Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Enterovirus* EM
LODO DE ESGOTO PROVENIENTE DE ESTAÇÕES DE
TRATAMENTO DE ESGOTOS COM POTENCIAL USO NA
AGRICULTURA DO ESTADO DE SÃO PAULO.

Renata Maria Salvador

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Saúde
Pública para a obtenção do Grau de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Saúde Ambiental

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Tereza Pepe Razzolini

São Paulo

2011

Agradecimentos

Aos meus pais Eduardo e Maria das Graças pelo apoio e incentivo que sempre me deram nos estudos.

Ao meu irmão Ricardo pelo apoio emocional e financeiro todos esses anos.

A orientadora Prof.^a Dr.^a Maria Tereza pela exemplar orientação e excepcional paciência durante o período de mestrado.

A Agência Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB – Dr.^a Maria Inês Zanolli Sato e Dr.^a Elayse Maria Hachich, Gerência de Análises Ambientais, pela oportunidade única de desenvolver minha pesquisa em seus laboratórios e pela valiosa orientação enquanto estive lá.

As biólogas Suzi Cristina Garcia e Vilma Marques Bonanno do Laboratório de Virologia da CETESB que me explicaram muitas vezes o dia a dia da virologia ambiental e suas práticas diárias e os detalhes e segredos da cultura celular.

Aos técnicos do Laboratório de preparo de meios de cultura, pelo ensino das boas práticas de se preparar um meio.

Aos membros da banca examinadora e Prof.^a Dr.^a Dolores Úrsula Mehnert pelas imprescindíveis colaborações em todas as etapas deste projeto.

Aos amigos feitos na Faculdade de Saúde Pública e que sempre me apoiaram: a bióloga Francisca e a Dr.^a Solange do Laboratório de Análises Biológicas do Departamento de Saúde Ambiental, foram elas que primeiramente me apresentaram o mundo fantástico dos microrganismos, a Veridiana Karmann Bastos, Ana Maria B. Bedran de Castro e seu esposo Euder pelos momentos de descontração passados juntos.

Resumo

Salvador RM. Detecção e quantificação de *Enterovirus* em e lodo de esgoto proveniente de estações de tratamento de esgotos com potencial uso na agricultura do estado de São Paulo [Dissertação de mestrado] São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2011.

Lodos de esgoto são resíduos do tratamento do esgoto doméstico, considerados ricos em macronutrientes e matéria orgânica, podendo também apresentar contaminação por substâncias químicas e patógenos. Sua utilização na agricultura é uma das alternativas interessantes para sua disposição final. Entretanto, a presença de contaminantes, dentre eles microrganismos patogênicos podem limitar e orientar sua aplicação. Os vírus entéricos, dentre os quais se inclui o gênero *Enterovirus*, são potenciais contaminantes microbianos presentes no lodo de esgoto. Esses organismos são capazes de sobreviver por meses em águas e solos e sua presença no ambiente pode trazer prejuízos à saúde da população exposta aos mesmos. O objetivo do presente estudo foi de analisar a ocorrência de *Enterovirus* em amostras de lodo de esgoto de seis diferentes ETEs do Estado de São Paulo, avaliar o desempenho do método analítico para a detecção desses organismos e verificar se as concentrações médias obtidas atendem à legislação. Foram coletadas um total de 35 amostras no período de fevereiro de 2009 a dezembro de 2009. As análises dos *Enterovirus* foram realizadas pelo ensaio de plaqueamento em cultura de células RD segundo método EPA /625/R-092/013. Os resultados obtidos foram que *Enterovirus* estiveram presentes em 83% das amostras analisadas, com concentrações que variaram de não detectado (ND) a 12,50 UFP/gST. As taxas de recuperação obtidas variaram de 0,20% a 68,50%. Conclui-se que das amostras analisadas 31% atendem o estabelecido pela Resolução CONAMA 375/2006.

Descritores: Enterovirus, lodo de esgoto, agricultura, cultura de células.

Abstract

Salvador, RM. Detection of Enterovirus in sewage sludge from Sewage Plant Treatment with potential use in agriculture in São Paulo State [Thesis] São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2011.

Sewage Sludge is a waste generated from wastewater treatment and is considered besides rich in macronutrients and organic matter, contaminated with pathogen and chemical substances. The usage of sludge in agriculture has been considered an interesting option. Nevertheless, the presence of contaminants such as pathogenic organisms can lead to usage limitations.

Enteric viruses in which are included enterovirus genera, a potential sludge contaminants. These organisms are able to survive for months in water and soil and their presence can bring public health concerns.

The aim of this study was to analyse the occurrence of *Enterovirus* in samples of sewage sludge from six sewage plant treatment located in São Paulo State, to assess the method performance (recovery rate) in detecting these organisms and to verify the results obtained meet the standard established by the law. A total of 35 samples were collected spanning February to December 2009. The analyses were carried out according to method EPA/625/R-092/013. *Enterovirus* were present in 83% of samples examined with concentration varied from not detected (ND) to 12.5 PFU/gTS. The recovery rate varied from 0,2% to 68,50%. This study showed that 31% of analyzed samples met the standard established by Resolução CONAMA 375/2006.

Keywords: Enterovirus, sewage sludge, agriculture, cell culture.

Índice

1.	Introdução	1
2	Revisão da Literatura	4
2.1.	Utilização de lodos de esgoto na agricultura	4
2.2.	Organismos patogênicos presentes no lodo	8
2.3.	Legislação referente à utilização de Lodos de Esgotos	13
2.4	Vírus entéricos	16
2.4.1	Enterovirus	17
2.4.2	Ocorrência de Enterovirus em lodos de esgoto	18
2.5	Métodos de detecção e quantificação de vírus entéricos em amostras	20
2.5.1	Reação de cadeia da Polimerase – PCR	23
3.	Objetivos	24
4.	Método	25
4.1	Amostragem	25
4.2	Detecção e quantificação de Enterovirus	27
4.2.1	Procedimentos para culturas de células RD	28
4.2.1.1	Subcultivo das culturas e preparo para inoculação de amostras	28
4.3	Concentração e Floculação da Amostra	30
4.3.1	Semeadura experimental	32
4.4	Ensaio de Plaqueamento em Cultura de Células RD	33
4.4.1	Procedimento para a inoculação das Amostras.	33
4.4.2	Procedimento para cobertura das culturas inoculadas com ágar.	34
4.4.3	Leitura	34
4.5	Cálculo dos Resultados	35
4.5.1	Concentração de Enterovirus na amostra concentrada e na amostra semeada.	35
4.5.2	Cálculo das porcentagens de recuperação	36
5	Resultados	37
5.1	Quantificação de vírus	37
5.2	Desempenho do método	41
6	Discussão	44
7	Conclusão	48
8	Bibliografia	49
	ANEXOS	56
	ANEXO 1 – Meios de Cultura	56
	ANEXO 2 – Manutenção da Cultura Celular RD	64

Índice de Tabelas

Tabela 1: Taxas de aplicação de lodo utilizadas na agricultura em vários países.	5
Tabela 2: Microrganismos que podem estar presentes em lodos de esgotos e efeitos na saúde humana que podem estar presentes em lodos de esgotos.	9
Tabela 3: Microrganismos presentes no lodo de diferentes países. (concentrações em log/por gramaST, ovos de helminto em ovo/gramaST).	11
Tabela 4: Doses infectantes de alguns microrganismos patogênicos.	12
Tabela 5: Limites máximos permitidos de microrganismos pela Resolução CONAMA 375/2006 em lodo de esgoto.	13
Tabela 6: Limites máximos permitidos de microrganismos pela USEPA (1993) em lodos de esgoto.	14
Tabela 7: Valores máximos permitidos de microrganismos para a classificação de lodos de esgotos de acordo com a legislação mexicana de 2002.	15
Tabela 8: Processos de tratamento e características das Estações de Tratamento de Esgotos estudadas.	26
Tabela 9: Concentração de <i>Enterovirus</i> nas amostras de lodo nas diferentes ETE's avaliadas.	37
Tabela 10: Valores médios (média aritmética), máximos e mínimos da concentração de <i>Enterovirus</i> em amostras de lodo de esgoto (UFP/gST) por ETE.	40
Tabela 11: Taxa de recuperação obtida nas sementeiras utilizando-se 12 gramas de ST.	41
Tabela 12: Taxa de recuperação obtida nas sementeiras utilizando-se 4 gramas de ST.	42
Tabela 13: Médias e desvios padrão das taxas de recuperação obtidas utilizando sementeiras com amostras de 12 gramas.	43

Índice de Figuras

Figura 1: Câmara utilizada para contagem das células	29
Figura 2: Porcentagem das amostras positivas e negativas para a ocorrência de <i>Enterovirus</i> nas amostras de lodo de esgoto examinadas.	38
Figura 3: Intervalo da concentração de <i>Enterovirus</i> observadas nas amostras positivas.	39

1. Introdução

Lodos de esgoto são gerados durante o tratamento de esgotos e subsequente tratamento do lodo, rico em macronutrientes (nitrogênio e fósforo) e matéria orgânica (Bettiol e Camargo, 2006), contêm contaminações por substâncias químicas incluindo-se os metais pesados e microrganismos patogênicos. O interesse por esses resíduos vem assumindo relevância em decorrência dos benefícios de sua aplicação diretamente no solo como alternativa para a recuperação de áreas degradadas assim como aplicação na agricultura (Eseinberg et al. 2004).

