controlar a presença de contaminação do ambiente.

Tabela 1 – Reagentes e volumes usados na reação de RT-qPCR.

Reagentes	Volume (µL) por reação
Água livre de Nucleases	N x 3,0
Primer/Probe Mix	N x 1,5
Reverse Transcriptase	N x 0,5
Master Mix One-Step Kit	N x 10
Amostras/Controles	5,0
Volume Final	20,0

Legenda: N = número de amostras

Tabela 2 – Protocolo de amplificação para detecção do SARS-CoV-2 por RT-qPCR usando as regiões alvo N1 e N2.

Passo	Temperatura	Tempo
Incubação para transcrição reversa (RT)	50 °C	10 min
Ativação da enzima	95 °C	2 min
Amplificação*	95 °C	3s
	55 °C	30 s

Nota: *45 ciclos

11.2. Interpretação dos resultados

11.2.1. *No Template Control (NTC)*

O NTC consiste no uso de água livre de nuclease nas reações de RT-qPCR em vez de RNA. As reações NTC para todos os conjuntos de *primers* e sondas não devem exibir curvas de crescimento de fluorescência que cruzem a linha do *Threshold*¹. Se qualquer uma das reações NTC exibir uma curva de crescimento que ultrapasse o limite do ciclo, pode ter ocorrido contaminação. Nessa situação, a corrida deve ser invalidada e o ensaio repetido, seguindo rigorosamente os cuidados citados no protocolo.

11.2.2. *Controle interno da reação (Hs_RPP30 Positive Control ou RNase P)*

O RNase P consiste em material celular humano cultivado não infeccioso (tratado com beta-propiolactona). É utilizado para demonstrar a recuperação bem-sucedida do RNA, bem como a integridade do reagente de extração. O ácido nucleico purificado deve produzir um resultado positivo com o *primer*/sondas RP e resultados negativos com todos os marcadores 2019-nCoV. Deve ser feito com

¹Nível arbitrário de detecção em que a fluorescência acumulada alcançou intensidade acima do ruído (baseline).

todas as amostras. Caso não amplifique (resultado negativo), recomenda-se investigar a presença de inibidores nas amostras de esgoto, repetir a análise diluindo a amostra (diluição de inibidores) ou repetir a extração do RNA.

11.2.3. Controles opcionais

Em relação aos controles positivo e negativo SARS e MERS, os quais são opcionais, seguem algumas considerações:

- O **MERS-CoV Control** não é alvo para nenhum dos *primers* e sondas contidos nos kits e deve ter resultado NEGATIVO para todas as regiões.
- O **SARS-CoV Control** possui apenas o alvo para os *primers* e sondas contidos para o N3 e deve ser POSITIVO para a região N3 e NEGATIVO para as regiões N1 e N2.
- Apesar dos controles SARS e MERS serem opcionais, são importantes, pois comprovam a especificidade e sensibilidade das reações para os *primers*/sondas escolhidos.

11.2.4. Análise dos resultados qualitativos

Na **Tabela 3** é apresentada a forma de interpretação dos resultados do RT-qPCR, já levando em consideração a atualização do CDC que remove a região N3 da análise.

Algumas observações:

- Resultados Falso Negativos podem ocorrer devido à baixa quantidade de vírus presentes na amostra, por problemas na coleta, no transporte ou no manuseio. O limite de detecção do teste deve ser estabelecido por cada laboratório levando em consideração todas as variáveis envolvidas.
- No projeto ora referenciado, o limite de detecção (determinado com a curva-padrão elaborada a partir da diluição do controle positivo) foi de 2 cópias· μL^{-1} de

reação de RT-qPCR para ambos os alvos (N1 e N2), e o limite de quantificação observado (ou seja, a menor concentração do RNA viral determinada na amostra de esgoto) foi de 0,03 e 0,06 n° de cópias· mL^{-1} para N1 e N2, respectivamente (ver Boletim temático n° 02/2020, disponível em <https://www.gov.br/ana/pt-br/assuntos/acorrete-na-ana/monitoramento-covid-esgotos>).

11.2.5. Análise dos resultados quantitativos

Para o cálculo do número de cópias dos genes por reação, utiliza-se a equação da reta obtida a partir da curva-padrão. Por meio da equação da reta, obtém-se a quantidade em número de cópias de RNA por reação das amostras investigadas.

A exportação da planilha Excel com os resultados apresenta os valores por reação, sendo necessário apenas padronizar o Fator de Conversão para as amostras.

A quantidade de RNA por mL de amostra de esgoto é obtida a partir do Fator de Conversão do resultado do número de cópias por reação e o volume de amostra que foi filtrado.

A seguir é apresentado um exemplo referente à determinação do número de cópias por mL de amostra filtrada de esgoto (resultado final).

Etapas:

- Resultado da reação qPCR (5 μL da amostra) $\rightarrow 9,5 \times 10^1$ cópias.
- Eluição: 100 μL (volume no qual o RNA foi ressuspendido) $\rightarrow 20 \times 9,5 \times 10^1$ cópias.
- Volume filtrado: 50 mL $\rightarrow (20 \times 9,5 \times 10^1 \text{ cópias}) / 50$.

Fator de Conversão = 0,4.

Resultado final em n° de cópias· mL^{-1} de amostra filtrada $\rightarrow 3,8 \times 10^1$ cópias· mL^{-1} *.

* Para obter os resultados em n° de cópias· mL^{-1} de amostra de esgoto, basta calcular o Fator de Conversão e multiplicá-lo pelo valor obtido no equipamento por reação.

Tabela 3 – Interpretação dos resultados de amplificação.

Regiões alvo		RP ⁽¹⁾	NTC ⁽²⁾ (branco)	Resultado	Interpretação do resultado
2019 nCOV_N1	2019 nCOV_N2				
+	+	+	-	Ct ⁽³⁾ < 40 SARS-CoV2 Detectado	Positivo
-	-	+	-	Ct > 40	Negativo
+	-	+	-	SARS-Cov2 Detectado	Positivo para o alvo N1
-	+	+	-	SARS-Cov2 Detectado	Positivo para o alvo N2
-	-	-	-	Inválido, pois não amplificou com o RP*	Inválido

Notas: ⁽¹⁾RP: RNase P - Controle interno da reação, material celular humano cultivado não infeccioso. Quando isso acontece pode-se refazer a reação de amplificação usando uma alíquota de RNA viral diluída 10x (assim dilui-se eventuais substâncias inibidoras da reação). ⁽²⁾NTC: corresponde ao branco da reação de RT-qPCR, pois utiliza-se água livre de nucleases. ⁽³⁾Ct - Ciclo *Threshold*.

11.3. Controle de qualidade dos resultados

A fim de garantir resultados de alta qualidade e confiabilidade, é importante observar os seguintes aspectos principais, relacionados aos procedimentos gerais de análises para os experimentos quantitativos e qualitativos:

- Deve-se realizar a análise cuidadosa de cada corrida, conforme os princípios teóricos da técnica de qPCR. O *Threshold* deve ser posicionado no ponto correspondente à máxima eficiência dentro da fase exponencial e deve ser configurado/estabelecido para cada *primer/sonda* (N1, N2 e RP), portanto, a função *Auto Threshold* deve ser desabilitada.
- Para os experimentos com curva-padrão absoluta, é possível verificar os parâmetros: *Slope*, *Y-intercept*, R^2 e eficiência. É desejado um valor de $slope = -3.3 \pm 10\%$ (100%); um *Y-intercept* entre 33 e 37; e um $R^2 \geq 0,99$. Cabe ressaltar que o correto posicionamento do *Threshold* na fase exponencial e a correta análise do *baseline* serão fundamentais para a obtenção dos valores

acima destacados. É aceitável uma eficiência de 90% a 110%.

- Para a análise das réplicas (triplicatas técnicas), o ideal é que o desvio-padrão do Ct seja de no máximo 0,5. Caso seja maior, repetir o RT-qPCR da amostra. Observar se não existem inibidores na amostra ou algum problema ocorrido na extração. No caso de inibidores, sugere-se diluir a amostra.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio recebido do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Estações Sustentáveis de Tratamento de Esgoto – INCT ETEs Sustentáveis.

Este trabalho faz parte da série de publicações do INCT ETEs Sustentáveis

REFERÊNCIAS

AHMED, W.; BERTSCH, P.M.; BIVINS, A.; BIBBY, K.; FARKAS, K.; GATHERCOLE, A.; HARAMOTO, E.; GYAWALI, P.; KORAJKIC, A.; MCMINN, B. R.; MUELLER, J. F.; SIMPSON, S. L.; SMITH, W. J. M.; SYMONDS, E. M.; THOMAS, K. V.; VERHAGEN, R.; KITAJIMA, M. Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. *Science of the Total Environment*, v. 739, p. 1-8, 2020.

AHMED, W.; HARWOOD, V. J.; GYAWALI, P.; SIDHU, J. P. S.; TOZE, S. Comparison of concentration methods for quantitative detection of sewage-associated viral markers in environmental waters. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 81, n. 6, p. 2042-2049, 2015.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. *2019-Novel coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR panel primers and probes*. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>. Acesso em: 12 de Maio de 2020.

SYMONDS, E. M.; VERBYLA, M. E.; LUKASIK, J. O.; KAFLE, R. C.; BREITBART, M.; MIHELICIC, J. R. A case study of enteric virus removal and insights into the associated risk of water reuse for two wastewater treatment pond systems in Bolivia. *Water Research*, v. 65, p. 257-270, 2014.



Roteiros para análises e determinações em amostras de esgoto

Roteiro 6 – Quantificação de adenovírus por PCR em tempo real (qPCR)

Protocols for analysis and determinations in sewage samples
Protocol 6 – Quantification of human adenovirus by qPCR

**Bruna Coelho Lopes¹, Maria Fernanda Espinosa²,
Matthew Eric Verbyla³, César Rossas Mota Filho^{4*}**

1. DEFINIÇÃO DE TERMOS

HAdV Human adenoviruses

PCR Reação em cadeia da polimerase

qPCR Reação em cadeia da polimerase em tempo real

2. OBJETIVO

O objetivo deste roteiro é disponibilizar uma metodologia de processamento de amostras de esgoto bruto e tratado para a quantificação de adenovírus.

3. CONCEITOS BÁSICOS

Os adenovírus (HAdV, do inglês *human adenoviruses*) são membros da família *Adenoviridae*, com tamanho mediano (90-100 µm), não envelopados com nucleocapsídeo icosaédrico contendo dupla fita de ácido desoxirribonucleico (DNA) com tamanho aproximado de 35 kb. Por ser um vírus não envelopado e com fita de DNA, a persistência do HAdV no meio ambiente é maior quando comparado à de outros vírus. Atualmente, encontram-se identificados 52 diferentes sorotipos, pertencentes a

sete espécies (classificadas de A até G) que infectam seres humanos, sendo os sorotipos 40 e 41 a segunda maior causa de gastroenterite viral aguda em crianças no mundo (JOTHIKUMAR *et al.*, 2005; ALLARD e VANTARAKIS, 2019). Um terço das infecções causadas pelo HAdV podem ser gastrointestinais, respiratórias, oculares e meningoencefalites, e os outros dois terços das infecções são assintomáticas (ALLARD e VANTARAKIS, 2019). Como os HAdV são excretados em elevadas concentrações por indivíduos infectados, na ordem de 10¹¹ virions (forma infecciosa do vírus) por grama de fezes, são frequentemente detectados em diferentes matrizes ambientais, tais como: águas contaminadas (esgoto), águas de rio, de abastecimento, oceanos e recreativas. Entretanto, os vírus são diluídos nestas matrizes e, por esse motivo, precisam ser concentrados para permitir a sua quantificação. Existem várias técnicas de concentração de vírus em matrizes ambientais, como a adsorção em membrana eletronegativa, precipitação por polietilenoglicol (PEG), ultrafiltração e ultracentrifugação (AHMED *et al.*, 2020), entre outras. A adsorção

¹Médica Veterinária pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Mestre e Doutora em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela UFMG. Residente pós-doutoral no Programa de Pós-Graduação em Saneamento Meio Ambiente e Recursos Hídricos da UFMG.

²Engenheira Civil pela Universidad de Cuenca, Equador. Mestre e Doutora em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela UFMG.

³Engenheiro Civil pela Lafayette School, EUA. Mestre e Doutor pela South Florida University, EUA. Professor assistente do Departamento de Engenharia Civil, Construção e Ambiental da San Diego State University, EUA.

⁴Engenheiro Civil pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Mestre em Engenharia Civil e Ambiental pela University of Nevada, EUA. Doutor em Engenharia Civil e Ambiental pela North Carolina State University, EUA. Professor associado do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG. Subcoordenador do INCT ETES Sustentáveis.

*Endereço para correspondência: Avenida Antônio Carlos 6.627 - Universidade Federal de Minas Gerais - Escola de Engenharia - Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - Bloco 1. Belo Horizonte, MG. CEP: 31270-901. e-mail: cesar@desa.ufmg.br

em membranas eletronegativas é uma técnica simples, eficiente, mais barata em comparação com as outras e será descrita a seguir. A quantificação dos vírus pode ser realizada por duas técnicas principais: cultivo celular e quantificação do material genético via reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*). Apesar da técnica de cultivo celular permitir a quantificação de vírus viáveis, ou seja, capazes de causar infecção, ela é mais desafiadora por requerer estrutura laboratorial específica, de elevado nível de biossegurança. Já a técnica de quantificação por PCR em tempo real (qPCR, do inglês *quantitative real-time polymerase chain reaction*) quantifica o material genético do vírus, viável ou não, e possui maior sensibilidade de detecção.

4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

O presente protocolo descreve um método para quantificação de HAdV em amostras de esgoto por meio da concentração viral em membranas eletronegativas e quantificação por qPCR.

4.1. Concentração viral

A metodologia para a concentração de vírus entéricos em amostras ambientais por método de filtração em membrana eletronegativa foi descrita por Katayama *et al.* (2002) com adaptações. Os vírus são considerados biocoloides e possuem cargas em sua superfície que podem interagir com a matéria orgânica presente no esgoto formando agregados (GERBA e BETANCOURT, 2017) A formação dos agregados é essencial para a retenção dos vírus entéricos na membrana eletronegativa e depende do pH da amostra (WATTS *et al.*, 2020). O tipo de vírus e sua composição estrutural influenciam nas interações eletrostáticas, resultando em diferentes pontos isoelétricos (IEP), que variam entre 1,9 a 8,4 (MICHEN e GRAULE, 2010). Para aumentar a formação de agregados nas amostras ambientais e, consequentemente, reter a maior quantidade de vírus entéricos na membrana, durante o processo de filtração é adicionado um cátion divalente (Mg^{2+}), e em alguns protocolos o pH da amostra é reduzido a 3,0-3,5 para promover a concentração dos vírus na membrana eletronegativa (KATAYAMA *et al.*, 2002).