Os dados do censo 2010, divulgados pelo IBGE, revelam que a maior carência do país na área de serviços públicos e infraestrutura continuam a ser em saneamento básico: apenas 55,4% dos 57,3 milhões de domicílios estavam ligados à rede geral de esgoto. Outros 11,6% utilizavam fossa séptica. Os demais 18,9 milhões (32,9%) não apresentaram infraestrutura sanitária, lançando seus despejos em rios ou fossas rudimentares. (BRASIL 2011).

Levantamentos feitos em vários países indicam que o volume de lodo produzido em uma Estação de Tratamento de Esgoto representa cerca de 1-2% do volume de esgoto tratado, sendo que seu tratamento e disposição final podem chegar a atingir entre 30% e 50% do custo operacional de uma ETE (PROSAB, 1999; Bettiol e Camargo 2006).

Embora a coleta e tratamento de esgotos nos países ainda sejam insatisfatórios há aumento do esgotamento sanitário e do tratamento de esgotos tendo como consequência uma maior produção de lodo, o que tem levado a uma busca de alternativas para sua disposição e ainda, quando possível, agregar valor a esse resíduo. Outro aspecto é o desenvolvimento de novas tecnologias de modo a atender a legislação ambiental, de segurança e de saúde pública os quais são cada vez mais restritivos.

A disposição do lodo de esgoto configura-se em preocupação em âmbito mundial no que se refere à proteção e preservação ambiental e saúde pública. Disposições finais alternativas devem ser testadas, incluindo-se a aplicação no solo, lançamento ao mar, fertilização e incineração (Sanchez Monodero et al 2004). Fertilização e aplicação dos lodos de esgotos no solo são sugeridas como o modo mais adequado e econômico de disposição final, (Metcalf e Eddy 2003).

O lodo de esgoto não deve ser considerado como um simples resíduo. Pelas suas características físico-químicas pode ser utilizado como condicionador do solo, podendo auxiliar na melhoria das práticas agrícolas. A sua aplicação no solo está se tornando popular devido à possibilidade de reciclagem de substâncias como fósforo e nitrogênio e ainda de outros nutrientes requeridos pelas plantas. A sua aplicação possibilita essa reciclagem e elimina ou minimiza a necessidade do uso de fertilizantes comerciais. Porém a sustentabilidade de sua aplicação no solo tem sido questionada com base nos efeitos de longo prazo já que essa prática pode causar alterações nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo. (Archie e Smith, 1981; Brooks et al 2007).

O lodo possui uma grande variedade de microrganismos sendo que a maioria são saprófitas. Entretanto existe uma parte constituída por vírus, bactérias, fungos e protozoários que podem ser patogênicos. A sua quantidade no lodo é bastante variável e depende fundamentalmente do perfil epidemiológico da população. A concentração de agentes patogênicos também pode variar com o tempo e estação do ano (Soccol e Paulino 2000; Pepper et al 2008; Fitzmorris et al 2009).

A forma de disposição desse resíduo no Brasil é recente e pouco se conhece sobre a caracterização química e microbiológica do lodo gerado pelas Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs), o que suscita preocupações quanto aos efeitos agudos e crônicos que a sua aplicação em solo agrícola pode trazer para a saúde humana e ao ambiente. Nesse sentido, o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) estabelece limites para patógenos e assim regular a utilização desses resíduos. Dentre eles os vírus entéricos os quais suscitam preocupação, pois são

contaminantes potenciais presentes no lodo de esgoto e sua concentração deve ser controlada para permitir o uso desse material. Existem mais de 140 tipos de vírus entéricos excretados pelo homem que podem ser encontrados no esgoto doméstico e em biosólidos (Gerba et al. 2002). Dentre esses os enterovírus constituem o maior grupo associado a doenças, principalmente em crianças, algumas severas como a poliomielite, que ainda acomete um número significativo de crianças em países com o saneamento básico precário. Ainda esse gênero tem sido o mais estudado devido à facilidade de seu diagnóstico laboratorial. Dados da literatura mostram que a concentração de vírus no lodo de esgoto bruto pode variar de 10^2 (lodo digerido) a 10^4 (lodo primário) por grama de peso seco (Straub et al 1993; Gerba et al 2002, USEPA 2007). A sobrevivência dos vírus entéricos no solo depende primariamente da temperatura e umidade. Uma série de trabalhos tem sido publicada sobre o risco ocupacional, bem como o risco de ingestão direta ou indireta por alimentos ou água contaminados por esses biosólidos (Gerba et al 2002, Eisenberg et al 2004, 2008).

Considerando-se a ocorrência de microrganismos patogênicos em lodos de esgoto constata-se uma demanda crescente para uma melhor definição do risco associado com a aplicação de lodo no solo. Para se estimar esse risco, uma das primeiras etapas necessárias é caracterizar o perigo, ou seja, caracterizar e quantificar os contaminantes químicos e microrganismos patogênicos presentes nessa matriz. Portanto, justifica-se a realização de investigações visando a quantificação de enterovírus em lodos de esgotos provenientes de Estações de Tratamento de Esgotos, cujo potencial de utilização na agricultura é reconhecido.

2 Revisão da Literatura

Antes de se definir o local e a forma de destino final do lodo gerado, os seguintes aspectos devem ser estudados: quantidade de produção e caracterização do lodo gerado na estação de tratamento; presença de esgotos industriais no sistema, características especiais que possam vir a interferir na qualidade final (presença de metais pesados ou tipos de solventes orgânicos, por exemplo).

2.1. Utilização de lodos de esgoto na agricultura

A utilização de lodo de esgoto na agricultura alia baixo custo e possível impacto ambiental positivo quando realizada dentro de critérios estabelecidos que visem à proteção ambiental e a saúde humana. É uma solução que pode ser considerada viável, pois promove o retorno dos nutrientes ao solo, como por exemplo, o fósforo e nitrogênio, colaborando para o fechamento do ciclo desses elementos.

O valor agrícola do lodo como insumo agrícola, a sazonalidade das demandas e os custos envolvidos no seu beneficiamento e transporte, assim como um plano gerencial para a atividade e monitoramento ambiental são aspectos relevantes para a análise desta alternativa.

A reciclagem agrícola deve necessariamente estar condicionada a regras que definam as exigências de qualidade do lodo e aos cuidados exigidos para sua estabilização, desinfecção e normas de utilização que incluam as restrições de uso. Assim, a regulamentação de uso é um pré-requisito básico para a utilização desta prática que apresenta grandes dificuldades para sua correta definição, de forma a garantir seu uso sem, contudo, inviabilizar o processo pelo excesso de exigências. As regulamentações de uso visam à proteção da saúde humana e animal, a qualidade das colheitas, do solo e do meio ambiente. É uma alternativa particularmente promissora para países como o Brasil, onde se faz necessária a reposição do estoque de matéria

orgânica dos solos devido ao intenso intemperismo das nossas condições climáticas (BRASIL 2006).

A valorização agrícola do lodo de ETEs, por intermédio de sua aplicação nos solos, não se restringe apenas ao descarte considerado ambientalmente adequado desse resíduo, devendo seu uso ser direcionado à recuperação de solos com possibilidades de retorno econômico para a atividade agrícola.

Observa-se que a prática de utilização de lodos de esgoto na agricultura tem sido adotada em países da Europa, América do Norte, Austrália e Rússia dentre outros. A tabela 1 apresenta quantidades típicas de aplicação nesses países e restrições de aplicação.

Tabela 1: Taxas de aplicação de lodo utilizadas na agricultura em vários países.