É importante salientar que dependendo da disponibilidade estrutural dos laboratórios, outros métodos de concentração viral podem ser empregados.

4.2. Detecção por método de PCR em tempo real

O princípio do método de quantificação por PCR em tempo real baseia-se na replicação *in vitro* de fitas de ácido desoxirribonucleico (DNA) de forma exponencial. Basicamente, isso significa que quantidades mínimas de material genético presente na amostra podem ser amplificadas milhões de vezes, permitindo uma detecção e quantificação rápida de marcadores genéticos. Essa reação baseia-se no princípio natural de replicação do DNA, sendo um processo que ocorre em três etapas, as quais se repetem em determinado número de vezes (ciclos): (i) desnaturação; (ii) anelamento; e (iii) extensão.

Para que ocorra a reação de PCR de forma adequada, são necessários os seguintes componentes a fim de reproduzir as condições naturais de uma célula e conduzir à replicação do material genético: enzima DNA polimerase termoestável; tampão da enzima (Mg^{2+}); pares de iniciadores (senso e antisenso) ou oligonucleotídeos (*primers*); desoxirribonucleotídeos (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP, dGTP); e o DNA da amostra a ser quantificado. De forma simplificada, os componentes da reação são misturados e a amostra é colocada em um termociclador, aparelho que possibilita o aquecimento e resfriamento rápido da amostra. A oscilação da temperatura é importante para abertura e anelamento da fita dupla de DNA. A etapa inicial de desnaturação do DNA alvo ocorre por meio da elevação da temperatura a 95 °C. Na fase seguinte, ela é diminuída à temperatura de anelamento para permitir que os iniciadores se liguem à fita simples de DNA e, com o auxílio da DNA polimerase, terá início o processo de replicação do DNA alvo. A cada formação de uma nova dupla fita, o fluoróforo presente na reação emitirá um sinal fluorescente contínuo, o que possibilita a conversão do sinal fluorescente em valor numérico para cada amostra.

Para garantir a qualidade dos resultados, sugere-se o uso de controle positivo e avaliação da inibição pela matriz. Como o método deste protocolo é a quantificação por técnicas moleculares, sugere-se o uso de um controle

postivo composto por plasmídeos ou blocos gênicos que não interfiram na análise de quantificação do HAdV e que não estejam presentes no esgoto. Assim, o laboratório poderá determinar o quanto de material está sendo perdido desde o começo do procedimento até o qPCR, evitando, assim, resultados falso-negativos e permitindo a avaliação de eventuais discrepâncias entre amostras e triplicatas.

5. INTERFERENTES/CUIDADOS

Os procedimentos de concentração viral, extração de material genético e quantificação do gene alvo devem atender algumas condições importantes para obtenção de resultados confiáveis. A seguir, são listados alguns desses cuidados:

- Os aparatos de filtração devem ser previamente limpos para remoção de resquícios de material genético do HAdV, que porventura possam ter permanecido após o uso anterior e, assim, evitar a contaminação cruzada entre as amostras.
 - É desejável que a coleta seja realizada de forma composta. As amostras devem ser devidamente homogeneizadas antes do procedimento de concentração viral.
 - Durante medição de pH de uma série de amostras, após cada uma delas, deve-se imergir a sonda do pHmetro em solução de hipoclorito (1:10) durante 5 minutos e enxaguar com água deionizada para evitar contaminação cruzada.
 - O volume de amostra que passar pela membrana eletronegativa deve ser obrigatoriamente medido e registrado para o cálculo posterior da concentração viral.
 - O material genético (DNA) extraído deve ser armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (como máximo) ou a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ótimo).
 - Recomenda-se fortemente que sejam usados ambientes separados para manipulação do material genético e manipulação dos reagentes da qPCR para diminuir a possibilidade de contaminação cruzada.
 - Os reagentes de qPCR devem ser armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, quando em uso, devem ser mantidos em *racks* refrigeradas.
 - Não usar luvas com talco para manipular materiais e reagentes de qPCR.
 - Todo o material utilizado (aparato de filtração, pinças, ponteiros, tubos, placas etc.) deve estar estéril e livre do DNase e RNase.
- Cuidados com o ambiente de trabalho são necessários para evitar contaminação cruzada e resultados não fidedignos devido à elevada persistência do HAdV em superfícies.

6. APLICAÇÃO DO MÉTODO

O método se aplica à determinação e quantificação de genes alvo de HAdV, em esgoto bruto e tratado, retidos em uma membrana tipo HA (HAWP04700, Millipore®, Merck, Darmstadt, Alemanha) de 47 mm de diâmetro, 0,45 μm de porosidade, que é composta por mix de ésteres de celulose. Posteriormente, o material genômico retido na membrana deve ser extraído por meio de kits de extração específicos para amostras ambientais com protocolos definidos pelos fabricantes. Sugere-se o kit de extração para isolamento de DNA de qualquer amostra ambiental da empresa da MPBiomedicals (FastDNA™ SPIN kit for Soil) ou equivalente. O ideal seria um kit otimizado pela extração de DNA dos vírus (p. ex.: AllPrep DNA/RNA Mini Kit).

7. MATERIAIS

7.1. Aparelhagem

- Capela de fluxo laminar.
- Autoclave.
- Bomba a vácuo.
- Agitador magnético.
- pHmetro.
- Centrífuga de placas de 96 poços.
- Centrífuga para microtubos (até 2 mL).
- Beadbeater*.
- Agitador de tubos (vortex).
- Freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Ultrafreezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Nanodrop®.
- Termociclador real time.
- Fonte e cuba para eletroforese.

7.2. Padrões e materiais certificados

- Água ultrapura para biologia molecular.
- Kit de extração de DNA viral (p. ex.: AllPrep DNA/RNA Mini Kit, Qiagen).

- Iniciadores (*forward* e *reverse*) e sonda (**Tabela 1**).
- Kit de clonagem para construção da curva padrão (p. ex.: pGEM®-T Easy Vector Systems, Promega).
- Kit para reação de qPCR (TaqMan™ Fast Environmental Master Mix Beads, Thermofisher).
- Controle positivo: DNA de esperma de salmão (10 mg·mL⁻¹, Invitrogen).

7.3. Outros materiais

- Membranas tipo HAWP04700 (Millipore®), mix de éster celulose, hidrofílica, branca, 47 mm diâmetro, 0,45 µm tamanho de poros.
- Béquer de 150 mL.
- Barras magnéticas (peixinho) para agitador magnético.
- Frasco tipo Schott 500 mL autoclavável.
- Proveta de plástico 100 mL autoclavável.
- Sistema de filtração completo, copo (250 mL), adaptador com membrana, funil e pinça, autoclaváveis.
- Isqueiro.
- Pinças.
- Papel grau cirúrgico para esterilização.
- Fita de autoclave.
- Ponteiros sem filtro 1.000 µ L estéreis.
- Ponteiros com filtro 10, 100 e 1.000 µL estéreis.
- Pipetas de alta precisão de 2, 10, 100 e 100 µL.
- Tubos tipo Eppendorf graduados, com volume de 200, 500 e 2.000 µL, livres de DNase e RNase, DNA e inibidores de PCR.
- Mix para qPCR.
- Placas com 96 poços para reação de qPCR.
- Filme adesivo para qPCR.
- Luvas nitrílicas sem talco.

- Frascos tipo Schott de 500 mL e 250 mL.
- Luvas.
- Jaleco.
- Caixa de isopor para transporte das amostras.
- Gelo em gel.

8. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE ESGOTO

8.1. Preparação do material

- As vidrarias (béqueres, aparatos de filtração, provetas) devem ser imergidos em solução de água sanitária comercial na proporção 1:1 com água da torneira, durante 15 minutos. Enxaguar com água destilada.
- Imergir novamente as vidrarias em uma solução HCl 0,1N durante, no mínimo, 15 minutos. Enxaguar com água destilada.
- Deixar secar em temperatura ambiente e embalar o material em papel cirúrgico antes do procedimento de esterilização.
- Esterilizar as vidrarias a 121 °C por 15 minutos.

8.2. Coleta e transporte

As coletas devem ser realizadas preferencialmente de forma composta, por um período mínimo de 4 horas, em uma bombona com volume final de 20 L. Durante a coleta, a bombona deve estar resfriada entre 4 a 10 °C. Ao final da amostragem, homogeneizar o conteúdo da bombona e fracionar 500 mL em um frasco tipo Schott previamente lavado e autoclavado. Transportar sob refrigeração e realizar o processo de concentração da amostra em 24 horas.

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados para elaboração da curva padrão e iniciadores para identificação do HAdV e do controle positivo.

Iniciadores	Sequência (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)
HAdV - F	GGACGCCTCGGAGTACCTGAG	96
HAdV- R	ACIGTGGGGTTTCTGAACTTGTT	
Probe (Sonda)	[FAM]CTGGTGCAAGTTCGCCCGTGCCA[MGBNFQ]	
Sketa22-F	GGTTTCCGCAGCTGGG	77
Sketa22-R	CCGAGCCGTCCTGGTC	
Probe (Sonda)	[FAM]AGTCGCAGGCGGCCACCGT[TAMRA]	

Fonte: Verbyla et al. (2016)

8.3. Concentração da amostra

1. Com auxílio de uma proveta estéril, medir 100 mL de amostra e transferir para um béquer de 150 mL com barra magnética previamente autoclavados.
2. Colocar em agitação leve para não dispersar gotículas no meio ambiente.
3. Deixar a sonda do pHmetro durante 5 minutos em uma solução de hipoclorito de sódio comercial e água destilada esterilizada na proporção de 1:10. Enxaguar bem.
4. Adicionar 1 mL da solução de $MgCl_2$ 2,5 M para alcançar uma concentração final de 25 mM.
5. Reduzir o pH para valores entre 3,0 e 3,5 com solução de HCl 0,1 M (adicionar aos poucos).
6. Montar o aparato de filtração, previamente autoclavado, e colocar a membrana eletronegativa tipo HA com auxílio de uma pinça flambada.
7. Verter a amostra aos poucos no aparato de filtração. Garantir um volume mínimo entre 50 e 100 mL. Anotar o volume filtrado.
8. Com cuidado, remover a membrana com auxílio de uma pinça flambada, dobrar e colocar a membrana em um tubo tipo Eppendorf de 1,5 ou 2,0 mL. Armazenar a 4 °C, se a extração for realizada em até 24 horas, ou a -20 °C, para intervalos de tempo superiores (alguns meses).

8.4. Extração do material genético viral

Em um ambiente próprio para manipulação de material genético, deve-se limpar a bancada com solução comercial de hipoclorito e álcool 70% (usar luvas nitrílicas sem talco – ver item 5). Para extração do material genético retido na membrana, recomenda-se o uso de kits de extração comerciais, específicos para amostras ambientais e que contenham micro pérolas de vidro para auxiliar na extração da membrana e, também, removedores de componentes que possam inibir a reação de qPCR. Há diversos kits comercialmente disponíveis que oferecem resultados adequados para amostras ambientais. Antes de proceder a extração do material genético, deve-se adicionar o controle positivo para avaliar o processo de recuperação viral (140 ng de espermatozoides de salmão). O volume final da eluição

na última etapa de extração do material genético deve ser de 50 μ L para aumentar a concentração de DNA presente na amostra e, dessa forma, aumentar a probabilidade de detecção se a mesma estiver próxima desse limite. Após a extração, deve-se correr o gel em cuba de eletroforese conforme preconizado pelo fabricante do kit.

9. QUANTIFICAÇÃO DO HADV POR PCR EM TEMPO REAL

9.1. PCR em tempo real

A quantificação do gene alvo do adenovírus é realizada por meio da técnica de qPCR em tempo real. O presente protocolo utilizou o equipamento 7500 Real Time PCR System da empresa Applied Biosystems™ para quantificação do adenovírus. Salienta-se que as condições de amplificação dos genes podem apresentar diferenças entre equipamentos e entre mix e, por esse motivo, é recomendado que cada laboratório padronize as condições do equipamento e quantidade de reagentes. As reações devem ser realizadas em triplicata, tanto para as amostras, quanto para os controles negativos e diluições das curvas-padrão. Já o volume de reação pode ser ajustado de acordo com o kit utilizado.

9.2. Montagem das curvas-padrão

A construção da curva-padrão pode ser realizada a partir de plasmídeos recombinantes contendo os genes alvo do microrganismo específico. O plasmídeo utilizado para identificação do adenovírus nesse protocolo foi descrito por Verbyla *et al.* (2016). Caso seja necessário realizar clonagem para obtenção do plasmídeo recombinante, deve-se seguir o protocolo do fabricante.

De maneira geral, o ideal é que a curva-padrão possua entre 6 e 7 pontos, com valores entre 100 e 10^7 cópias por reação. A curva-padrão deve ser realizada em triplicata a cada corrida e, ao final da reação, os valores em conjunto produzem uma única curva de regressão linear. Para o resultado ser considerado satisfatório, a regressão linear obtida ao final do processo de amplificação do gene alvo deve possuir valores de $R^2 > 0,97$ e eficiência de reação entre 90 e 110%.

9.3. Preparo das reações para a realização da PCR em tempo real

1. Limpar a capela com álcool 70% e ligar o fluxo e a luz ultravioleta com antecedência de 15 minutos.
2. Descongelar os reagentes da reação no gelo, misturar em vortex e dar um *spin* antes de pipetar.
3. Montar a reação de acordo com o número de amostras em tubo de 1,5 mL (**Tabela 2**) para o volume de reação final de 20 μL . Para cada amostra, deve-se fazer 4 reações no total: 3 triplicatas da própria amostra e 1 reação para avaliar o efeito da inibição da matriz na reação de qPCR utilizando a amostra com diluição 2:20.
4. Dentro da capela, colocar a placa sobre uma rack termooestável, distribuir 15 μL dos reagentes em cada poço da placa de qPCR destinado aos pontos da curva-padrão, branco e amostras. Lembrar de proteger a placa da luz ambiente enquanto não se pipeta as amostras.
5. Fora da capela, pipetar os pontos da curva-padrão, de forma que cubra a quantidade de pontos da curva-padrão escolhida. Durante a diluição do plasmídeo, sempre realizar uma leve agitação do tubo no vórtex para garantir a homogeneização do conteúdo. Pipetar os pontos das curvas com cuidado.
6. Pipetar 5 μL em cada poço da placa de qPCR de amostras, controle de inibição e do branco em triplicata.
7. Selar a placa de PCR com selante óptico, centrifugar brevemente a microplaca (*spin*) para remover as bolhas que ficarem no fundo, e colocar a placa no termociclador
8. As condições de amplificação utilizadas no programa consistem em temperaturas de ciclagem: 95 °C por 10 minutos, seguindo por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos; 55°C por 20 segundos, 60°C por 1 minuto. Ressalta-se que esses valores para amplificação podem variar de acordo com o termociclador e o kit utilizado.

Tabela 2 – Concentração e volume dos reagentes utilizados na reação de qPCR (reação de 20 μL).

Reagentes	Concentração final dos reagentes	Volume para cada reação
TaqMan Master Mix 2X	1X	12,5 μL
Iniciador HAdV-F	250 nM	1,0 μL
Iniciador HAdV-R	250 nM	1,0 μL
Sonda	150 nM	0,5 μL
Amostra	-	5,0 μL
Volume final	-	20 μL

Sugere-se seguir sempre as recomendações do fabricante. É importante ressaltar que, dependendo do mix utilizado, essas temperaturas podem sofrer variação.

9. O resultado do equipamento é fornecido em número de cópias do gene alvo por μL . Para conversão do resultado para n° de cópias- mL^{-1} , o resultado em cópias- μL^{-1} fornecido pelo equipamento deve ser multiplicado pelo valor do volume final eluído pelo kit de extração (50 μL ou 100 μL) e dividido pelo volume filtrado na membrana. Esse valor deve ser ajustado pela recuperação identificada no controle positivo. As concentrações de adenovírus reportadas em esgoto bruto são da ordem de 10^5 a 10^6 cópias- L^{-1} (FONG *et al.*, 2010; PRADO *et al.*, 2011; ESPINOSA, 2021).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio recebido do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Estações Sustentáveis de Tratamento de Esgoto – INCT ETE Sustentáveis.

Este trabalho faz parte da série de publicações do INCT ETEs Sustentáveis

REFERÊNCIAS

AHMED, W.; BERTSCH, P. M.; BIVINS, A.; BIBBY, K.; FARKAS, K.; GATHERCOLE, A.; HARAMOTO, E.; GYAWALI, P.; KORAJKIC, A.; MCMINN, B. R.; MUELLER, J. F.; SIMPSON, S. L.; SMITH, W. J. M.; SYMONDS, E. M.; THOMAS, K. V.; VERHAGEN, R.; KITAJIMA,

M. Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. *Science of The Total Environment*, v. 739, p. 139960, out. 2020.

- ALLARD, A.; VANTARAKIS, A. Adenoviruses. In: MESCHKE, J. S.; GIRONES, R. (Org.). *Global Water Pathogen Project*. [S.l.]: Michigan State University, 2019. Disponível em: <<https://www.waterpathogens.org/book/adenoviruses>>.
- ESPINOSA, M. F. Occurrence and removal of novel coronavirus, human enteric viruses and viral and fecal indicators in different wastewater treatment technologies. 2021. xx f. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos). Escola de Engenharias, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2021.
- FONG, T. T.; PHANIKUMAR, M.; XAGORARAKI, I.; ROSE, J. B. Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 3, p. 715-723, 2010.
- GERBA, C. P.; BETANCOURT, W. Q. Viral Aggregation: Impact on Virus Behavior in the Environment. *Environmental Science & Technology*, v. 51, n. 13, p. 7318-7325, 2017.
- JOTHIKUMAR, N.; CROMEANS, T. L.; HILL, V. R.; LU, X.; SOBSEY, M. D.; ERDMAN, D. D. Quantitative real-time PCR assays for detection of human adenoviruses and identification of serotypes 40 and 41. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 6, p. 3131-3136, 2005.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 3, p. 1033-1039, 2002.
- PRADO, T.; SILVA, D. M.; GUILAYN, W. C.; ROSE, T. L.; GASPAR, A. M. C.; MIAGOSTOVICH, M. P. Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. *Water Research*, v. 45, n. 3, p. 1287-1297, 2011.
- MICHEN, B.; GRAULE, T. Isoelectric points of viruses. *Journal of Applied Microbiology*, v. 109, p. 388-397, 2010.
- VERBYLA, M. E.; IRIARTE, M. M.; GUZMÁN, A. M.; CORONADO, O.; ALMANZA, M.; MIHELICIC, J. R. Pathogens and fecal indicators in waste stabilization pond systems with direct reuse for irrigation: Fate and transport in water, soil and crops. *Science of The Total Environment*, v. 551-552, p. 429-437, 2016.
- WATTS, S.; JULIAN, T. R.; MANIURA-WEBER, K.; GRAULE, T.; SALENTING, STEFAN. Colloidal Transformations in MS2 Virus Particles: Driven by pH, Influenced by Natural Organic Matter. *ACS Nano*, v. 14, n. 2, p. 1879-1887, 2020.



Roteiros para análises e determinações em amostras de esgoto

Roteiro 7 – Determinação de ovos de helmintos

*Protocols for analysis and determinations in sewage samples
Protocol 7 – Determination of helminth eggs*

Shyrlane Veras¹, Lourdinha Florencio^{2*}, Adriana M. Zerbini³

1. DEFINIÇÃO DE TERMOS

ETE Estação de tratamento de esgoto
Helmintos Conhecidos popularmente como vermes, são metazoários de vida livre ou parasitária. Se dividem em dois filos que abrangem organismos com estrutura achatada (Platelmintos) e cilíndrica (Nematelmintos).

2. OBJETIVO

O objetivo deste roteiro é reunir e disponibilizar informações práticas para a identificação e quantificação de ovos de helmintos em amostras de esgoto bruto e tratado.

3. CONCEITOS BÁSICOS

Os helmintos são parasitas e não se reproduzem fora do hospedeiro (ser humano ou animais). Algumas espécies de helmintos desenvolvem fases do seu ciclo biológico obrigatoriamente no ambiente, como é o caso da *Ascaris lumbricoides*, que ocorre no solo, e da *Schistosoma mansoni*, que ocorre na água. Como a excreção de ovos e larvas acontece pelas fezes dos hospedeiros, esses organismos são encontrados em grandes quantidades no esgoto.

Sabendo do seu efeito prejudicial à saúde, há necessidade em removê-los durante o processo de tratamento, juntamente com outros patógenos (p. ex.: bactérias e vírus entéricos). Geralmente, os ovos e larvas de helmintos são removidos por meio de processos de filtração ou sedimentação. Isso ocorre devido ao seu tamanho e densidade. Os ovos de helmintos são resistentes à ação da maioria dos desinfetantes aplicados no tratamento de água e esgoto. Com relação à transmissão, apenas um ovo ou larva é necessário para parasitar o hospedeiro. Isso pode acontecer pela ingestão (p. ex.: *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*) ou pela penetração de larvas na pele ou mucosa (p. ex.: *Ancylostoma duodenale*) (GONÇALVES *et al.*, 2003).

4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

O presente roteiro foi elaborado com base nas seguintes referências: (i) metodologia apresentada por Ayres e Mara (1996) para determinação de ovos de helmintos em esgoto; e (ii) metodologias para quantificação, identificação e análise de viabilidade de ovos de helmintos

¹Engenheira Química pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Mestre em Engenharia Química pela UFPE. Doutora em Engenharia Civil e Microbiologia pela UFPE e Universidad Autónoma de Madrid (UAM). Residente pós-doutoral no Programa de Pós-Graduação PRH 481 da UFPE. Membro do INCT ETES Sustentáveis.

²Engenheira Civil pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Mestre em Hidráulica e Saneamento pela Universidade de São Paulo (EESC-USP). Doutora em Ciências Agrícolas e Ambiental pela Universidade de Wageningen, Holanda. Professora Titular do Departamento de Engenharia Civil da UFPE. Membro do INCT ETES Sustentáveis.

³Bióloga pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-MG). Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

*Endereço para correspondência: Avenida Acadêmico Hélio Ramos, s/n - Universidade Federal de Pernambuco - Laboratório de Saneamento Ambiental - Departamento de Engenharia Civil e Ambiental - Cidade Universitária, Recife, PE. CEP: 50740-530. E-mail: flor@ufpe.br

em esgoto bruto e tratado apresentado por Zerbini e Chernicharo (2001).

A metodologia é simples, exige poucos equipamentos, e pode ser facilmente executada por técnicos de laboratório que possuam alguma experiência em análises microscópicas. Esse procedimento é uma modificação do método de Bailenger, voltado para a análise de esgoto bruto e tratado, visando seu uso na agricultura. Basicamente, o método descreve três etapas sequenciais: (i) sedimentação; (ii) centrifugações sucessivas com descarte de sobrenadante e uso de solução tampão e éter (ou acetato de etila) para separação de componentes gordurosos; e (iii) flutuação com solução de sulfato de zinco. A contagem é feita usando uma câmara de McMaster, com uso de microscópio óptico em objetivas de 10x e 40x.

Segundo Ayres e Mara (1996), acredita-se que o equilíbrio hidrofílico-lipofílico do próprio organismo e sua densidade relativa em relação ao reagente de separação são fatores que determinam se a concentração de algumas espécies de parasitas é bem-sucedida ou não. Em termos práticos, isso significa que o pH e a presença de alguns componentes, como metais pesados ou álcoois, podem alterar a superfície do parasito. Nesse caso, cada um responderá de uma forma diferente e nenhum método concentrará todas as espécies com a mesma eficiência.

5. INTERFERENTES/CUIDADOS

Dentre os interferentes e cuidados necessários, podem ser citados:

- Volume de amostras por análise: 1 L para esgoto bruto e 10 L para esgoto parcial ou totalmente tratado. Como estes últimos apresentam menor número de ovos, é necessário usar volumes maiores para garantir a recuperação eficiente.
- Éter é altamente inflamável e tóxico. No entanto, ele pode ser substituído por acetato de etila sem afetar a eficiência do método.
- A eficiência do método é influenciada pela presença de componentes que alterem a superfície do parasito (p. ex.: álcoois, metais pesados etc.).

- A limpeza inadequada de materiais, equipamentos e bancada pode interferir nos resultados, levando a possíveis erros. Dessa forma, é recomendável seguir as instruções de limpeza do laboratório e do fabricante dos equipamentos.

6. APLICAÇÃO DO MÉTODO

Existem vários métodos para este tipo de análise, porém cada um apresenta suas vantagens e desvantagens. Sabe-se que não há um método que recupere todos os ovos de helmintos. Entretanto, o método de Bailenger, modificado por Ayres e Mara (1996), recupera uma ampla faixa de ovos de helmintos, particularmente ovos de nematoides intestinais (*Ascaris* sp., *Trichuris* sp. e ancilostomídeos), apresenta baixo custo de reagentes e é de simples execução.

A metodologia é aplicável em amostras de esgoto bruto e tratado (parcial ou totalmente), sendo uma importante ferramenta para o controle de qualidade do efluente em estações de tratamento de esgoto (ETEs), quando práticas de uso agrícola são consideradas.

7. COLETA, TRANSPORTE, PRESERVAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS

Com base no método modificado de Bailenger, proposto por Ayres e Mara (1996), as informações básicas sobre a coleta, transporte e preservação de amostras são descritas a seguir:

- Para a coleta das amostras, são utilizados frascos ou bombonas de plástico de 1 L (esgoto bruto) e 10 L (esgoto tratado), que podem ser reutilizados após a lavagem com Tween 80 ou Triton X-100. Sempre que possível, realizar as coletas com amostragem composta, preferencialmente de 24 h.
- Em geral, outras análises parasitológicas e bacteriológicas podem ser feitas com a amostra coletada. Por isso, é necessário manter os frascos em gelo para reduzir a atividade biológica e preservar o estado das amostras no período entre a coleta e a análise.
- Não congelar as amostras e mantê-las sob refrigeração (2-8 °C).

- As amostras devem ser identificadas com as seguintes informações: nome da amostra, data, horário e responsável pela coleta.

8. FLUXOGRAMA DO MÉTODO

Na **Figura 1** é apresentado de forma resumida o passo a passo do procedimento para a determinação do número de ovos de helmintos em amostras de esgoto bruto e tratado.

9. MATERIAIS

9.1. Aparelhagem

- Centrífuga para operar a 1.000 g.
- Agitador de tubos tipo Vórtex.
- Balança analítica.
- Medidor de pH.
- Microscópio óptico, com objetivas de 10x e 40x.
- Densímetro.
- Autoclave.

9.2. Reagentes

- Sulfato de zinco ($ZnSO_4$).
- Éter (C_2H_5)₂O ou acetato de etila ($CH_3COOCH_2CH_3$).
- Acetato de sódio tri-hidratado ($CH_3COONa \cdot 3 H_2O$).

- Ácido acético glacial (CH_3COOH).
- Triton X-100 ou Tween 80.

9.3. Soluções

- Solução de sulfato de zinco (33%) com densidade relativa de 1,18: pesar 33 g de $ZnSO_4$ e diluir em 100 mL de água destilada, usando um densímetro para verificar se a densidade é igual a 1,18.
- Tampão acetoacético (pH 4,5): 15 g de acetato de sódio tri-hidratado e 3,6 mL de ácido acético glacial. Completar para 1 L em água destilada.
- Solução detergente: pipetar 1 mL Triton X-100 ou Tween 80 e completar para 1 L com água da torneira.

9.4. Outros materiais

- Béquer graduado de 1 L, para sedimentação da amostra de esgoto bruto.
- Baldes graduados de 10 L, para sedimentação da amostra de esgoto tratado.
- Sifão para retirada do sobrenadante após o período de sedimentação.
- Frascos âmbar para armazenamento das soluções tampão e de sulfato de zinco.
- Tubos de centrifuga com tampa, de preferência tubos de 50 mL e 15 mL.