País	Aplicação Máxima permitida (ton/seco por ha)	Aplicação típica (ton/seco por ha)
Austrália – uso em larga escala na agricultura	-	8 (lodo desaguado) 13 (estabilizado com cal)
Canadá (Columbia Britânica) - aplicação em florestas	-	84 40
Canadá: - agricultura	8 (a cada 3 anos)	-
Canadá: (Ontário) - agricultura	22 (a cada 5 anos)	-
China (He) - agricultura	30 (por ano)	-
Inglaterra	-	6 to 8
Jordânia (Al-Hmoud) agricultura	6	-
Noruega	usualmente uma vez a cada 10 anos	-
Federação Russa - Uso florestal	-	60 to 80
África do Sul aplicações agrícolas com lodo classe A	10 (por ano)	-
EUA: Denver, Colorado	-	2 a 3 (trigo) 18 a 22 (trigo irrigado)
EUA: Kent County, Delaware - agricultura	-	3 a 10 (dependendo da cultura e tipo de solo)

Fonte: UN-HABITAT Global Atlas of Excreta, Wastewater Sludge, and biosolids Management (2008)

Segundo o *Global Atlas of Excreta, Wastewater, Sludge and Biosolids* (UN-HABITAT 2008) o uso do lodo varia de país para país e alguns exemplos são dados a seguir:

AUSTRÁLIA: No ano de 2005 foram produzidos 360.000 toneladas de lodo seco na Australásia (Austrália e Nova Zelândia). O custo do gerenciamento do lodo gira em torno de 35 – 50% do custo total de operação do sistema de tratamento. O Uso mais comum do lodo de esgoto é a aplicação na agricultura, embora quantidades substanciais tenham sido estocadas por décadas. Relatou-se que na Austrália a disposição em aterro sanitário não é considerada alternativa, mas essa prática é aceita na Nova Zelândia.

BRASIL: No Brasil o uso do lodo de esgoto na agricultura é cerca de 15% de todo o lodo produzido. De acordo com as estimativas (Machado, 2001) a maior parte do lodo é destinada a aterros sanitários, mas essa alternativa não se considera como definitiva para equacionar a disposição desses resíduos.

CHINA: A aplicação de lodo na agricultura é a opção favorita em se considerando o custo de disposição em aterros sanitários versus os benefícios ambientais. Para a aplicação na agricultura a presença de elementos tóxicos no lodo é o mais preocupante, mas isso não impede que entre 3,5 – 45% do lodo produzido seja aplicado no solo, após processos de tratamento como digestão e secagem. No entanto a disposição em aterros ainda é utilizada sendo de 34% do lodo disposto em aterros sanitários. Apenas 10% do volume do lodo é disposto no solo sem controle ou lançado em “lixões”. Cerca de 3% do lodo é tratado e depois incinerado.

COLÔMBIA: Nesse país vem sendo desenvolvidas pesquisas para verificação do potencial agrícola dos lodos de esgoto. Um exemplo é que o lodo gerado na estação de tratamento El Salitre (Bogotá) tem sido objeto de estudos. Esse resíduo é incorporado ao solo e são simulados diversos cenários de aplicação e verificação da qualidade microbiológica e parasitológica. Portanto, há interesse

desse país em utilizar o lodo de esgoto em solos agrícolas mas minimizando danos ao meio ambiente e à saúde humana.

UNIÃO EUROPEIA: A União Europeia é composta por 27 países, cada um em diferentes fases de investimento em tratamento de resíduos e serviços. Nos países da Europa Central e Oriental (15 países) a disposição e uso do lodo, em 2010, foi de 18% em aterro sanitário, 23% em compostagem térmica, 45% na agricultura e 7% outros destinos. Com a adesão de novos países a produção deverá aumentar com um viés para uso em solo, particularmente na agricultura. O sistema de aterro está sendo progressivamente abandonado por motivos práticos e reguladores. A seleção de gestão numa base local será alcançada através de uma variedade de meios, mas as práticas locais variam amplamente. Assim, por exemplo, a reciclagem é incentivada no Reino Unido, mas proibida na Holanda, onde o lodo é utilizado como um biocombustível. Mesmo dentro dos países, as práticas podem variar devido a fatores locais.

ALEMANHA: Em 2003, aproximadamente 2 milhões de toneladas de lodo de esgoto (matéria seca) foram produzidos. Os processos térmicos de tratamento de lodo ganharam importância, em detrimento ao aterro, bem como a reciclagem de materiais (agricultura, paisagismo). Em particular, isto é devido aos seguintes acontecimentos: 1.) Desde 2005, aterros sanitários não são mais permitidos na Alemanha e não é legal o descarte de material com mais de 3% de matéria orgânica total; 2.) O debate político sobre a reciclagem do lodo na agricultura ou na jardinagem, que se deu durante os últimos anos causou uma grande incerteza. Esta discussão incluía não apenas a introdução de requisitos consideravelmente maior, mas uma completa proibição da reciclagem de lodos também. Reciclagem de lodo na agricultura pode não ser considerado um método de descarte confiável na Alemanha, que portanto, prefere o tratamento térmico como a escolha mais segura para esse fim.

ITÁLIA: No que diz respeito às diferentes opções de disposição, a destinação para aterros está reduzida a 38% (em 1994 era 80%) com tendência a diminuir, em consequência de rigorosas normativas europeias as quais limitam resíduos orgânicos

em aterros (Diretiva 1999/31/CE). Cerca de 55% de lodo encontra reutilização, tanto através de utilização direta da agricultura e, em menor medida, a compostagem e a recuperação das terras, enquanto que os tratados termicamente são apenas 6%. O restante 1% é eliminado por outros meios. No norte da Itália, onde há maior volume de efluentes de origem industrial, a opção utilizada é a disposição em aterros para minimizar a contaminação de solos produtivos.

PORTUGAL: A principal cultura agrícola que se beneficia da aplicação de lodo é o milho, seguido por vinhedos e pomares. Aplicações esporádicas ocorrem em áreas de forragem e no reflorestamento após os incêndios florestais. O método de aplicação mais comum de lodo na agricultura é adicioná-lo ao solo, sendo primeiramente distribuído em uma determinada área e então é incorporado por meio de arado. Segundo a legislação em vigor, as operações têm de ocorrer nos dois dias após a sua distribuição. (EU, 1986)

2.2. Organismos patogênicos presentes no lodo

Os patógenos normalmente estão presentes, e os principais são bactérias (*Escherichia coli*, *Salmonella sp.*), vírus (*Adenovirus*, Vírus da Hepatite A) e parasitos (*Giardia lamblia*, *Ascaris lumbricoides*) (Andreoli, Fernandes, Domaszak 1997; Bonnet, Lara, Domaszak 1998; Thomaz-Soccol 1998). A concentração desses patógenos presentes no esgoto doméstico varia de um município para outro e em decorrência do perfil epidemiológico da população e apresenta variação sazonal. O nível de patógenos presentes no lodo de esgoto seco também depende das reduções conseguidas pelo tratamento do esgoto.

Os patógenos no esgoto doméstico são associados primeiramente com a quantidade de sólidos insolúveis, uma vez que eles se agregam aos sólidos e no tratamento primário os sólidos são concentrados no lodo, assim no esgoto bruto que é submetido a tratamento biológico tais como lagoas, filtros biológicos e lodos ativados podem ocorrer redução substancial do número de patógenos no esgoto tratado (USEPA 1989). Esses processos podem também reduzir o número de

patógenos no lodo de esgoto, criando condições adversas para a sobrevivência desses organismos. No entanto, o lodo resultante ainda pode conter níveis suficientes de patógenos os quais representam fatores de risco à saúde humana e preocupação ambiental. A Tabela 2 apresenta patógenos que podem estar presentes nos lodos de esgoto sendo capazes de causar infecção, doença e morte em seres humanos e animais dependendo das doses de exposição.

As doses infecciosas variam para cada patógeno e uma preocupação é o potencial efeito que alguns patógenos, como os vírus entéricos, têm de cruzar linhas de espécies, em particular animais homeotermos, e infectar a ambos se forem expostos a eles.

Tabela 2: Microrganismos que podem estar presentes em lodos de esgotos e efeitos na saúde humana.

Organismo	Doença e Sintomas
Bactéria	
<i>Salmonella</i> sp.	Salmonelose (tipo febre tifóide)
<i>Shigella</i> sp.	Desintéria Bacilar
<i>Yersinia</i> sp	Gastroenterite aguda (diarréia e dor abdominal)
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera
<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenterite
<i>Escherichia coli</i> patogênica	Gastroenterite
Vírus Entéricos	
Hepatite A	Hepatite infecciosa
Norwalk e Norwalk-like	Gastroenterite com severa diarréia
Rotavírus	Gastroenterite aguda.
Enterovírus	
Poliovírus	Poliomielite
Coxsackievirus	Meningite, pneumonia, hepatite, febre,
Echovirus	Meningite, paralisia, encefalites, febre, sintomas de resfriado, diarréia, etc.
Reovirus	Infecção respiratória, gastroenterite
Astrovirus	Gastroenterite
Calicivirus	Gastroenterite
Protozoários	
<i>Cryptosporidium</i>	Gastroenterite
<i>Entamoeba histolytica</i>	Gastroenterite
<i>Giardia lamblia</i>	Giardíase (incluindo diarréia, dor abdominal e perda de peso)

<i>Balantidium coli</i>	Diarréia
<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmose
Helmintos	
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Problemas digestivos e distúrbios nutricionais, dor abdominal, vômitos, agitação
<i>Ascaris suum</i>	Pode produzir sintomas como tosse, dor torácica e febre
<i>Trichuris trichiura</i>	Dor abdominal, diarréia, anemia, perda de peso
<i>Toxocara canis</i>	Febre, desconforto abdominal, dores musculares, sintomas neurológicos
<i>Taenia saginata</i>	Nervosismo, insônia, anorexia, dor abdominal, distúrbios digestivos
<i>Taenia solium</i>	Nervosismo, insônia, anorexia, dor abdominal, distúrbios digestivos
<i>Necator americanus</i>	Ancilostomíase
<i>Hymenolepis nana</i>	Teníase

Fonte: USEPA (2003).

Se o lodo de esgoto não é tratado e adequadamente aplicado ao solo ou colocado em um local de circulação de seres humanos e animais, estes podem estar expostos a agentes patogênicos diretamente pela proximidade com o lodo ou indiretamente por consumo de água ou alimentos contaminados por patógenos presentes no lodo. Insetos, aves, roedores, e até mesmo trabalhadores rurais podem contribuir para estas rotas de exposição.

Durante o processo de aplicação dos lodos os agentes patogênicos podem ser transportados através de bioaerossóis, através da contaminação de águas subterrâneas, poços de água potável, e águas de superfície, ou através da contaminação alimentar (por alimentos cultivados em áreas de disposição de lodo). Também podem ser transportados para os seres humanos que andam pelos campos.

A tabela 3 ilustra as concentrações de indicadores de contaminação fecal e patógenos em amostras de lodo de diferentes países europeus, latinos, norte-americanos e asiáticos.

Tabela 3: Microrganismos presentes no lodo de diferentes países.
(concentrações em log/por gramaST, ovos de helminto em ovo/gramaST).

PAÍS	Coliformes Fecais	<i>Salmonella</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Bacteriofágos	Cistos de Protozoários	Ovos de Helminto
Alemanha	-	-	-	-	-	<1.1
Austrália	-	2-3	-	-	-	-
Brasil	5	-	-	<1-3	1-3	75
Chile		3.5	-	2.7	-	-
México	10	7-8	5-7	3-6	2 – 4 (G)	73 – 177
França	-	-	-	-	3	4.4 – 7.7
Japão	5	1	-	3-4	-	-
Grã Bretanha	4-6	2-4	3-5	-	-	<6
Estados Unidos	7	23	3	4-6 3(E)	2 (G)	2.0 – 13.0

(E) *Enterovirus*, (G) *Giardia*, (V) ovos viáveis

Fonte: Global Atlas of Excreta, Wastewater Sludge, and biosolids Management (2008)

Tendo em vista a alta prevalência de patógenos nesses resíduos, o estabelecimento de barreiras sanitárias para proteger a saúde humana quando da adoção da prática de aplicação de lodos em solos agrícolas é fundamental.

O entendimento da natureza dos patógenos e como impactam a saúde humana e dos sistemas e processos de tratamento para redução de patógenos em excretas e lodos de esgoto devem ser consolidados. A USEPA (Agência de Proteção Ambiental Americana) desde os anos 1970 se preocupa com essas questões e desenvolvem métodos de análise, e que foram efetivamente utilizados por diversos países, climas e situações ao longo de décadas. (USEPA 2007)

Há um número restrito de informações de como os patogênicos se transportam do solo para fontes de água e de como eles se comportam no solo após aplicação de lodo no solo. Gerba e Smith, (2005), encontraram concentrações elevadas de organismos como *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli*, *Giardia*, *Cryptosporidium* e vírus, presentes em amostras de lodo. Na Inglaterra, Jones (1999), relatou um grande surto causado por *E.coli* 0157 cuja hipótese é o consumo de alimento contaminado em decorrência da aplicação de lodo no solo. Riscos a saúde

humana foram relatados por Servais et al (2007), como resultado do escoamento superficial em áreas que foram condicionadas com lodo de esgoto, carreando patógenos para fontes de água. Goss e Richards (2008) detectaram a presença de patógenos em amostras de água do mar. Tal fato foi associado a descargas e aplicação de lodo nas proximidades.

Na Colômbia, foi realizada pesquisa sobre a qualidade microbiológica e parasitológica em solo com adição de lodos de esgoto para cultivo de pastagem de azevém. As amostragens foram realizadas após 6, 16 e 22 meses da aplicação do lodo. Os resultados mostraram que somente após dois anos os valores de coliformes termotolerantes e fagos somáticos foram próximos ao esperado para o lodo classe A baseado nos padrões da USEPA.

A ocorrência de patógenos em amostras de lodo configura-se em fator de risco para a saúde de indivíduos expostos a esses resíduos, porém cada organismo patogênico exibe diferentes doses infectantes, o que determina sua relevância e impacto na saúde humana.

A tabela 4 mostra as doses infectantes de alguns microrganismos patogênicos que podem estar presentes em lodos de esgoto.

Tabela 4: Doses infectantes de alguns microrganismos patogênicos.

Microrganismo	Dose Infectante
<i>E. coli</i> enteropatogênica	$10^6 - 10^{10}$ UFC
<i>Salmonella typhi</i>	$10^4 - 10^7$ UFC
<i>Vibrio cholerae</i>	$10^3 - 10^7$ UFC
<i>Shigella flexneri</i> 2A	180 UFC
<i>Entamoeba histolytica</i>	20 cistos
<i>Shigella dysenteriae</i>	10 UFC
<i>Giardia lamblia</i>	< 10 cistos
Vírus	1 – 10 UFP
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1 – 10 ovos

Fonte: USEPA 2003

Observando-se a tabela 4, pode-se verificar que protozoários patogênicos, vírus e acaris apresentam-se mais infectantes que as bactérias.

2.3. Legislação referente à utilização de Lodos de Esgotos

No Brasil, os critérios de qualidade do lodo de esgoto e procedimentos para aplicação em solo agrícola foram estabelecidos pela Resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) nº. 375 de 29 de agosto de 2006, em que se avalia o potencial agrônômico do lodo, a presença de substâncias inorgânicas e orgânicas potencialmente tóxicas, indicadores bacteriológicos e agentes patogênicos e estabilidade (BRASIL, 2006).

Os critérios estabelecidos nessa Resolução foram baseados em padrões de países desenvolvidos e valores guias da Organização Mundial da Saúde uma vez que os dados nacionais sobre a caracterização dos lodos gerados pelas estações de tratamento de esgotos ainda são escassos. O § 5º do artigo 7º dessa Resolução especifica a caracterização do lodo de esgoto ou produto derivado quanto à presença de agentes patogênicos e indicadores bacteriológicos; em seu artigo 11, a referida Resolução, classifica os lodos de esgoto ou produtos derivados quanto à presença de agentes patogênicos em duas classes: Lodo classe A e Classe B. A Tabela 5 mostra os microorganismos considerados pela legislação e seus limites permitidos nos dois tipos de lodos.

Tabela 5: Limites máximos permitidos de microrganismos pela Resolução CONAMA 375/2006 em lodo de esgoto.

Indicador	Lodo Classe A	Lodo Classe B
Coliformes Termotolerantes	≤ 1000 UFP/gST	≤ 1000000 UFP/gST
<i>Salmonella</i>	Ausência em 10 g ST	Não aplicável
Ovos Viáveis de Helmintos	$\leq 0,25$ ovos/gST	≤ 10 ovos/gST
Vírus Entéricos e Enterovírus	$\leq 0,25$ UFP/gST	Não aplicável

Fonte:Brasil 2006.

Em seu anexo II, a Resolução CONAMA 375/2006 apresenta os critérios para as análises de lodo de esgoto ou produto derivado, determinando que os vírus

entéricos a serem pesquisados preferencialmente são: Adenovírus e vírus do gênero *Enterovírus* (poliovírus, echovírus e coxsackievírus) (Brasil, 2006).

A legislação americana também limita enterovírus no lodo para a aplicação no solo, é a Part 503, pathogen density limits adapted from U.S. EPA (1993), como mostra a tabela 6.

Tabela 6: Limites máximos permitidos de microrganismos pela USEPA (1993) em lodos de esgoto.

Indicador e Classe	Limite padrão (matéria seca)
Classe A	
<i>Salmonella</i>	< 3 UFC/4g de sólidos totais
Coliformes fecais	< 1.000 UFC/g
Vírus Entéricos	< 1 UFP/4g de sólidos totais
Ovos Viáveis de Helminto	1 UFP/4g de sólidos totais
Classe B	
Coliformes fecais	< 2.000.000 UFC/g sólidos totais

Segundo a USEPA 2007, como a qualidade é menos restritiva para o lodo classe B comparado ao lodo classe A, há restrições referentes à sua aplicação. Por exemplo, o público deve ser mantido afastado da área de aplicação por no mínimo 30 dias a partir da data de aplicação. Quanto ao lodo classe A, essa regra não se aplica.