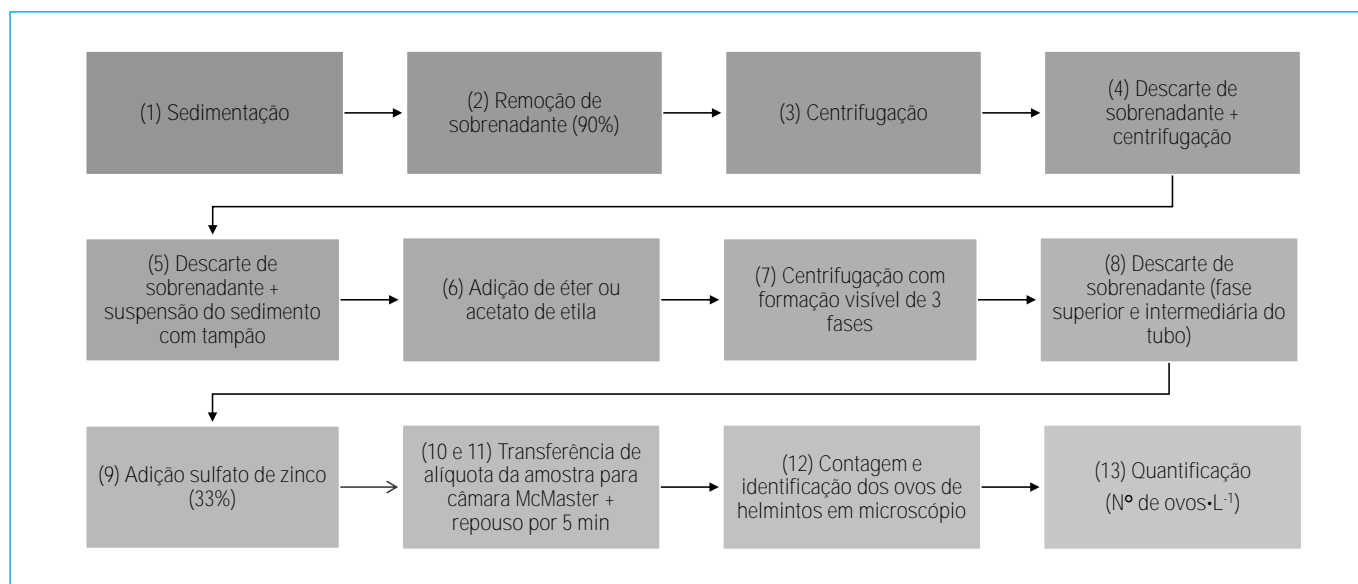


Figura 1 – Etapas simplificadas para a determinação de ovos de helmintos com base no Método de Bailenger modificado por Ayres e Mara (1996).

- Pipetas graduadas (10 mL).
- Pipetas de Pasteur.
- Provetas (10 mL ou 50 mL).
- Câmara McMaster para contagem.

10. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE ESGOTO

10.1. Descrição dos procedimentos

De forma resumida, o passo a passo para a determinação de ovos de helmintos usando o método apresentado por Ayres e Mara (1996) é o seguinte:

1. Ao darem entrada no laboratório, as amostras de esgoto bruto e tratado devem ser transferidas, respectivamente, para béquer de 1 L e balde graduado de 10 L, a fim de possibilitar adequados períodos de sedimentação dos ovos. Os tempos mínimos de sedimentação recomendados por Ayres e Mara (1996) dependem da densidade e velocidade de sedimentação dos ovos e da altura do recipiente, o que resulta, em tese, em tempos da ordem de 10 a 20 minutos. Todavia, na prática, os tempos de sedimentação adotados têm sido bem mais elevados, de 1 h para esgoto bruto e 2 h para esgoto tratado.

Nota: a fim de compatibilizar os tempos de sedimentação com os de processamento de cada amostra, tempos de sedimentação ainda mais elevados têm sido utilizados (overnight), o que possibilita que os procedimentos 2 a 13 (em sequência) possam ser realizados no dia seguinte.

2. Remover 90% do sobrenadante usando uma bomba de sucção ou sifão, inclinando o recipiente cuidadosamente para não ressuspender o sedimento. Garantir, ao final, um volume de aproximadamente 100 mL para o esgoto bruto e 1 L para o esgoto tratado.
3. Transferir, cuidadosamente, o sedimento para tubos de centrifugação, enxaguando os recipientes com Triton ou Tween 80. Em seguida, pesar os tubos e distribuir simetricamente na centrífuga, com posterior centrifugação em 1.000 g por 15 min.
4. Descartar o sobrenadante após a primeira centrifugação, transferir todos os sedimentos para um único tubo e centrifugar novamente, nas mesmas condições mencionadas anteriormente.

5. Descartar o sobrenadante e suspender o sedimento em um volume equivalente de tampão acetoacético. Caso o volume de sedimento seja inferior a 2 mL, adicionar solução tampão até completar um volume de 4 mL.
6. Adicionar ao tubo um volume de éter ou acetato de etila correspondente a duas vezes o volume do sedimento e homogeneizar utilizando um agitador do tipo Vórtex.
7. Centrifugar em 1.000 g por 15 min. Após essa etapa, três fases distintas serão formadas: (i) uma fase inferior contendo todo o material não gorduroso, ovos de helmintos, larvas e oocistos de protozoários; (ii) uma fase intermediária contendo a solução tampão, que deverá ser clara (transparente); e (iii) uma fase superior contendo gorduras e outros materiais solúveis em éter (ou acetato de etila) formando uma camada espessa e de cor escura.
8. Em um movimento firme e rápido, descartar todo o sobrenadante e anotar o volume de sedimento. Se for necessário, usar uma agulha fina para desprender a camada escura (fase superior do tubo) para facilitar o descarte.
9. Adicionar sulfato de zinco (densidade 1,18) em um volume equivalente a 5 vezes o volume do sedimento e homogeneizar usando agitador do tipo Vortex. Anotar o volume do produto final (em mL) e sulfato de zinco adicionado.
10. Transferir uma alíquota da amostra final para a câmara de McMaster usando uma pipeta de Pasteur.
11. Deixar a câmara de McMaster em repouso por 5 min para que os ovos de helmintos flutuem e atinjam a superfície do retículo de contagem.
12. Realizar a contagem de todos os ovos que estão dentro do retículo usando o microscópio com objetivas de 10x ou 40x.
13. O número de ovos de helmintos por litro na amostra é calculado pela **Equação 1**:

$$N = \frac{A \cdot X}{P \cdot V} \quad (1)$$

Na qual: N - número de ovos (ovos·L⁻¹); A - número médio de ovos contados nas câmaras de McMaster; X - volume do produto final (mL); P - volume da câmara de McMaster (para a câmara de um e dois retículos, os valores de P são 0,15 e 0,30 mL, respectivamente); V - volume inicial da amostra.

10.2. Cuidados importantes

- Utilizar Triton X-100 ou Tween 80 para qualquer transferência de sedimento de um recipiente para outro. Enxaguar bem o recipiente com a solução detergente.
- Sempre descartar cuidadosamente o sobrenadante para evitar perda do material depositado.
- Volumes de sedimento inferiores a 2 mL deve receber 4 mL do tampão acetoacético para garantir que, após a extração com acetato de etila, haja volume suficiente de tampão acima do *pellet* de forma a permitir que a camada de acetato de etila seja despejada sem ressuspensão.
- A leitura de, preferencialmente, três câmaras é recomendada para melhor precisão na contagem dos ovos de helmintos. Em caso de dúvida do tamanho do ovo, utilizar a régua micrométrica do microscópio.

- Seguir cuidadosamente as práticas de segurança do laboratório.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio recebido do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Estações Sustentáveis de Tratamento de Esgoto – INCT ETEs Sustentáveis.

Este trabalho faz parte da série de publicações do INCT ETEs Sustentáveis.

REFERÊNCIAS

AYRES, R.; MARA, D. *Analysis of wastewater for use in agriculture. A laboratory manual of parasitological and bacteriological techniques*. Geneva, Switzerland: World Health Organization (WHO), 1996. 31p.

GONÇALVES R. F.; HAANDEL, A. C. VAN; CORAUCCI FILHO, B.; VON SPERLING, M; MELO, H. N. S.; LUCA, S. J.; KATO, M. T.; AISSE, M. M.; LAPOLLI, F. R.; BASTOS, R. K. X.; PIVELI, R. P. *Desinfecção de efluentes sanitários*. Projeto do Programa de Pesquisas em Saneamento Básico (PROSAB). Rio de Janeiro, Brasil: ABES, RiMa, 2003, 438 p. Disponível em: [https://www.finep.gov.br/images/apoio-e-financiamento/historico-de-](https://www.finep.gov.br/images/apoio-e-financiamento/historico-de-programas/prosab/ProsabRicardo.pdf)

[programas/prosab/ProsabRicardo.pdf](https://www.finep.gov.br/images/apoio-e-financiamento/historico-de-programas/prosab/ProsabRicardo.pdf). Acesso: 10 de setembro de 2020.

ZERBINI, A. M.; CHERNICHARO, C. A. L. Metodologias para quantificação, identificação e análise de viabilidade de ovos de helmintos em esgotos brutos e tratados. In: Carlos Augusto de Lemos Chernicharo. (Org.). *Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios - Coletânea de Artigos Técnicos - Aspectos metodológicos*. Programa de Pesquisas em Saneamento Básico (PROSAB). 1ed. Belo Horizonte, Brasil: FINEP/PROSAB, 2001, v. 1, p. 70-107. Disponível em: <http://finep.gov.br/apoio-e-financiamento-externa/historico-de-programa/prosab/produtos>. Acesso: 10 de setembro de 2020.



Roteiros para análises e determinações em amostras de esgoto

Roteiro 8 – Determinação de oocisto de *Cryptosporidium* spp.

Protocols for analysis and determinations in sewage samples
Protocol 8 – Determination of Cryptosporidium spp. oocysts

Shyrlane Veras¹, Sávia Gavazza², Lourdinha Florencio^{3*}, Tânia L. M. Stamford⁴

1. DEFINIÇÃO DE TERMOS

DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
ETA	Estações de tratamento de água
ETE	Estações de tratamento de esgoto
IMS	Separação imunomagnética (<i>immunomagnetic separation</i>)
RID	Reação de imunofluorescência direta
UNT	Unidade nefelométrica de turbidez

2. OBJETIVO

O objetivo deste roteiro foi reunir e disponibilizar informações práticas para a identificação e quantificação de *Cryptosporidium* spp. em amostras de esgoto bruto e tratado.

3. CONCEITOS BÁSICOS

O protozoário do gênero *Cryptosporidium* é um patógeno de veiculação hídrica, podendo parasitar diferentes hospedeiros, incluindo o homem (FRANCO *et al.*, 2012). A doença chamada Criptosporidiose é transmitida pela ingestão de água e/ou alimentos contaminados com oocistos, que são formas resistentes e capazes de sobreviver em

ambientes externos (fora do hospedeiro). Os principais sintomas são: diarreia, dor abdominal, febre, fadiga, perda de apetite e de peso, náusea e vômito (PEREIRA *et al.*, 2009). Dessa forma, é importante identificar e quantificar esses protozoários, principalmente no efluente final das estações de tratamento de esgoto (ETEs), já que a diluição destes nos corpos hídricos pode torná-los impróprios para certos usos, como: (i) irrigação de hortaliças e de frutas (rente ao solo) consumidas cruas e que sejam ingeridas sem remoção de película (Classe 1); (ii) recreação de contato primário (Classe 1) ou secundário (Classe 3); (iii) irrigação de hortaliças e plantas frutíferas, parque, jardins e outros com os quais o público possa vir a ter contato direto (Classe 2) (BRASIL, 2005; 2011). Portanto, a determinação de oocistos é importante tanto para o controle da qualidade dos efluentes das ETEs como para controle de qualidade da água nas estações de tratamento de água (ETAs).

4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Com relação à determinação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., métodos rápidos, com boa reprodutibilidade e

¹Engenheira Química pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Mestre em Engenharia Química pela UFPE. Doutora em Engenharia Civil e Microbiologia pela cotutela UFPE e Universidad Autónoma de Madrid (UAM). Residente pós-doutoral no Programa de Pós-Graduação PRH 481 da UFPE Membro do INCT ETEs Sustentáveis.

²Engenheira Civil pela Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Doutorado em Hidráulica e Saneamento pela Universidade de São Paulo (EESC-USP). Professora Associada do Departamento de Engenharia Civil da UFPE Membro do INCT ETEs Sustentáveis.

³Engenheira Civil pela UFPE. Mestre em Hidráulica e Saneamento pela EESC-USP. Doutora em Ciências Agrícolas e Ambiental pela Universidade de Wageningen, Holanda. Professora Titular do Departamento de Engenharia Civil da UFPE Membro do INCT ETEs Sustentáveis.

⁴Nutricionista pela UFPE. Mestre em Microbiologia Agrícola pela Universidade de São Paulo (USP). Doutora em Nutrição pela UFPE.

*Endereço para correspondência: Avenida Acadêmico Hélio Ramos, s/n - Universidade Federal de Pernambuco - Laboratório de Saneamento Ambiental - Departamento de Engenharia Civil e Ambiental - Cidade Universitária. Recife, PE. CEP: 50740-530. E-mail: flor@ufpe.br

precisos existem e são aplicáveis em amostras de esgoto (bruto e tratado) e águas (subterrâneas, superficiais etc.). Com relação a estas últimas, atualmente, o método 1623.1 (USEPA, 2012) tem sido tomado como referência. No entanto, no caso de amostras de esgoto, a turbidez dessas é um fator interferente e que dificulta sua aplicação direta. Algumas metodologias desenvolvidas (com ou sem modificações) para a análise em águas também são aplicadas em amostras de esgoto, conforme reportado em alguns estudos (VESEY *et al.*, 1993a; 1993b; FRANCO *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2011).

Como não existe um método padrão para a determinação de oocistos em esgoto, a elaboração do presente roteiro tomou como base os procedimentos descritos por Medeiros (2013) e Valdez (2016), com uso de tripla centrifugação para a etapa de concentração do protozoário. Estes autores consideraram a turbidez das amostras e usaram adaptações do método 1693 para esgoto tratado (USEPA, 2014) e da metodologia apresentada por McCuin e Clancy (2005), com o uso de separação imunomagnética (IMS, do inglês *Immunomagnetic Separation*) e detecção dos organismos recuperados usando microscopia de epifluorescência. De forma resumida, a metodologia se baseia nas etapas de concentração (filtração ou tripla centrifugação), IMS, dissociação ácida e quantificação.