Em outros países a regulamentação também existe, no México desde 2002, a norma NOM-004-2002-SEMARNAT estabelece diretrizes para a qualidade do lodo. Esta norma promove a utilização do lodo tratado ou sua disposição em áreas controladas. O Programa Nacional de Gestão Integrada de Lodos e Resíduos Sólidos estabelece meta para reutilização de pelo menos 5% de lodo gerado para fins agrícolas, como condicionador de solo ou para o controle da erosão (SEMARNAT, 2008). Isto não só implica na necessidade de infraestrutura para o tratamento do lodo, mas também de gestão para garantir a revalorização adequada. Considerando as características biológicas de lodo (lodo tratado como definido na norma mexicana), a NOM-004-SEMARNAT-2002 define três tipos de classes desses biossólidos: A, B e C. A tabela 7 mostra as concentrações de indicadores de poluição fecal e patógenos

constantes na legislação mexicana utilizada para a classificação de lodos de esgoto (México 2002).

Tabela 7: Valores máximos permitidos de microrganismos para a classificação de lodos de esgotos de acordo com a legislação mexicana de 2002.

Classe	Indicador de Poluição fecal	Patógenos	Parasitas
	Coliformes Fecais NMP/gST	<i>Salmonella</i> NMP/gST	Ovos de Helmintos Ovos/gST
A	1000	3	1
B	1000	3	10
C	2×10^6	300	35

No Chile, a Norma decreto 4 de 30/01/2009, em seu Título IV – Da aplicação de Lodo no solo – dispõe sobre as formas, quantidades e períodos em que o lodo pode ser aplicado no solo dependendo de sua classe (A ou B); dispõe sobre quantidade de metais e patógenos que podem estar presentes, mas não legisla sobre a quantidade de enterovírus, eles sequer são mencionados. Nesse país, a classificação de lodos e requisitos de qualidade microbiológica e parasitológica segue os padrões determinados pela legislação americana, com exceção de que a presença de vírus entéricos não é considerada (Chile 2010).

Na Colômbia, o Ministério de Meio Ambiente e Desenvolvimento Territorial tem trabalhado em uma norma de qualidade e disposição de lodos. Atualmente existe uma proposta para a norma, mas ainda não foi sancionada a qual é baseada na norma EPA (40 CFR Part 503) de 1999, cuja classificação dos lodos se dá em classes A ou B dependendo da qualidade microbiológica (coliformes fecais, vírus entéricos e ovos de helmintos) bem como a concentração de metais pesados.

Na China, a qualidade do lodo é regulamentada mediante o documento intitulado “Esgotos e Disposição de Lodo de Estações de Tratamento de Esgotos Municipais ”(Padrão Ministerial CJ3025 n-93), que foi substituído pelo "Padrão de Descarga de Poluentes Municipal da China "(Padrão Ministerial No. GB18918-2002). Essa diretiva estabelece que o lodo seja desidratado para alcançar teor de

umidade inferior a 80% e que seja estabilizado. Em 29 de janeiro de 2007, uma nova regulamentação "Lodos: Característica Municipais de Esgotos - Planta de Tratamento "(Padrão Ministerial No. CJ247-2007) foi emitida e impõe limites de poluentes no lodo de esgoto. Em 29 de janeiro de 2007, o Ministério chinês da Construção lançou um novo padrão de "classificação das Tecnologias de Disposição de lodo "(Padrão Ministerial No. CJ/T239-2007). As formas de eliminação do lodo importantes na nova norma são classificadas em quatro tipos: solo; aterros sanitários, produção de materiais utilizáveis e incineração.

Em Portugal, de acordo com o Decreto-lei 118/2006 (publicado em junho de 2006), a aplicação do lodo deve ser realizada três semanas antes do plantio de pastagens e culturas forrageiras e dez meses para frutas e produtos hortícolas em contato direto com o solo e consumidas cruas. (EU, 1986)

2.4 Vírus entéricos

Os vírus associados às doenças de veiculação hídrica são essencialmente aqueles que infectam o trato gastrointestinal e são excretados nas fezes dos indivíduos infectados, mesmo que assintomáticos, sendo denominados de vírus *entéricos* (Schwartzbrod 2000; Wyn-Jones, 2001; WHO, 2004). Carter (2005) inclui dentre os vírus entéricos de maior relevância na transmissão hídrica e por alimentos os adenovírus humanos, os astrovírus, os calicivírus, o vírus da hepatite E, os parvovírus, os picornavírus (enterovírus, cobuvírus e vírus da hepatite A) e os rotavírus.

Os vírus têm especial importância por possuírem uma dose mínima infectante baixa e uma alta patogenicidade para humanos e animais causando infecções graves. São capazes de resistir por longos períodos no solo até contaminarem um novo hospedeiro (Schwartzbrod 2000; USEPA, 2003).

A contaminação das águas superficiais e subterrâneas por vírus entéricos tem sido uma preocupação constante das autoridades sanitárias e de proteção ambiental, e

tem recebido atenção especial devido ao risco que estes microrganismos representam a saúde pública. Existem cerca de 100 tipos diferentes de vírus entéricos, todos considerados patogênicos para o homem. Esses enterovírus patogênicos são excretados por pessoas infectadas por longos períodos, atingindo o número de 10^{10} de partículas infecciosas por grama de fezes por longos períodos e podem sobreviver por meses no ambiente (Leclerc et al 2002; Tavares et al 2004; Skrabber et al 2009).

Essa capacidade de sobrevivência põe em risco a possibilidade de aplicação do lodo no solo, uma vez que os *Enterovirus* podem contaminar as águas subterrâneas, embora essa contaminação dependa de muitos fatores como a porosidade do solo, efeitos da filtração, processos de adesão, predação entre outros.

Os vírus apresentam maior resistência ao tratamento de esgoto e ao tratamento do lodo que os indicadores bacterianos de contaminação fecal usualmente utilizados para a avaliação da qualidade, e isso coloca em dúvida a qualidade virológica de uma amostra, pois a presença ou ausência desses indicadores não fornece indício da presença ou ausência de *Enterovirus*, resultando em efeitos adversos na saúde humana, pois causam graves doenças mesmo estando em concentrações baixas e a infecção pode ocorrer por ingestão, contato com as mucosas e inalação de aerossóis (Lee et al 2004; Rodríguez, Gundy e Gerba 2008; Husman et al 2009).

2.4.1 *Enterovirus*

Os vírus do gênero *Enterovirus* estão dentre os menores vírus conhecidos e seu genoma é composto por fita simples de RNA contido num cápsideo icosaédrico de 20 a 30nm de diâmetro, sem envelope. Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2004), o gênero *Enterovirus* compreende 69 sorotipos que infectam humanos dentre eles estão: poliovírus 1-3, coxsackievírus A1-A24 e B1-B6, echovírus 1-33 e os enterovírus denominados EV68 a EV73. De acordo com revisão realizada por Fong e Lipp (2005), até o ano de 2003 eram reconhecidos 89 sorotipos de enterovírus pelo Comitê Internacional sobre Taxonomia de Vírus. Os echovírus e os vírus

coxsackie constam da “*Contaminant Candidate List 2*” da Agência Ambiental Americana (USEPA 2003). Já em 2009 o Comitê Internacional sobre Taxonomia de Vírus (ICTV) classificou a taxonomia do *Enterovirus* da seguinte forma: Ordem – *Picornavirales*, família – *Picornaviridae*, gênero – *Enterovirus* com dez espécies, sendo elas: *Bovine enterovirus*, *Human enterovirus A*, *Human enterovirus B*, *Human enterovirus C*, *Human enterovirus D*, *Human rhinovirus A*, *Human rhinovirus B*, *Human rhinovirus C*, *Porcine enterovirus B* e *Simian enterovirus A* e nenhuma subespécie.

Os enterovírus são os agentes etiológicos mais comuns de infecção em humanos causando doenças de pouca gravidade (gastroenterite com febre baixa), mas também afecções graves, como miocardite, meningoencefalite e poliomielite, entre outras. Com frequência principalmente em crianças, as infecções são assintomáticas, mas nesses casos também ocorre a excreção de grandes quantidades dos vírus nas fezes. O contato pessoal e a inalação de partículas virais presentes no ar ou em secreções respiratórias são as rotas de transmissão predominantes (Lennette e Smith 1999).

2.4.2 Ocorrência de *Enterovirus* em lodos de esgoto

A qualidade sanitária do lodo está intrinsecamente relacionada com o perfil da saúde da população e as suas influências nas condições sanitárias variam conforme o organismo e as condições ambientais. Enquanto alguns destes patógenos não suportam o ambiente edáfico por mais de algumas horas outros, como enterovírus, podem permanecer por meses (Fong e Lipp 2005, Gerba e Smith, 2005)

Existem vários relatos na literatura sobre a ocorrência de enterovírus no ambiente (Shieg et al 2008; Fong e Lipp 2005; Wyn-Jones e Sellwood 2001; Rodríguez et al 2009). A concentração de enterovírus no esgoto bruto pode atingir 10^5 UFP (Unidade Formadora de Placa)/mL enquanto que a contagem de coliformes fecais é de cerca de 10^8 /100mL (Wyn-Jones e Sellwood 2001). A eliminação de vírus no ambiente não é constante ao longo do ano, pesquisas sobre a ocorrência de vírus coxsackie em águas superficiais demonstraram uma tendência sazonal com

densidades máximas na metade do verão, época na qual também ocorre maior número de relatos da doença (Sellwood 2000 *apud* Wyn-Jones e Sellwood 2001; WHO 2004; Monpoeho et al 2004).

A importância da presença dos vírus presentes no ambiente não está em sua quantidade, mas sim em seu grau de infectividade. A dose à qual cada indivíduo é exposto depende não só de sua quantidade no lodo, mas também da taxa de ingestão do lodo. A EPA assume que a ingestão de 200mg de solo por dia é o suficiente para causar infecções em 95% das crianças que sejam expostas a este solo.

Quantidades de vírus suficientes para serem detectados em culturas celulares já bastam para causar infecções graves no homem. O fato dos esgotos conterem concentrações significativas de vírus de alto grau de infectividade tornou-se objeto de estudos nas últimas décadas dentre os quais os estudos realizados por Ward 1982, Berg et al 1989, Gerba 2009. Esses estudos visam esclarecer a epidemiologia das viroses, fontes de infecção, obter informações sobre sua sobrevivência no ambiente e resistência aos processos de tratamento de água e esgoto. A quantidade de vírus encontrada no ambiente pode variar consideravelmente devido a fatores como quantidade de vírus excretados pela população; volume e tipo de despejos nos corpos d'água; diluição e sazonalidade (Lewis et al 2002; Soule et al 2000).

A capacidade de sobrevivência dos enterovírus no ambiente depende de fatores como temperatura, carga orgânica, atividade microbiológica, capacidade de adsorção a partículas de sólidos. Normalmente, quanto menor a temperatura, maior a capacidade dos enterovírus sobreviverem no ambiente. Abaixo de 5°C sua capacidade de sobrevivência pode se estender por anos (Wyn-Jones e Sellwood 2001).

Eisenberg et al (2004) verificaram que os enterovirus podem sobreviver no solo de cinco a seis dias a cada aplicação de lodo, dependendo das condições ambientais, como temperatura. A taxa de redução observada foi de 0,08 a 0,02 log por dia dependendo das variações ambientais.

Os enterovírus podem ser utilizados na avaliação da eficiência dos processos de tratamento do lodo, pois são mais resistentes que as bactérias a determinados tipos de tratamento (Wyn-Jones e Sellwood 2001).

Partículas virais podem ser carregadas e concentradas no lodo durante o tratamento. Números similares de adenovírus e poliovírus foram encontrados em várias matrizes de esgoto e lodo, por isso é possível assumir que o número de enterovírus encontrados no lodo deve ser igual, senão maior, do que o encontrado no esgoto. A sobrevivência e inativação dos enterovírus em lodo são diferentes se comparados com o esgoto, uma vez que eles se agregam e são adsorvidas aos sólidos (Boffil – Mas et al 2006).

Guzmán et al (2007) analisaram 4 tipos de lodos (antes e após tratamento) para vários tipos de indicadores de qualidade sanitária de lodo, incluindo os enterovírus. Utilizaram o método do cloreto de alumínio seguido de inoculação em células, sugerido pela EPA 2003. Ao final do estudo, os resultados obtidos revelaram que a concentração de enterovírus foi de aproximadamente 10^3 UFP /10g de matéria seca analisada.

Nos Estados Unidos, Zaleski et al (2005), analisaram amostras de lodo classificados como lodo classe A cujo tratamento foi realizado em leitos de secagem. Usaram o método de cultura de células para detecção e quantificação de enterovírus. Não foram isolados enterovírus nas amostras analisadas mesmo naquelas com curta permanência nos leitos.

2.5 Métodos de detecção e quantificação de vírus entéricos em amostras

O princípio da detecção de vírus entéricos em culturas celulares é o método clássico e de referência para análise desses microrganismos, e se baseia no fato de que certos vírus podem se multiplicar em culturas celulares “*in vitro*” e que essa multiplicação pode ser visualizada. Essa visualização pode ser direta, pela aparição

de um efeito citopático (ECP), o que ocorre, por exemplo, com poliovírus, coxsackievirus, echovírus e adenovírus. O isolamento em monocamada celular é realizado em duas etapas principais: inoculação e adsorção dos vírus sobre as células e a seguir incubação em presença de meios líquidos ou gelificados.

Diversos tipos de células animais tais como as de embriões e de adultos têm sido cultivadas “*in vitro*” por períodos variáveis, possibilitando o seu estudo sob várias condições. As culturas celulares passaram a ter papel importante no diagnóstico das viroses a partir de 1948, quando Weller e Robbins demonstraram que o poliovírus tipo 2 foi capaz de se replicar em cultura de tecidos de origem nervosa de embriões humanos, determinando um efeito citopático, facilmente observável nas culturas infectadas

A partir desta época, grandes variedades de linhagens humanas e animais, neoplásicas ou não vem sendo largamente utilizadas em diagnósticos virais. Os sistemas celulares são amplamente empregados, pois requerem pouco espaço físico, proporcionam o isolamento de vírus, preparos de antígenos virais, testes específicos tais como os de neutralização, hemadsorção, anticorpos fluorescentes e cultivo conjunto. Além disso, são convenientes para a produção de vacinas por fornecerem preparações com elevadas concentrações virais relativamente isentas de interferentes.

Algumas linhagens celulares não apresentam a mesma sensibilidade das culturas primárias ao crescimento de certos vírus, mas se prestam ao isolamento de enterovírus, adenovírus e vírus respiratório sincicial. Outros vírus em que não há a possibilidade de serem isolados diretamente podem ser adaptados ao crescimento nessas linhagens para serem submetidos posteriormente a testes capazes de identificá-los

Para alguns vírus que não produzem ECP, ou para os quais as linhagens celulares são pouco sensíveis (adenovírus sorotipo 40 e 41 e vírus da hepatite A) a detecção é realizada indiretamente, seja por meio de uma técnica imunológica “*in situ*” ou por técnicas moleculares. Previamente, para a inoculação em culturas

celulares é necessário concentrar a amostra, que pode ser realizado por filtração em cartuchos (filtros de profundidade) ou membranas e por floculação orgânica. A escolha do modo de concentração depende do volume e tipo de amostra a ser concentrada. Após filtração ou floculação, que resulta ainda em volumes relativamente grandes, é necessária uma concentração secundária (ou reconcentração), que pode ser realizada por floculação orgânica, precipitação com polietilenoglicol, ou ultracentrifugação (Schwartzbrod 2000).

Após a extração e concentração, segue-se uma etapa de descontaminação e eventualmente de detoxificação, durante a qual o extrato obtido é tratado de forma que sejam eliminados fungos, bactérias e na medida do possível substâncias tóxicas. Com esse objetivo, adicionam-se de antibióticos à amostra concentrada ou, alternativamente, realiza-se um tratamento com clorofórmio ou filtração por membranas de porosidade de 0,22 μ m (Schwartzbrod 2000).

Na etapa final de detecção viral, a amostra é inoculada em cultura de células, em meio gelificado contendo vermelho neutro (corante vital). Nesse meio, as células normais apresentam uma coloração rosada devido à incorporação do corante vital. As partículas virais ao infectarem as células normais, se replicam e propagam-se para as células vizinhas. As células infectadas perdem a capacidade de absorção do corante e aparecem como regiões circulares incolores ou “placas”, que se destacam das demais células que estão coradas pelo vermelho neutro. O fato de uma placa poder ser produzida originalmente por uma única partícula infectante, ou vírion, torna esse método altamente quantitativo, permitindo calcular o número de unidades virais a partir do número de placas formadas no ágar (USEPA, 2003).

Os vírus também podem ser detectados e identificados por técnicas imunológicas, sendo bastante utilizada a soro-neutralização, microscopia de imunofluorescência e ELISA (“enzyme linked immuno assay”).

2.5.1 Reação de cadeia da Polimerase – PCR

A utilização de técnicas moleculares, principalmente RT-PCR (reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa) resultaram na obtenção de uma grande quantidade de informações na área de virologia ambiental (WYN-JONES, 2001), permitindo a detecção de vírus com crescimento inadequado ou nenhum crescimento em culturas celulares. Entretanto, a grande desvantagem dessa técnica é a falta de informação sobre a infectividade dos vírus detectados. Para superar esse inconveniente vem sendo utilizada a integração dos dois métodos, ou seja, a reação em cadeia da polimerase integrada à cultura celular. As amostras concentradas são inoculadas previamente em cultura celular, o que permite a amplificação viral e em seguida submetidas ao ICC-PCR (Schwartzbrod 2000; Wyn-Jones e Sellwood 2001).