5. INTERFERENTES/CUIDADOS

Dentre os interferentes e cuidados necessários, podem ser citados:

- A turbidez causada por detritos inorgânicos e orgânicos pode interferir na concentração, separação e exame da amostra para oocistos de *Cryptosporidium*.
- Todos os materiais usados no laboratório (vidrarias, solventes, reagentes etc.) devem estar livres de interferências (poeira, materiais coloidais etc.) e devidamente higienizados, pois podem causar interpretação incorreta dos testes.
- O congelamento de amostras, filtros, concentrados ou placas pode interferir na detecção e/ou identificação de oocistos.
- A limpeza inadequada de materiais, equipamentos e bancada pode interferir nos resultados, levando a

possíveis erros. Dessa forma, é recomendável seguir as instruções de limpeza do laboratório e do fabricante dos equipamentos.

6. APLICAÇÃO DO MÉTODO

Existem vários métodos para este tipo de análise, mas não há um método padrão para amostras de esgoto. Sabe-se que não há um método preciso e que recupere todos os oocistos. Entretanto, dentre os métodos existentes, a metodologia apresentada neste roteiro considera as técnicas de referências (USEPA, 2012; 2014) e as modificações capazes de minimizar a ação de fatores interferentes. Ademais, ela tem mostrado bons resultados para amostras de esgoto bruto e tratado, além de lodos (VALDEZ, 2016).

A metodologia consiste em uma importante ferramenta para o controle de qualidade do efluente e monitoramento nas ETEs. Vale salientar que a mesma metodologia aplicada à determinação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., também é válida para cistos de *Giardia* spp.

Para outras matrizes, como mananciais e água de abastecimento público, consultar Método 1623.1 (USEPA, 2012) e modificações deste na literatura (LIMA e STAMFORD, 2003; STANCARI e CORREIA, 2010; FRANCO *et al.*, 2012).

7. COLETA, TRANSPORTE, PRESERVAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS

As informações básicas sobre a coleta, transporte, preservação e identificação de amostras estão detalhadas a seguir:

- Amostras com volume de 0,5 ou 1,0 L são suficientes para a determinação de oocistos. Geralmente, elas são utilizadas para outras análises parasitológicas e microbiológicas. Por isso, o volume é suficiente para outras determinações, incluindo possíveis repetições. Os frascos devem estar devidamente limpos: previamente lavados, desinfetados e enxaguados com Tween 80 (0,1% v/v).
- Os oocistos podem se degradar, logo, as amostras são enviadas ao laboratório sob refrigeração em gelo (de 1 a 10 °C) para reduzir sua atividade biológica e preservar o estado das amostras no período entre a coleta e a análise. As amostras analisadas em laboratório externo

devem ser enviadas em gelo por serviço noturno no mesmo dia em que forem coletadas.

- Não congelar as amostras e mantê-las sob refrigeração (entre 2 e 8 °C). O prazo de validade nestas condições é de 24 horas (BRANDÃO *et al.*, 2011; VALDEZ, 2016). Entretanto, alguns autores seguem o prazo de 7 dias apresentado no método 1623.1 para amostras de água (USEPA, 2012).
- As amostras devem ser identificadas com as seguintes informações: nome da amostra, data e horário da coleta, temperatura (coleta e recebimento no laboratório) e responsável pela coleta.

8. FLUXOGRAMA DO MÉTODO

Na **Figura 1** são mostradas as etapas simplificadas da metodologia ora apresentada para a determinação e quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

9. MATERIAIS

9.1. Equipamentos

- Misturador de amostra (Dynabeads®, Invitrogen).
- Concentrador de partículas (Dynal MPC-1, CAT 120.01D, Invitrogen Dynal AS).
- Concentrador de partículas (Dynal MPC-2, CAT 120.20D, Invitrogen Dynal AS).
- Centrífuga para tubos de 50 mL.
- Microscópio de epifluorescência.

- Incubadora. Recomendação: Fisher Scientific Isotemp™ ou equivalente.
- Agitador de tubos tipo Vórtex.
- Balança analítica.
- Bomba a vácuo.

9.2. Reagentes

- Hidróxido de sódio (NaOH, grau ACS reagente, ≥ 97%).
- Ácido clorídrico (HCl, grau ACS reagente, 37%).
- Metanol (CH₃OH, grau ACS reagente, ≥ 99,8%).
- Suprimentos antimicrobianos (opcional): alvejante, peróxido de hidrogênio a 3%, lenços com etanol e limpador comercial de superfícies.
- Kit para IMS (Invitrogen Dynal AS).
- Agente monoclonal (Dynabeads®).
- Kit MeriFluor® *Cryptosporidium*/*Giardia* (Meridian Bioscience®, cat. n° 250050) para detecção de oocistos por reação de imunofluorescência direta (RID).
- Marcador fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) da Merck (cat. n° D9542) ou equivalente.
- Água ultrapura.

9.3. Soluções

- Soluções de NaOH (1,0 N) e HCl (0,1 N).
- Tween 80 (0,1% v/v).
- Solução estoque de DAPI (2 mg·mL⁻¹): dissolver 1 mg de DAPI em 0,5 mL metanol absoluto. Armazenar entre 1 e 10 °C em ausência de luz. Não deixar congelar.

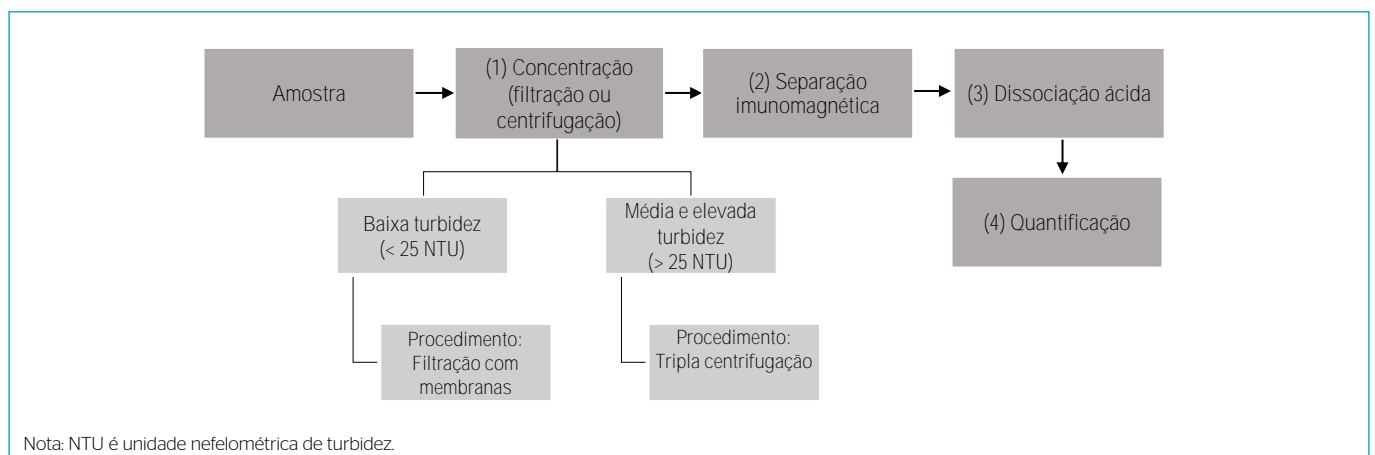


Figura 1 – Etapas simplificadas para determinação de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

9.4. Outros materiais

- Frascos de 0,5 ou 1 L devidamente higienizados.
- Gelo e recipiente térmico para conservação das amostras do ponto de coleta ao laboratório.
- Tubos de lado plano (Dynal® L10, Invitrogen Dynal AS, Noruega).
- Tubos de microcentrífuga.
- Tubos de centrífuga (cônicos e graduados) de 50 mL.
- Provetas graduadas e autoclaváveis (10, 100 e 1.000 mL).
- Frascos (Erlenmeyer, balão etc.) com volumes variados.
- Béqueres (5, 10, 50, 100, 500, 1.000 mL).
- Lâminas de poço.
- Câmara úmida, que é um recipiente hermeticamente fechado contendo toalhas de papel úmidas sobre as quais as lâminas são colocadas.
- Membranas de ésteres de celulose com porosidade de 3 µm (47 mm de diâmetro, Millipore).
- Micropipetas e ponteiras (0-10, 10-100 e 100-1.000 µL).
- Pipetas de Pasteur.
- Papel toalha.
- Luvas de látex sem pó.

10. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE ESGOTO

10.1. Descrição dos procedimentos

Como comentado anteriormente, a metodologia consiste em quatro etapas, as quais são apresentadas de forma resumida a seguir, a saber: (1) concentração (filtração ou tripla centrifugação); (2) IMS; (3) dissociação ácida; e (4) quantificação. A descrição completa e detalhada dos procedimentos pode ser consultada em Medeiros (2013) e Valdez (2016).

A etapa 1 consiste na concentração dos oocistos e é realizada por procedimentos diferentes, dependendo da turbidez das amostras (Figura 1). Caso elas apresentem baixa turbidez, a concentração pode ser realizada por filtração. Nesse caso, alguns autores aplicaram metodologias para análise em amostras de água (SANTOS *et al.*, 2011). Contudo, caso apresentem turbidez acima de 25 UNT (unidade nefelométrica de turbidez), a etapa de concentração segue por meio de tripla centrifugação. De acordo

com Valdez (2016), a diferença entre a metodologia para amostras com turbidez média e elevada é basicamente o volume inicial utilizado de amostra, que é de 150 e 50 mL de amostras, respectivamente, cada uma recebendo 50 mL de Tween 80 (0,1% v/v).

A purificação das amostras após a etapa de concentração consiste no uso da IMS (etapa 2). Essa técnica permite a separação entre os oocistos de *Cryptosporidium* e os demais componentes da amostra (possíveis interferentes). O mesmo acontece com os cistos de *Giardia*, já que eles normalmente são quantificados junto com os oocistos, usando a mesma metodologia. A etapa 2 envolve o uso de concentradores de partículas (ver item 8.1) e de kits específicos (ver item 8.2). Por isso, ela deve ser realizada de acordo com as instruções do fabricante.

Posteriormente, é realizada a recuperação dos oocistos. Para isso, a dissociação ácida é aplicada (etapa 3). A etapa 3 é dividida em duas partes. Na primeira, uma solução de HCl (0,1 N) é adicionada às amostras para separar os oocistos dos Dynabeads® (componentes magnéticos). Essa parte é realizada com agitação, centrifugação e uso de concentrador de partículas. Na segunda parte, uma fita magnética é utilizada para remover os componentes magnéticos.

O procedimento seguinte consiste na identificação e quantificação dos oocistos (etapa 4). Ela é realizada usando o kit MeriFluor® para detecção por RID. As instruções do fabricante devem ser seguidas e mais detalhes podem ser obtidos na metodologia descrita por Valdez (2016). Após o preparo das lâminas e uso do kit, a contagem dos oocistos é realizada com o uso de microscópio de epifluorescência. O cálculo do número de oocistos (visualizados pela técnica de RID) por litro (X) é feito utilizando a **Equação 1**:

$$X \left(\frac{n^\circ \text{ de oocistos}}{L} \right) = \frac{n^\circ \text{ de oocistos} \times 10^6}{\text{Volume do sedimento na lâmina } (\mu\text{L})} \times \frac{\text{Volume do sedimento total (mL)}}{\text{Volume de amostra (mL)}} \quad (1)$$

A qualidade da análise pode ser garantida por meio da calibração adequada dos equipamentos e reprodutibilidade dos testes realizados (concentração, IMS, coloração e microscopia).

10.2. Cuidados importantes

- As amostras não podem ser congeladas, devem ser mantidas sob refrigeração (entre 1 e 10 °C).
 - Solução de eluição: após a sua preparação, não a armazene por mais de 1 semana. Caso ela se apresente turva, descartar.
 - Reagentes de marcação direta de anticorpos para detecção de oocistos (kits comerciais utilizados): eles precisam ser armazenados entre 1 e 10 °C e retornados imediatamente a esta temperatura após cada uso. Nenhum dos reagentes deve ser congelado ou exposto à luz.
 - Solução estoque de DAPI (2 mg·mL⁻¹): descartar a solução não utilizada quando o controle de coloração positivo falhar ou após o tempo especificado pelo laboratório.
 - Solução de coloração: preparar a solução de trabalho diariamente e conservar entre 1 e 10 °C.
 - Descarte: amostras e materiais utilizados devem ser esterilizados antes do descarte.
- O risco de contaminação é alto. A metodologia é realizada com o manuseio de organismos vivos. Por isso, devem ser seguidas, cuidadosamente, as práticas de segurança do laboratório.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio recebido do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Estações Sustentáveis de Tratamento de Esgoto – INCT ETEs Sustentáveis.

Este trabalho faz parte da série de publicações do INCT ETEs Sustentáveis.

REFERÊNCIAS

- BRANDÃO, J. C.; BOTELHO, M. J. C.; SATO, M. I. Z.; LAMPARELLI, M. C. (Org.). *Guia nacional de coleta de preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos*. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo / Agência Nacional de Água. São Paulo, Brasil: CETESB; Brasília, Brasil: ANA, 2011. 326 p. Disponível em: <https://capacitacao.ana.gov.br/conhecer/handle/ana/2211> Acesso: 12 de novembro de 2021.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Meio Ambiente. *Resolução CONAMA nº 357, de 15 de junho de 2005*. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasília, DF, 2005.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Meio Ambiente. *Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011*. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Brasília, DF, 2011.
- FRANCO, R. M. B.; HACHICH, E. M.; SATO, M. I. Z. S.; NAVEIRA, R. M. L.; SILVA, E. C.; CAMPOS, M. M. C.; CANTÚSIO NETO, R.; CERQUEIRA, D. A.; BRANCO, N.; LEAL, D. A. G. Avaliação da performance de metodologias de detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água destinada ao consumo humano, para o atendimento às demandas da Vigilância em Saúde Ambiental no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 21, n. 2, p. 233-242, 2012.
- LIMA, E. D. C.; STAMFORD, T. L. M. *Cryptosporidium* spp. no ambiente aquático: aspectos relevantes da disseminação e diagnóstico. *Ciência Saude Coletiva*, v. 8, n. 3, p. 791-800, 2003.
- McCUIN, R. M.; CLANCY, J. L. Methods for the recovery, isolation and detection of *Cryptosporidium* oocysts in wastewaters. *Journal of Microbiological Methods*, v. 63, n. 1, p. 73-88, 2005.
- MEDEIROS, R. C. *Avaliação da remoção de Giardia spp. e Cryptosporidium spp. em processos de tratamento de esgotos sanitários*. 2013. 300 f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- PEREIRA, J. T.; COSTA, A. O.; CASTRO, E. A.; OSAKI, S. C.; PAULINO, R. C. *Cryptosporidium* spp.: para controlar é necessário conhecer. *Biomedicine*, n. 1976, p. 13-25, 2009.
- SANTOS, L. U.; CANTUSIO NETO, R.; FRANCO, R. M. B.; GUIMARAES, J. R. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras de esgoto bruto ou tratado: avaliação crítica dos métodos. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 16, n. 2, p. 115-120, 2011.