3. Objetivos

Os objetivos da presente pesquisa são:

1. Quantificar vírus do gênero *Enterovirus* no lodo de esgoto gerado em seis ETEs do Estado de São Paulo, utilizando-se o ensaio de plaqueamento em cultura de células RD (rabdomiosarcoma humano);
2. Avaliar o desempenho do método por meio de determinação das porcentagens de recuperação em amostras de lodo de esgoto artificialmente contaminadas;
3. Verificar atendimento aos padrões estabelecidos pela Resolução CONAMA 375/2006 relativos às concentrações de *Enterovirus* obtidas no presente estudo.

4. Método

4.1 Amostragem

As coletas foram realizadas em uma frequência bimestral no período de fevereiro a dezembro de 2009, em seis ETEs do Estado de São Paulo, sendo três na região metropolitana e três localizadas no interior do estado, perfazendo um total de 35 amostras.

As coletas foram realizadas no período da manhã, sendo que a amostra era retirada de um ponto inespecífico da pilha de lodo desaguado do pátio da estação de tratamento de esgoto. Nas estações que possuíam leiras, a coleta se deu pelo meio da leira e não nas bordas. Quando a estação possuía filtro prensa ou outro sistema de desaguamento mecânico, a coleta se efetuou na saída de lodo novo desaguado que ainda não havia sofrido influência das intempéries.

As amostras eram então acondicionadas em frascos plásticos com capacidade de 500 gramas com tampa de rosca, previamente autoclavados, cujo transporte até o laboratório se deu em caixas térmicas com gelo. As amostras foram armazenadas sob refrigeração a $\pm 8^{\circ}\text{C}$ e analisadas em até 24 horas após a coleta. A tabela 8 mostra os processos de tratamento utilizado nas diferentes ETE's.

Tabela 8: Processos de tratamento e características das Estações de Tratamento de Esgotos estudadas.

ETEs	Processo de tratamento		Q* Atual (L/s)	Lodo gerado (ton/dia)	Adição de insumos químicos		
	Fase líquida	Fase sólida			Cal	FeCl ₃	Polímero
1	Filtro biológico	Digestor, centrífuga e leito de secagem	110	7	não	não	sim
2	Lagoas Aeradas de Mistura Completa seguidas de Lagoas de Sedimentação.	Centrífuga e secagem ao ar em leiras com revolvimento	900	28	não	não	sim
3	Lodo ativado com aeração prolongada	Polímero catiônico e prensa desaguadora		10-12	não	não	sim
4	Lodo ativado convencional	Digestor e filtro prensa	7000	300	não	sim	sim
5	Lodo ativado convencional	Digestor e filtro prensa	750	37	sim	sim	não
6	Peneira rotativa, sem decantador primário Lodo ativado por alimentação escalonada e em nível secundário	Sem tratamento anaeróbio, flotadores seguidos de filtro prensa	2300	-	sim	sim	não

Fonte: Pesquisa de campo realizada junto às ETEs em janeiro de 2007; * Q = vazão de afluente

4.2 Detecção e quantificação de *Enterovirus*

As análises foram realizadas pelo método da eluição protéica seguida de floculação orgânica de acordo com USEPA (2003), metodologia esta, indicada pela resolução CONAMA 375 (Brasil, 2006).

Para detectar a presença de vírus entéricos em lodos de esgoto é necessário levar em consideração que eles podem estar adsorvidos aos sólidos de origem fecal e a outros materiais orgânicos que compõem a fase sólida do lodo. Entre os fatores que auxiliam a agregação dos vírus entéricos a materiais particulados figuram a natureza do material, o pH, a temperatura e a umidade.

Para promover a dissociação entre os sólidos e os vírus, a amostra de lodo é tratada com uma solução de extrato de carne 10% em pH ácido (3,5). Esta solução é então concentrada através do processo de floculação orgânica na qual o ajuste do pH e a centrifugação levam a obtenção de pequenos volumes de amostra possíveis de serem analisados.

Uma vez concentrada, o passo seguinte é a descontaminação da amostra e a retirada de substâncias tóxicas presentes no lodo que podem favorecer a lise das células, sendo necessário um tratamento prévio através da filtração do concentrado final com filtros eletropositivos de celulose e partículas inorgânicas, processo este que reduz os componentes tóxicos das amostras concentradas. Após este tratamento adicionam-se antibióticos específicos para eliminação das bactérias e fungos.

A partir desta etapa a amostra estará pronta para inoculação em culturas de células específicas para detecção dos *Enterovirus*.

4.2.1 Procedimentos para culturas de células RD

As células RD são células humanas de rabdomiosarcoma e são utilizadas no isolamento e quantificação de *Enterovirus* por apresentarem sensibilidade a infecções por esses vírus.

A formulação dos reagentes e meios de cultura constam do Anexo 1.

Os procedimentos de manutenção da linhagem celular RD encontram-se no Anexo 2.

4.2.1.1 Subcultivo das culturas e preparo para inoculação de amostras

Para a realização do subcultivo das células, as garrafas com três dias de incubação foram retiradas da incubadora e verificadas se as células estavam íntegras, confluentes e em sua forma de fibroblasto mediante o uso de microscópio óptico de fase invertida. Após a verificação, foram descartados os meios presentes na célula e acrescentada solução tampão fosfato (PBS) pH 7,4, para lavagem da monocamada nos seguintes volumes conforme o tamanho da garrafa de cultura utilizado: $25\text{ cm}^2 = 2,0\text{ mL}$; $75\text{ cm}^2 = 3,0\text{ mL}$ e $150\text{ cm}^2 = 5,0\text{ mL}$.

Esse procedimento foi repetido duas vezes e então adicionada à solução de ATV (Associação de Tripsina e Versene) que completa o descolamento das células da parede da garrafa. Para cada garrafa foi utilizado um volume correspondente: garrafa de $25\text{ cm}^2 = 1\text{ mL}$; $50\text{ cm}^2 = 1,5\text{ mL}$ e $75\text{ cm}^2 = 3\text{ mL}$.

A garrafa foi deixada em incubadora a $36,5^\circ\text{C}$, em repouso até que se verificasse o completo descolamento da monocamada.

As células foram então ressuspensas em meio de crescimento MEN 10% ($4,5\text{ mL}$ para frascos de 25 cm^2) para interromper a ação da tripsina. Homogeneizou-se suavemente a garrafa várias vezes evitando a formação de espuma, transferindo-se

aspticamente 0,1mL da suspensão celular a um tubo de Eppendorf de 0,5mL contendo em seu interior 0,1 mL de solução azul de tripan 0,1%. Os conteúdos foram homogeneizados e deixados em repouso por 3 minutos. Uma alíquota de 700µL foi retirada para preencher a câmara de contagem. O líquido deve preencher apenas um lado da câmara e não deve chegar aos canais de cada lado da área de contagem, deixando-se as células sedimentarem por aproximadamente 1 minuto e efetuando-se a contagem nas quatro áreas de um lado da câmara de Newbauer e o valor dividido por 4 para se obter a média, de acordo com a ilustração da figura 1.

Figura 1: Câmara utilizada para contagem das células

A concentração de células é dada a partir da fórmula 1.

Fórmula 1:

$$C_1 = t \times tb \times \frac{1}{4} \times 10^4$$

Em que:

C_1 = Concentração inicial de células por mL

t = Total de células viáveis (soma dos quatro quadrantes)

tb = Fator de diluição do corante azul de tripan

Para o cálculo da concentração de células viáveis por mL usou-se a seguinte fórmula 2:

Fórmula 2

$$d = C_2 / C_1$$

Em que:

C_1 = Concentração inicial de células;

C_2 = Concentração esperada de células.

No caso em que a concentração observada esteve abaixo ou acima da concentração de 10^6 células /mL, efetuou-se a diluição ou concentração da suspensão celular.

Volumes de 1mL da suspensão de células foram transferidos para três garrafas de cultura e adicionados 19mL de meio MEM EAGLE de concentração dupla e incubadas a $36,5^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$. Foram feitas leituras diárias e após 72 horas o meio de crescimento foi descartado e substituído pelo meio de manutenção. O procedimento de subcultivo era repetido a cada três dias.

4.3 Concentração e Floculação da Amostra

Foi pesada uma quantidade de amostra de lodo de esgoto equivalente a 12g de sólidos totais presentes na amostra. Para a pesagem dessa quantidade, é necessário conhecer-se o teor estimado de sólidos totais (esse valor foi fornecido por cada ETE estudada). Aplica-se então a seguinte fórmula 3.

Fórmula 3:

$$X = \frac{12g \times 100}{T}$$

Em que:

X = massa de amostra a ser pesada

T = teor estimado de sólidos totais em porcentagem (valor fornecido pelo operador da ETE).