STANCARI, R. C. A.; CORREIA, M. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp em mananciais e águas de abastecimento público. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v. 69, n. 4, p. 453-460, 2010.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. *Method 1623.1: Cryptosporidium and Giardia in water by filtration/IMS/FA*. Washington, D.C, 2012. Disponível em: <https://nepis.epa.gov> Acesso em: 27 de agosto de 2020.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. *Method 1693: Cryptosporidium and Giardia in disinfected wastewater by concentration/IMS/IFA*. Washington, D.C, 2014. Disponível em: https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/method_1693_2014.pdf. Acesso em: 11 de setembro de 2020.

VALDEZ, F. Q. *Ocorrência e remoção de cistos de Giardia spp. e oocistos de Cryptosporidium spp. em reatores anaeróbios de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) operando com esgoto sanitário e águas negras simuladas*. 2017. 157 f. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

VESEY, G.; SLADE, J. S.; BYRNE, M.; SHEPHERD, K.; DENNIS, P. J.; FRICKER, C. R. Routine monitoring of *Cryptosporidium* oocysts in water using flow cytometry. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 75, n. 1, p. 87-90, 1993a.

VESEY, G.; SLADE, J. S.; BYRNE, M.; SHEPHERD, K.; FRICKER, C. R. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 75, n. 1, p. 82-86, 1993b.



Roteiros para análises e determinações em amostras de esgoto

Roteiro 9 – Gerenciamento de resíduos sólidos e líquidos de laboratórios de análises de esgoto

*Protocols for analysis and determinations in sewage samples
Protocol 9 - Management of solid and liquid waste
from wastewater analysis laboratories*

**Fabricio Motteran¹, Iago da Silva², Danubia Freitas³, Ronaldo Fonseca⁴,
Simone Machado-Santos⁵, Cíntia Dutra Leal⁶, Juliana Calabria Araújo⁷, Lourdinha Florencio^{8*}**

1. DEFINIÇÃO DE TERMOS

FISPQ	Ficha de informações de segurança de produtos químicos
MSDS/SDS	<i>Material safety data sheets</i>
PGRSS	Plano de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde
PNRS	Política nacional de resíduos sólidos
RSS	Resíduos de serviço de saúde

2. OBJETIVO

Este roteiro contempla a orientação para o gerenciamento, acomodação e disposição de resíduos sólidos, líquidos (orgânicos e inorgânicos) e de risco biológico gerados em laboratórios de saneamento ambiental.

3. CONCEITOS BÁSICOS

Os resíduos gerados em laboratórios de saneamento ambiental contêm compostos ou substâncias químicas que possuem alto potencial de causar danos a organismos vivos ou ao meio ambiente, além do perigo de acidentes, devido a incompatibilidade entre algumas destas substâncias, quando misturadas. Logo, é de vital importância que os laboratórios tenham um protocolo de gerenciamento e procedimentos adequados para o manejo destes resíduos, devendo estes serem separados, armazenados e destinados de acordo com suas características físico-químicas e de periculosidade. O gerenciamento destes resíduos gerados em laboratórios envolve diversas etapas, as quais abrangem a segregação, identificação (rotulagem),

¹Biólogo pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-MG). Especialista em Gestão Ambiental pela Universidade FUMEC. Mestre em engenharia agrícola pela Universidade Federal de Lavras (UFLA). Doutor em Hidráulica e Saneamento pela Universidade de São Paulo (EESC-USP). Professor Adjunto do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

²Químico Industrial pela UFPE. Mestre e doutor em química pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Técnico responsável pelo Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA) do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da UFPE.

³Licenciada em Química pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Técnica em Química Industrial pelo Centro Federal de Educação Tecnológica de PE (CEFET-PE). Mestre em Tecnologias Energéticas e Nucleares pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Doutoranda em Engenharia Civil com ênfase em Tecnologia Ambiental pela UFPE. Técnica de Laboratório/Química do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da UFPE.

⁴Ensino Profissional de nível Técnico em Química pela Escola Técnica Professor Agamenom Magalhães (ETEPAM). Técnico de Laboratório da Universidade Federal de Pernambuco - Laboratório de Saneamento Ambiental (UFPE-LSA)

⁵Engenheira Civil pela Universidade Católica de Pernambuco. Mestre e doutora em Engenharia Civil pela UFPE. Professora Associada do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da UFPE.

⁶Bióloga pela PUC-MG. Especialista em Microbiologia Ambiental e Industrial pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela UFMG. Técnica responsável pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG.

⁷Bióloga pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Mestre e doutora em Hidráulica e Saneamento pela EESC-USP. Professora associada do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG. Subcoordenadora do INCT ETES Sustentáveis.

⁸Engenheira Civil pela UFPE. Mestre em Hidráulica e Saneamento pela EESC-USP. Doutora em Ciências Agrícolas e Ambiental pela Universidade de Wageningen, Holanda. Professora Titular do Departamento de Engenharia Civil da UFPE. Membro do INCT ETES Sustentáveis.

*Endereço para correspondência: Avenida Acadêmico Hélio Ramos, s/n - Universidade Federal de Pernambuco - Laboratório de Saneamento Ambiental - Departamento de Engenharia Civil e Ambiental - Cidade Universitária, Recife, PE. CEP: 50740-530. E-mail: flor@ufpe.br

acionamento, tratamento, armazenamento, transporte e a disposição final.

Cada uma dessas etapas deve estar registrada para que o laboratório possa se organizar e comprovar o descarte ou disposição final dos resíduos gerados de forma adequada como preconiza a Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS) (BRASIL, 2010).

A PNRS está disposta sob a Lei Federal nº 12.305/2010, a qual incorpora os principais instrumentos para o manejo adequado dos resíduos sólidos, a fim de minimizar os problemas ambientais, sociais e econômicos diante a má gestão dos resíduos (BRASIL, 2010). Na PNRS é contemplada uma proposta sustentável, com a prevenção e a redução da geração dos resíduos como medidas prioritárias, a reciclagem e a reutilização de determinados resíduos, bem como a destinação ambientalmente adequada dos quais não podem ser reutilizados ou reciclados.

4. SEGREGAÇÃO DE RESÍDUOS DE LABORATÓRIO

A segregação de resíduos químicos laboratoriais consiste na separação deles, a qual deve ser realizada de acordo com suas propriedades químicas, físicas e biológicas. Além disso, devem ser observados o seu estado físico e seus possíveis tratamentos ou utilizações, devendo, sempre que possível, serem efetuados no local de sua geração. Essa tratativa permitirá o reúso, a reciclagem ou o tratamento, além de reduzir custos com a destinação final. Em síntese:

- O primeiro critério a ser observado na segregação de resíduos químicos laboratoriais é a sua periculosidade. Para tanto, é necessário considerar a norma NBR 10004/2004 para fazer essa classificação (ABNT, 2004).
- O segundo critério é verificar o estado físico do resíduo. Assim, resíduos sólidos devem ser separados de resíduos líquidos.
- O terceiro critério envolve a incompatibilidade química dos resíduos químicos laboratoriais. Resíduos contendo substâncias incompatíveis devem ser segregados, evitando, assim, a ocorrência de reações que podem causar acidentes.

Os resíduos laboratoriais podem ser classificados, segundo as normas vigentes, em:

- **Ativos:** São aqueles gerados diariamente nas atividades laboratoriais e, de modo geral, sua composição é conhecida.
- **Passivos:** São aqueles armazenados de forma inadequada ao longo dos anos, geralmente em frascos sem identificação, sem data ou processo de origem.
- **Resíduos de Classe I:** Enquadrado como resíduos perigosos, são aqueles que em função de suas propriedades físico-químicas e infectocontagiosas podem apresentar risco à saúde pública e ao meio ambiente. Os resíduos enquadrados nesta classe devem apresentar ao menos uma destas características: inflamabilidade, corrosividade, reatividade, toxicidade e patogenicidade. Exemplos de resíduos de Classe I: solventes orgânicos como acetona, acetonitrila, metanol, propanol, álcool isopropílico, clorometano, hexano, etanol, benzenos etc. Ácidos fortes, como sulfúrico e clorídrico, ácidos orgânicos, álcalis (soda), óleos, lubrificantes, metais pesados e demais produtos químicos ou reagentes químicos utilizados para preparação de análises laboratoriais (ABNT, 2004).
- **Resíduos de Classe II:** Esta classe é dividida em duas subcategorias, A e B, e estes são aqueles que não são enquadrados na Classe I, entretanto, podem apresentar propriedades de combustibilidade, biodegradabilidade ou solubilidade em água (ABNT, 2004).
- **Resíduos de Classe II-A:** Esses resíduos são classificados como não inertes, possuindo baixa periculosidade, mas ainda oferecem capacidade de reação química em certos meios. Este grupo inclui matérias orgânicas, papéis, vidros e metais, que podem ser reciclados ou dispostos em aterros sanitários. Como exemplos desta categoria enquadram-se: materiais orgânicos de uso laboratorial, lodo de sistemas de tratamento, equipamentos de proteção individual (EPI) - máscaras, luvas, jalecos descartáveis, toucas etc. (ABNT, 2004).
- **Resíduos de Classe II-B:** Esta subdivisão da Classe II inclui os resíduos inertes, que possuem baixa capacidade de reação, podendo ser dispostos em aterros sanitários ou reciclados, uma vez que não sofrem alteração em sua

composição ao longo do tempo. Como exemplos destes resíduos têm-se os plásticos, metais etc (ABNT, 2004).

- **Resíduos de Serviço de Saúde (RSS):** Geralmente estes resíduos não estão presentes em laboratórios de análises de amostras ambientais e, por isso, não são abordados neste protocolo. Para mais informações, recomenda-se consultar a Resolução RDC n° 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a Resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) n° 358/2005, que define como RSS todo resíduo gerado em atividade de saúde (BRASIL, 2004; BRASIL, 2005).

Entretanto, os resíduos de análises microbiológicas (como meios de cultura e resíduos de análises moleculares), normalmente gerados em Laboratórios de Microbiologia, segundo a RDC ANVISA n° 222/2018, são enquadrados como RSS do Grupo A1.

Esta Resolução menciona que culturas e estoques de microrganismos, exceto os hemoderivados, meios de cultura e instrumentais utilizados para transferência, inoculação ou mistura de culturas, resíduos de laboratórios de manipulação genética não podem deixar a unidade geradora sem tratamento prévio. Esses resíduos devem ser submetidos a tratamento, utilizando-se processos que vierem a ser validados para a obtenção de redução ou eliminação da carga microbiana (p. ex.: autoclave). Após o tratamento, devem ser acondicionados em saco branco leitoso, com ocupação máxima de 2/3 de sua capacidade, e identificado com símbolo de Substância Infeciosa Classe 6.2.

5. IDENTIFICAÇÃO (ROTULAGEM) DE RESÍDUOS DE LABORATÓRIO

A rotulagem pode ser realizada de diversas formas, a partir do uso de Pictogramas, Frases, Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) e MSDS/SDS (do inglês *Material Safety Data Sheets*), utilizando catálogos, *handbooks* ou até mesmo sites específicos. De modo geral, os frascos dos resíduos devem ser rotulados previamente, contendo a classificação do produto químico utilizado no local do trabalho quanto a sua perigosidade, a fim de assegurar a saúde dos usuários dos laboratórios.

Esta classificação geralmente segue o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS, do inglês *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals*) (UN, 2019). Na ausência de lista nacional de classificação harmonizada de substâncias perigosas, podem ser utilizadas listas internacionais. Os aspectos relacionados à classificação dos compostos e substâncias químicas devem atender aos dispostos em normas técnicas oficiais e vigentes.

A rotulagem preventiva é um conjunto de elementos com informações escritas, impressas ou gráficas relativas a um produto químico, a qual deve ser afixada à embalagem que contém o produto (**Figura 1**). Desta forma, a rotulagem prevê a distribuição dos produtos químicos em classes de modo a categorizar, graduar e classificar os compostos propondo elementos harmonizados (como solventes, bases, ácidos, metais pesados etc), promovendo facilidade na armazenagem, e a segurança do ambiente de trabalho e dos usuários dos laboratórios.

A rotulagem de produtos químicos classificados como perigosos deve conter as seguintes informações: (i) identificação do produto; (ii) composição química; (iii) pictograma de perigo; (iv) palavras de advertências; (v) frases de perigo; (vi) frases de precaução; e (vii) telefone de emergência. As frases de perigo são encontradas na NBR 14725-3/2012 (ABNT, 2012), assim como outras informações do produto são encontradas por meio da FISPQ e pelo número CAS (do inglês *Chemical Abstracts Service*) do composto.

Os resíduos ou mistura de resíduos gerados nos laboratórios de saneamento ambiental devem ter os seus

RESÍDUO QUÍMICO	
Resíduo Principal	
Resíduo Secundário	
Peso (Embalagem + Resíduo)	
Procedência	
Responsável	Data

Figura 1 – Modelo de fichas de rotulagem para resíduos químicos laboratoriais.

recipientes apropriados e devidamente rotulados, independentemente do volume de preenchimento. É recomendável que as soluções não excedam mais de 80% do volume total do recipiente e que estes não ultrapassem 20 L. Os recipientes devem ser quimicamente compatíveis com o resíduo alocado (p. ex.: não acondicionar ácidos em recipientes metálicos; não acondicionar ácido fluorídrico em frascos de vidro, assim como soluções de bases fortes).

Para o empacotamento de resíduos sólidos, deve-se mantê-los em recipientes originais ou saco plástico de alta resistência, para o qual deve-se também verificar a compatibilidade. Após a vedação do resíduo, este deve ser acondicionado em caixa de papelão e lacrado com fita adesiva seguido da rotulagem adequada.

6. ACONDICIONAMENTO DE RESÍDUOS DE LABORATÓRIO

Os resíduos químicos laboratoriais segregados deverão ser acondicionados em recipientes resistentes e quimicamente compatíveis com os resíduos, e deverão ser armazenados sobre bandejas de contenção para prevenir possíveis acidentes. Todos os recipientes deverão ser rotulados e tampados, de acordo com as orientações citadas no item 5.

7. TRATAMENTO DE RESÍDUOS DE LABORATÓRIO

Quando possível, sugere-se que os resíduos químicos sejam tratados para eliminar ou reduzir os riscos que possam apresentar, proporcionando um recolhimento e descarte mais seguro. Esta inativação deve ser feita em escala reduzida, em virtude de ser mais fácil e menos perigoso. Machado e Salvador (2005) e Perrin e Armarego (1988) apresentam métodos para tratamento de substâncias químicas em laboratórios.

8. ARMAZENAMENTO, TRANSPORTE E DESTINO FINAL DE RESÍDUOS DE LABORATÓRIO

Os resíduos químicos laboratoriais devem ser armazenados temporariamente em abrigos específicos até que sejam retirados para tratamento, o qual, quando não efetuado no

próprio laboratório, deve ser realizado por uma empresa especializada. Alguns aspectos de atenção:

- No armazenamento, devem ser tomadas medidas que não acarretem alterações nas características e quantidades dos resíduos.
- Os recipientes devem estar fechados e apropriadamente rotulados.
- Para evitar acidentes, os recipientes devem ser colocados sobre coletores secundários. Além disso, devem ser protegidos de fontes de luz, de calor e água.
- Os resíduos químicos que não podem ser reaproveitados ou descartados como resíduo comum e/ou na rede coletora de esgoto, devem ser coletadas por uma empresa especializada (contratada) para destinação final adequada.

9. METODOLOGIA PARA O GERENCIAMENTO DOS RESÍDUOS LÍQUIDOS E SÓLIDOS

9.1. Classificação dos resíduos gerados

A classificação dos resíduos oriundos das atividades de laboratórios ambientais e de saneamento envolve a identificação do processo ou atividade que lhes deu origem, de seus constituintes, características e a comparação destes constituintes com listagens de resíduos e substâncias cujo impacto à saúde e ao meio ambiente são conhecidos. A identificação dos constituintes deve ser criteriosa e estabelecida de acordo com as matérias-primas, os insumos e o processo que lhe deu origem. De modo geral, podem ser enquadrados como Perigosos (Classe I), Não perigosos (Classe II), Não inertes (Classe II-A) e Inertes (Classe II-B) (ABNT, 2004), conforme apresentado no item 4.

Tanto alguns consumíveis quanto resíduos laboratoriais presentes nas análises relacionadas a esgoto e efluentes sanitários requerem cuidados especiais, como os ácidos, bases, metais pesados, contaminantes microbiológicos, solventes orgânicos e demais composto tóxicos potencialmente cancerígenos e mutagênicos. Resíduos contendo hidróxido de sódio, potássio e cálcio, bem como organometálicos e óxidos de fosforo (P_2O_5) e cálcio (CaO), peróxidos de sódio (NaO_2) e potássio (K_2O_2), podem reagir facilmente com

água causando explosões ou liberação de calor em suas reações, assim como os ácidos fracos (orgânicos) e fortes (NASCIMENTO FILHO *et al.*, 2016). Na **Tabela 1** está apresentada a lista de produtos químicos e suas incompatibilidades.

9.2. Levantamento, quantificação, caracterização, classificação e planejamento dos resíduos gerados

A etapa de levantamento dos resíduos laboratoriais consiste na verificação dos tipos ou classes de resíduos, bem como das quantidades em que eles são gerados, em cada uma das fontes geradoras, por semana, mês, semestre etc. Este levantamento permite a caracterização dos resíduos e as etapas envolvidos em sua geração, podendo ser considerada a existência de resíduos passivos. Por meio do levantamento é possível conhecer todos os produtos e reagentes químicos existentes no laboratório ou instalação institucional. Dessa maneira, a geração de resíduos de laboratórios de saneamento ambiental pode seguir o fluxograma disposto na **Figura 2** a fim de facilitar o descarte e gerenciamento.

A separação de resíduos é realizada no momento e local de sua geração, de acordo com características físicas, químicas, biológicas, estado físico e riscos envolvidos. Esta separação acarreta economia de recursos, quantidade de resíduos que serão tratados por processos mais onerosos, além de propiciar a reutilização ou a reciclagem de determinadas soluções ou compostos, bem como aumentar a segurança laboratorial.

Tabela 1 - Relação de incompatibilidade de compostos químicos.

Reagente	Incompatibilidade
Acetileno	Cloro, Bromo, Flúor, Cobre, Prata e Mercúrio.
Acetonitrila	Ácido Sulfúrico, oxidantes fortes (percloratos / nitratos) e redutores (Na e Mg (metálicos)).
Ácido Acético	Ácido Nítrico conc., Ácido Perclórico, Ac. Sulfúrico conc., Ácido Crômico, Peróxidos, Permanganatos e Nitratos.
Ácido Fosfórico	Bases fortes, Cloratos, Nitratos e Carbeto de Cálcio.
Ácido Nítrico concentrado	Bases fortes, anilinas, compostos nitroaromáticos, Sulfeto de Hidrogênio, Ácido Acético, Éter Etilico, líquido e gases inflamáveis.
Ácido Perclórico	Enxofre, Bismuto e suas ligas, Álcoois, Anidrido ou ácido Acético, solventes e combustíveis, papel / madeira.
Ácido Sulfúrico	Cloratos, Percloratos, Permanganatos de Potássio (e de Lítio e Sódio), Bases, Picratos, Nitratos, pós metálicos e solventes.
Anilina	Ácido nítrico, Peróxido de Hidrogênio.

Reagente	Incompatibilidade
Bromo	Hidróxido de Amônio, Benzeno, benzina de petróleo, propano, butadienos, acetileno, Hidrogênio e pós metálicos.
Carvão ativo	Dicromatos, permanganatos, Hipoclorito de Cálcio, Ácidos nítrico e sulfúrico.
Cianetos	Ácidos
Cloratos e Percloratos	Sais de amônio, metais em pó, matérias orgânicas particuladas, enxofre, ácidos fortes, álcoois e combustíveis.
Cloreto Mercúrico (Hg-II)	Sulfitos, Hidrazina, aminas, ácidos fortes, bases fortes, fosfatos e carbonatos
Cloro	Idem Bromo
Cobre (metálico)	Peróxido de Hidrogênio, Acetileno.
Dicromato de Potássio	Alumínio, materiais orgânicos inflamáveis, Acetona, Hidrazina, Enxofre e Hidroxilamina
Éter etílico	Ácidos (nítrico e perclórico), Peróxido de Sódio, Cloro e Bromo
Etileno glicol	Ácido Perclórico, Ácido Crômico, Permanganato de Potássio, Nitratos, Bases fortes e Peróxido de Sódio
Formaldeído	Peróxidos e oxidantes fortes, Bases fortes e ácidos
Fósforo	Enxofre, Compostos Oxigenados (Nitratos, Permanganatos, Cloratos e Percloratos)
Hidrocarbonetos (Hexano, Tolueno, GLP etc.)	Ácido Crômico, Peróxidos, Flúor, Cloro, Bromo, Percloratos e outros oxidantes fortes.
Hidróxido de Amônio	Ácidos, Oxidantes fortes, Peróxidos, Cloro e Bromo
Hidróxido de Sódio	Ácidos, Solventes Clorados, oxidantes fortes
Hidróxido de Potássio	Ácidos, Solventes Clorados, anidrido maleico e acetaldeído
Iodeto de Potássio	Clorato de Potássio, Bromo, Oxidantes fortes, Sais de diazônio
Iodo	Acetileno, Hidróxido de Amônio e Hidrogênio
Líquidos Inflamáveis (álcoois, cetonas etc.)	Ácido Nítrico, Nitrato de Amônio, Peróxidos, Hidrogênio, Flúor, Cloro, Bromo e Óxido de Cromo (VI)
Nitrato de Amônio	Ácidos, pós metálicos e pós orgânicos, cloretos, Enxofre, Hipoclorito e Perclorato de Sódio, Dicromato de Potássio.
Óxido de Cromo (VI)	Ácido Acético, Glicerina, Líquidos Inflamáveis e Naftaleno
Prata Metálica	Acetileno, Ácido Oxálico e Ácido Tartárico
Peróxido de Hidrogênio	Álcoois, Anilina, Cloreto Estanhoso, Cobre, Cromo, Ferro, sais metálicos, Nitrometano e líquidos inflamáveis
Peróxido de Sódio	Ácido ou Anidrido Acético, Etanol, Metanol, Etileno glicol, Acetatos orgânicos, Benzaldeído e Furfural
Permanganato de Potássio	Glicerina, Etileno glicol, Benzaldeído, Ácido Sulfúrico e solventes orgânicos
Tetracloroeto de Carbono	Metais (Al, Be, Mg, Na, K e Zn), Hipoclorito de Cálcio, Álcool Alílico, Dimetilformamida e Água (forma gases tóxicos)

Fonte: Oliveira (2018)

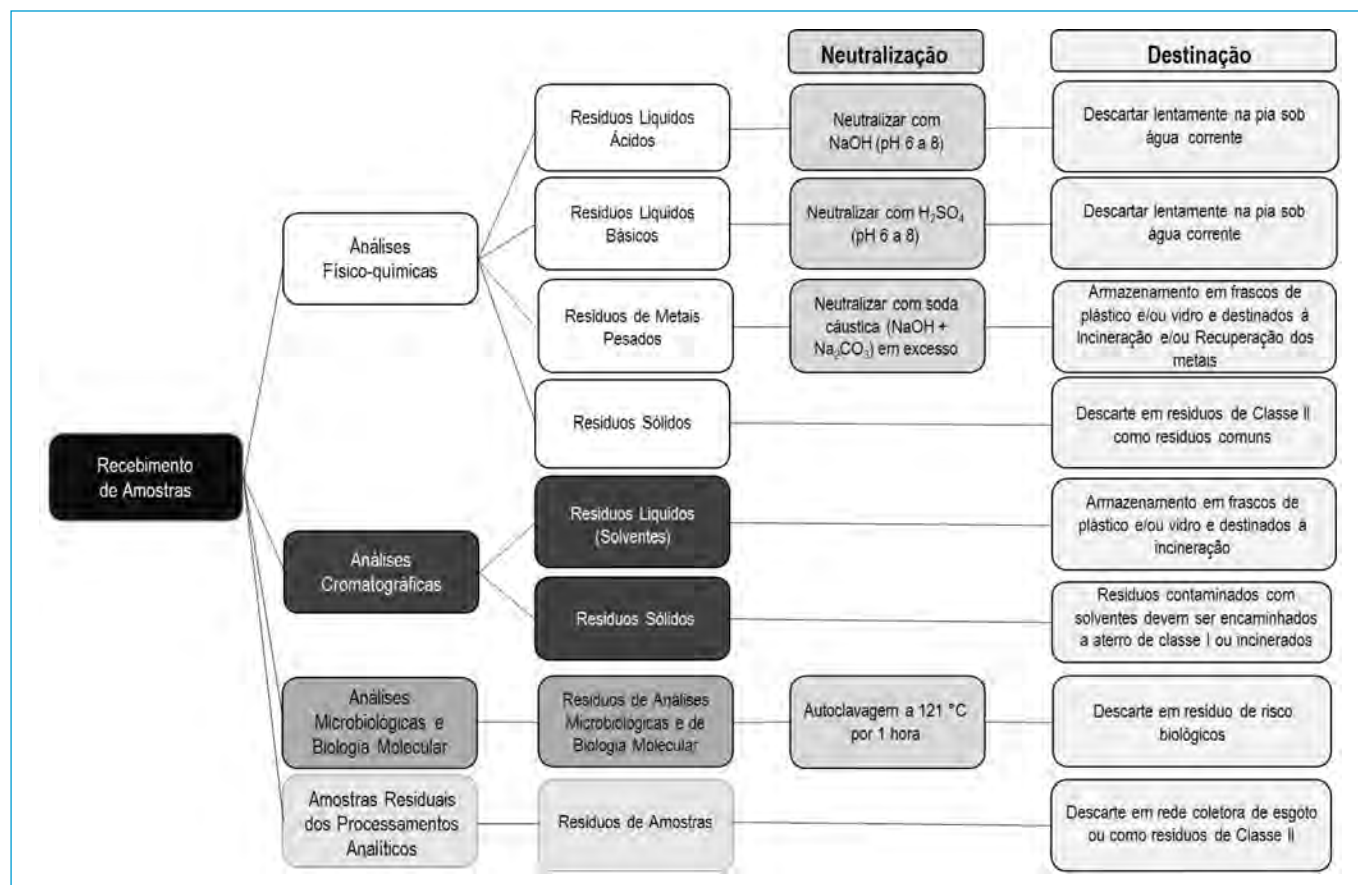


Figura 2 - Fluxograma da geração de resíduos líquidos e sólidos de laboratórios de saneamento ambiental.

A segregação dos compostos deve ser realizada sempre que houver incompatibilidade entre os resíduos, quando o tratamento adequado for diferente, assim como quando há possibilidade de reaproveitamento.

A segregação dos resíduos pode ser realizada como: (i) orgânicos (p. ex.: solventes clorados, acetatos e aldeídos, ésteres e éteres, hidrocarbonetos, álcoois e cetonas); e (ii) inorgânicos (p. ex.: soluções aquosas de metais pesados, ácidos, bases, sulfetos, cianetos, mercúrio metálico e sais de prata, estes dois últimos podem ser encaminhados para a recuperação).

9.3. Descarte de resíduos gerados em laboratórios de saneamento ambiental

Os resíduos não perigosos devem ser separados dos perigosos para recuperação ou destinação final adequada. Deve-se evitar combinações químicas das soluções de análises diferentes. Entretanto, quando for necessário realizar a mistura entre soluções, é importante consultar a incompatibilidade química na Tabela 1. É aconselhável realizar

o descarte do resíduo analítico logo após o término do experimento, a fim de não gerar acidentes laboratoriais.

9.4. Descarte de resíduos sólidos de análises físico-químicas e microbiológicas

Os resíduos sólidos de análises físico-químicas e microbiológica devem ser adequadamente classificados para posterior descarte. Resíduos sólidos de Classe I (resíduos perigosos) deverão ser direcionados para aterros industriais apropriados. Para os metais pesados e alcalinos fortes, recomenda-se a consulta de referências especializadas ou até mesmo entrar em contato com fornecedores para a melhor destinação e ou recolhimento do resíduo (LASSALI, 2018).

De acordo com a NBR 10004/2004, os resíduos não classificados como resíduos de Classe I podem ser classificados como sendo resíduo comum (Classe II), desta forma podendo ser descartado via sistemas de coleta de resíduos urbanos e/ou de esgotamento sanitário (quando líquido).

Quando sólidos, os resíduos podem ser descartados em lixeiras com ou sem coletas seletivas e ou caçambas de coleta. Destaca-se que, quando possível, deve ser realizada a redução da geração de resíduos, a separação e/ou doação de materiais recicláveis a fim de minimização dos efeitos ambientais.

O líquido remanescente de resíduo sólido não perigoso molhado deve ser eliminado adicionando materiais absorventes em quantidade suficiente no resíduo. Já os objetos perfurocortantes e vidros devem ser descartados nos recipientes para objetos cortantes devidamente identificados.

Materiais contaminados, como géis de acrilamida e poliacrilamida e precipitados de soluções, devem ter o líquido em excesso drenado por processos de filtração ou por secagem em capelas antes do descarte no lixo comum. Não se deve acondicionar estes resíduos em recipientes destinados à coleta de solventes orgânicos. Materiais contaminados com produtos tóxicos devem ser encaminhados para resíduos Classe I (resíduos perigosos) (SCHNEIDER *et al.*, 2011).

A acrilamida é um importante agente neurotóxico, dessa forma, equipamentos de proteção individual são necessários para a manipulação do pó deste composto, o qual deve ser realizada em capela. Diante disso, no descarte deste composto deve-se ter atenção especial para:

- O descarte do pó de acrilamida deve ser realizado com a sua disposição em embalagens bem lacradas e destinado a resíduos de Classe I.
- Soluções contendo acrilamida para preparo de gel e para eletroforese (análises de microbiologia e biologia molecular) podem ser polimerizadas e descartadas no lixo comum. A solução de acrilamida deve ser polimerizada de acordo com as instruções do fabricante. Caso a solução de acrilamida não se polimerize, deve ser disposta em embalagens bem lacradas e destinado a resíduos de Classe I.
- Os recipientes vazios de acrilamida devem ser previamente lavados com solução de NaOH (0,25 M) em capela, enxaguar sob água corrente para remover resíduos, destinando ao sistema de coleta de esgoto comum.
- Os géis de acrilamida bem como seus resíduos provenientes das análises microbiológicas e de biologia molecular podem ser eliminados em lixo comum.

- As cartelas usadas na análise de determinação de *Escherichia coli* (collilert), placas Petri (contendo meio sólido) usadas na determinação de colifágos, bactérias heterotróficas totais e bactérias resistentes a antibióticos, após contagem, devem ser autoclavadas (em autoclave usada exclusivamente para descontaminação de material). Após autoclavação, devem ser descartadas como material de risco biológico.
- As ponteiras, tubos e placas usados nas análises moleculares de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR, do inglês *quantitative real-time polymerase chain reaction*) para determinação de genes de bactérias, bem como na análise de qPCR e da reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcrição reversa (RT-qPCR, do inglês *reverse transcription quantitate real-time polymerase chain reaction*) para quantificação de genes de vírus entéricos e do novo coronavírus (SARS-CoV-2, do inglês *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) devem ser autoclavados e descartados como resíduo de risco biológico.

9.5. Descarte de resíduos líquidos de análises físico-químicas e cromatográficas

Os resíduos líquidos de análises químicas e microbiológicas gerados nos laboratórios de saneamento ambiental devem ser segregados e armazenados em recipientes adequados, em local ventilado, rotulados e afastados de áreas de circulação. Quando possível, estes resíduos devem ser tratados e processados no próprio laboratório, sendo neutralizados antes de serem descartados (SCHNEIDER *et al.*, 2011).

9.6. Procedimento para descarte de compostos na rede coletora de esgoto

9.6.1. Ácidos e bases

Caso o descarte em rede coletora de esgoto seja a opção para a eliminação de resíduos líquidos laboratoriais, deve-se comprovar se os componentes da solução são solúveis em água, possuem baixa toxicidade e, no caso de compostos orgânicos, são biodegradáveis (LASSALI, 2018). Alguns pontos de atenção:

- Ácidos concentrados e bases devem ser neutralizados antes do descarte. Resíduos líquidos sob solução aquosa

- devem ser descartados com faixa de pH entre 6,0 a 8,0 submetendo, caso necessário, as soluções à neutralização anteriormente ao descarte em rede coletora de esgoto.
- Soluções concentradas devem ser diluídas até obtenção de solução com 50% de água, com posterior ajuste de pH.
 - Para compostos orgânicos, diluir em até 100 vezes sob água corrente e com quantidade máxima de 100 g ou 100 mL·dia⁻¹.
 - Soluções pouco miscíveis em água, mas com concentrações inferiores a 2% podem ser descartados na rede coletora de esgoto.
 - Soluções e/ou reagentes cujo ponto de ebulição seja inferior a 50 °C não devem ser descartados na rede coletora de esgoto, mesmo sendo solúveis em água e pouco tóxicos
 - Atenção para não ultrapassar os limites diários de descarte de resíduos em rede coletora estipulados para o laboratório de análises.
 - Faça a lavagem da pia por meio de enxágue para remover qualquer resíduo químico descartado e faça a limpeza do ralo.
 - Após descartar produtos químicos pela rede coletora de esgoto, lave com um volume de água entre 10 a 20 vezes o volume descartado para remover quaisquer compostos remanescentes na canalização.

Os ácidos (clorídrico, sulfúrico, nítrico, acético, perclórico etc.) devem ser neutralizados com base (preferencialmente bicarbonato de sódio acrescido de carbonato de cálcio), com posterior descarte em água corrente na rede coletora de esgoto. Caso ocorra precipitação de resíduos sólidos, estes devem ser verificados para o posterior descarte em lixo comum ou ser encaminhado para tratamento adequado (SCHNEIDER *et al.*, 2011).

Todavia, não é recomendável neutralizar os seguintes ácidos: anidridos e cloretos ácidos, ácido nítrico fumegante, haletos e oxihaleto de fósforo, selênio, cromo, vanádio e enxofre, ácido clorosulfônico e ácido sulfúrico fumegante. Estes ácidos são extremamente reativos ou pouco solúveis em água e devem ser coletados em frascos, os quais devem ser fechados com firmeza, rotulados e encaminhados para o descarte.

As soluções e/ou resíduos sulfocrômicos não devem ser neutralizados. Estes materiais devem ser recolhidos em recipientes separados e levados a destinação adequada (resíduos de Classe I). Não é recomendável o emprego destas soluções na limpeza de vidraria, uma vez que o cromo é um composto tóxico, e um potente carcinógeno (SCHNEIDER *et al.*, 2011).

A neutralização de soluções básicas é realizada por procedimento similares a neutralização de soluções ácidas. Entretanto, cuidados especiais devem ser tomados, uma vez que estas soluções podem se comportar de maneira distinta às soluções ácidas. As bases (p. ex.: aminas, soluções de hidróxidos, soluções de alcoolatos e amônia) devem ser neutralizadas com ácidos fracos ou diluídas (p. ex.: ácido acético), ajustando o pH entre 6,0 e 8,0, antes de serem descartados sob água corrente na rede coletora de esgoto (OLIVEIRA, 2018).

Na neutralização de bases é comum ocorrer efervescência na adição de ácido a soluções de bases velhas devido ao acúmulo de dióxido de carbono nestas soluções. Ao realizar a neutralização de bases, deve-se evitar utilizar ácidos sulfúrico concentrado, sendo aconselhável a utilização de ácidos nítrico ou perclórico para realizar esta atividade. Da mesma forma, a utilização de ácido clorídrico também não é recomendada, uma vez que este ácido pode gerar nevoas de sal que são tóxicas (LASSALI, 2018).

9.6.2. Metais pesados

Os metais pesados presentes em resíduos aquosos devem ser precipitados com soda cáustica (NaOH + Na₂CO₃) em excesso em sua origem, e o resíduo líquido resultante pode ser descartado na rede coletora de esgoto após a verificação da eficiência do procedimento de precipitação, acerto de pH e cumprimento das normativas de solubilidade, diluição, toxicidade e biodegradabilidade. Os metais precipitados devem ser embalados e armazenados em depósitos no departamento de origem. Soluções contendo metais pesados e contaminação orgânica deverão ser separados e identificados para o tratamento e/ou disposição final. Da mesma forma, os metais devem ser precipitados e, posteriormente, tratados de acordo com suas classes (ABNT, 2004).

9.6.3. Tampões fosfatos

Os tampões fosfatos utilizados em diversas análises e/ou experimentos em laboratório de saneamento ambiental para procedimentos físico-químicos ou microbiológicos devem ser considerados poluentes, uma vez que o fosfato contribui para a eutrofização dos rios e consequente diminuição da concentração de oxigênio da água. Sugere-se que estes tampões sejam usados para estocagem de metais pesados. Dessa forma, eleva-se o pH dos tampões fosfatos a 10, e os adiciona à solução com metais pesados para permitir formação de precipitados (SCHNEIDER *et al.*, 2011).

9.6.4. Corantes

As soluções aquosas contendo corantes não tóxicos biodegradáveis podem ser descartados na rede coletora de esgoto. Caso os corantes apresentem toxicidade, estes devem ser removidos por meio de adsorção em resinas apropriadas ou por processos de coagulação anterior ao descarte da solução. O resíduo sólido gerado neste processo deve ser encaminhado para descarte de resíduos de Classe I (SCHNEIDER *et al.*, 2011).

9.6.5. Brometo de etídio e outros compostos tóxicos, carcinogênicos e mutagênicos

Produtos químicos carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos devem ser acondicionados em frascos bem lacrado e rotulado adequadamente. O descarte dessas soluções deve ser feito após avaliação uma a uma. Dentre estas soluções, uma muito utilizada em análises de biologia molecular é o brometo de etídio, o qual é um composto mutagênico. Os resíduos dessas soluções devem ser acondicionados em frascos bem lacrados e rotulados adequadamente e destinados a aterros de Classe I. Soluções aquosas com

concentração inferiores a $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de brometo de etídio devem ser tratadas com materiais absorventes adequados para remoção do composto. Após o procedimento, a solução aquosa pode ser descartada na rede coletora de esgoto, no entanto, o resíduo sólido bem como os géis, luvas, pipetas, tubos de ensaio, placas etc contaminados com este composto devem ser encaminhados ao aterro de Classe I (SCHNEIDER *et al.*, 2011).

9.6.6. Resíduos oxidantes

Resíduos fortemente oxidantes como soluções de hipocloritos, cloratos, bromatos, iodatos, periodatos, peróxidos e hidroperóxidos inorgânicos, cromatos, dicromatos, molibdatos, manganatos e permanganatos podem ser reduzidos por hipossulfito de sódio, com posterior ajuste de pH entre 6 a 8. O excesso de hipossulfito deve ser destruído com peróxido de hidrogênio. Depois disso, diluir e descartar na rede coletora de esgoto.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio recebido do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE, da Companhia Pernambuco de Saneamento – COMPESA, da BRK Ambiental, da Fibra Técnica - Engenharia e Saneamento, e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Estações Sustentáveis de Tratamento de Esgoto – INCT ETEs Sustentáveis.

Este trabalho faz parte da série de publicações do INCT ETEs Sustentáveis.

REFERÊNCIAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. *NBR 10004: Resíduos Sólidos - Classificação*. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2004. 71 p.

ABNT. Associação Brasileira de Normas técnicas. *NBR 14725-3. Produtos químicos - Informações sobre segurança, saúde e*

meio ambiente. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2012. 61 p.

BRASIL. Casa Civil. Lei Federal nº 12.305, de 2 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei nº 9605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. Brasília, DF, 2010.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº.316, de 20 de novembro de 2002. Dispõe sobre procedimentos e critérios para o funcionamento de sistemas de tratamento térmico de resíduos. Brasília, DF, 2002.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 358, de 29 de abril de 2005. Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências. Brasília, DF, 2005.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) nº 222, de 28 de março de 2018. Regulamenta as boas práticas de gerenciamento de resíduos de saúde e dá outras providências. Brasília, DF, 2018.

UN. United Nations. *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*. Eighth Revised Edition. New York, USA; Geneva, Switzerland: UN 2019. 570 p.

MACHADO, A. M. R.; SALVADOR, N. N. B. *Normas Gerais - 01/2005: Procedimentos para Segregação, Identificação, Acondicionamento e Coleta de Resíduos Químicos, Biológicos e Radioativos Líquidos e Sólidos*. Coordenadoria Especial para o Meio Ambiente (CEMA): Unidade de Gestão de Resíduos (UGR), UFSCar, São Carlos. 2005. 40p.

NASCIMENTO FILHO, A. P.; SEMAAN, F. S.; BOURGUIGNON, S. C. *Manual de Gerenciamento de Resíduos Químicos da Universidade Federal Fluminense*. Niterói: [s.n.]. 2016. 116 p. Disponível em: <<http://cibioib.sites.uff.br/gerenciamento-de-residuos-quimicos/>>. Acesso em: 18 de novembro de 2021.

LASSALI, T. A. *Gerenciamento de Resíduos Químicos: normas e procedimentos gerais*. Ribeirão Preto. 2018. 34 p. Disponível em: <http://www.sorocaba.unesp.br/Home/CIPA/normas_gerenciamento.pdf>. Acesso em: 20 novembro 2020.

OLIVEIRA, M. B. (Org.). *Manual de Boas Práticas de Laboratório*. Porto Alegre: [s.n.]. 2018. 73 p. Disponível em: <<https://uergs.edu.br/upload/arquivos/201901/02150629-manual-boas-praticas-de-laboratorio-uergs-site.pdf>>. Acesso em: 18 de novembro de 2020.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. F. L. *Purification of Laboratory Chemicals*. Pergamon Press, 3rd Edition, 1988.

SCHNEIDER, R. P.; GAMBA, R. C.; ALBERTINI, L. B. *Manuseio de Produtos Químicos. Capítulo 1 - Fundamentos*. São Paulo: ICBII USP, 2011. 39 p. Protocolo da Rede PROSAB Microbiologia. Área: Métodos Básicos. Disponível em: <https://ww3.icb.usp.br/wp-content/uploads/2019/11/Fundamentos_Manuseio_Prod_Quimicos.pdf>. Acesso em: 18 de novembro de 2020>.