Após a pesagem, as amostras foram trituradas em um almofariz até tornarem-se homogêneas e em seguida transferidas para copos de béquer de 250mL onde foram adicionados 100mL de extrato de carne a 10% acrescido de ácido cítrico e fosfato de sódio hepta-hidratado. Depois promoveu-se homogeneização por 30 minutos e então efetuou-se a transferência do copo de béquer para tubos cônicos, os quais foram submetidos ao processo de centrifugação 10.000xg por 30 minutos. O volume do sobrenadante obtido foi medido e diluído na proporção 1:3:3 com água ultrapura de forma a obter uma concentração de 3% do extrato de carne utilizando a seguinte fórmula 4:

Fórmula 4:

$$\text{Vol. final de água ultrapura} = \frac{\text{Vol. do sobrenadante} \times 10}{3}$$

Após a diluição, ajustou-se o pH para 3,0 – 3,5 com ácido sulfúrico 6N, para se realizar a floculação das amostras e homogeneizou-se por 30 minutos. Após completa homogeneização os conteúdos dos copos de béquer foram transferidos para tubos cônicos de centrífuga e então submetidos ao processo de centrifugação por 30 minutos a 2500xg para a sua concentração. Após a centrifugação os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos obtidos ressuspensos com solução tampão fosfato

de sódio 0,15M pH 9,0 e homogeneizado por 15 minutos após ajuste do valor de pH para 7,0 – 7,5.

Para redução do efeito citotóxico, efetuou-se a filtração das amostras em filtro de carga positiva (Zeta-Plus 60s) de 47mm de diâmetro, tratadas com soro fetal bovino 10% e meio de MEM 2x concentrado, e adicionou-se às amostras, já filtradas, 300µL solução de sulfato de gentamicina 10mg/mL. Para avaliação da esterilidade um volume de 9 mL de caldo triptona e soja contendo 300 µL da amostra foi incubado a uma temperatura de $36 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por sete dias. Como não houve indicativo da presença de fungos e bactérias, o ensaio de plaqueamento foi realizado.

4.3.1 Semeadura experimental

Para cada amostra floculada e concentrada, uma amostra foi semeada experimentalmente: uma amostra de lodo é submetida aos mesmos processos de floculação/concentração e descontaminação descritos acima, com uma única diferença, na etapa da adição do extrato de carne 10% também se adicionou 1 mL de uma suspensão viral contendo o vírus Pólio 1 Sabin em concentração conhecida de 400 unidades formadoras de placa. Essa amostra é utilizada como controle de recuperação e controle de qualidade do método.

A suspensão de Pólio 1 Sabin, foi preparada da seguinte forma: descongelou-se uma suspensão viral “pura” (cedida gentilmente pelo Instituto Oswaldo Cruz - RJ) que foi então diluída em meio de Hank's (10^{-1} a 10^{-9}). Após a diluição, alíquotas de 1 mL eram inoculadas em culturas de células RD usando-se o mesmo ensaio de plaqueamento das amostras. Após a inoculação incubou-se as garrafas em $36^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e após 24 horas a primeira leitura foi realizada utilizando-se microscópio de fase invertida.

Após a leitura e contagem das placas, a diluição que apresentasse aproximadamente 400 UFP era então utilizada na semeadura. A diluição que mais se aproximou foi a 10^{-5} .

4.4 Ensaio de Plaqueamento em Cultura de Células RD

O método utilizado foi o plaqueamento direto. A técnica se utiliza de meio de cultura sólido para o crescimento celular seguido da fixação dos vírus infecciosos na monocamada da cultura de células, onde as placas de lise, desenvolvidas após alguns dias da infecção viral, tornam-se visíveis. O número de placas de lise são contadas e anotadas na forma de unidades formadoras de placas, cujo número é proporcional à quantidade de vírus infecciosos inoculados.

4.4.1 Procedimento para a inoculação das Amostras.

Culturas de células RD usadas para análises de vírus devem estar entre o terceiro e o sexto dia depois de realizada uma nova passagem da cultura celular.

O volume inoculado de amostras variou de acordo com o tamanho da garrafa utilizada; para garrafas de 25 cm³ – 0,5 mL de amostra; para as de 75 cm³ – 1,0 mL de amostra.

Antes da inoculação, descartou-se o meio de manutenção celular e lavaram-se as células com PBS, foram identificadas as garrafas com o número da amostra e os controles negativos e positivos e mantiveram-se as culturas a essa temperatura até que a inoculação tivesse ocorrido.

Cada amostra foi dividida em um número suficiente de culturas RD para garantir que o volume inoculado não seja maior que o suportado pela garrafa. Para cada garrafa usou-se uma pipeta esterilizada que logo após era descartada. Os controles foram inoculados sempre antes ou depois da inoculação das amostras, nunca ao mesmo tempo, e o negativo sempre em primeiro lugar. As garrafas foram colocadas em superfícies estáveis em temperatura ambiente (22 – 25°C) até toda a inoculação estar terminada.

As garrafas com as culturas inoculadas foram incubadas a temperatura ambiente por 80 minutos para permitir que os vírus infectem as células e agitadas cuidadosamente em intervalos de 20 minutos.

4.4.2 Procedimento para cobertura das culturas inoculadas com ágar.

Passado o tempo de incubação (80 minutos), adicionou-se um volume de ágar aquecido, estabilizado a 42-46°C, suficiente para cobrir a superfície celular.

A cobertura com ágar ocorreu dentro da câmara de fluxo laminar e rapidamente para evitar a sua solidificação.

As garrafas inoculadas foram colocadas em uma superfície estacionária com temperatura ambiente (22-25°C) até que todo o procedimento fosse terminado. As garrafas foram cobertas com papel para impedir a passagem da luz durante a solidificação. Depois de 30 minutos, as garrafas foram invertidas e incubadas em ambiente escuro a $36,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por 21 dias e foram realizadas leituras diárias.

4.4.3 Leitura

A contagem foi realizada a olho nu e as placas de lise evidenciadas nas garrafas de cultura foram anotadas nos dias um, dois, três e quatro, dia a dia. A leitura das garrafas de cultura continuou nos dias seis, oito, doze e dezesseis e caso mais placas de lise aparecessem também eram anotadas. As culturas inoculadas devem sempre ser comparadas com culturas não inoculadas (controle negativo), para se assegurar que as placas não são causadas pela deterioração das células.

4.5 Cálculo dos Resultados

4.5.1 Concentração de *Enterovirus* na amostra concentrada e na amostra semeada.

Abaixo seguem os procedimentos utilizados para o cálculo da concentração de *Enterovirus* nas amostras analisadas.

Calculou-se o peso seco efetivamente analisado, utilizando agora o teor determinado de sólidos totais na amostra.

As placas de lise obtidas em todas as garrafas foram então somadas e calculou-se o resultado pelo volume total de amostra concentrada inoculado, sendo efetuada a correção necessária devido ao volume utilizado para o teste de esterilidade.

Em seguida, calculou-se o número de Unidades Formadoras de Placa por grama de sólidos totais (UFP/g ST) utilizando a seguinte fórmula 5:

Fórmula 5:

$$\text{UFP/gST} = \frac{\sum \text{placas}}{\text{gST}}$$

Em que:

gST = sólidos totais em gramas efetivamente analisado.

4.5.2 Cálculo das porcentagens de recuperação

Inicialmente, calculou-se o número de Unidades Formadoras de Placa de poliovírus 1 Sabin efetivamente inoculadas levando-se em consideração o volume de amostra retirado para realização do teste de esterilidade.

Calculou-se então a porcentagem de recuperação por meio da seguinte fórmula 6:

Fórmula 6:

$$\% R = \frac{(UFP_{\text{semeadura experimental}} - UFP_{\text{branco}})}{\text{nº de UFP inoculadas}} \times 100$$

Em que:

% R = Porcentagem de recuperação;

$UFP_{\text{semeadura experimental}}$ = Unidades formadoras de placa contadas na amostra contaminada artificialmente:

UFP_{branco} = Unidades formadoras de placa contadas na amostra;

UFP^* = Unidades formadoras de placa inoculadas.

Os resultados são expressos em: UFP/gST.

5 Resultados

Nesta pesquisa foram coletadas amostras de lodo de esgoto de seis diferentes estações de tratamento de esgoto do estado de São Paulo, com potencial uso na agricultura. Essas estações possuem diferentes tipos de tratamentos de esgoto e diferentes tipos de tratamento dado ao lodo no final do processo.

5.1 Quantificação de vírus

Enterovírus estiveram presentes em 29 (83%) das amostras analisadas, com concentrações que variaram de não detectado (ND) a 12,50 UFP/gST. A tabela 9 mostra as concentrações de *Enterovirus* nas amostras de todas as ETEs estudadas. A figura 2 mostra a porcentagem de amostras positivas e negativas para a ocorrência de *Enterovirus* nas amostras de lodo de esgoto das ETEs estudadas e ainda na figura 3 podem ser observados os intervalos de concentração para as amostras positivas.

Tabela 9: Concentração de *Enterovirus* nas amostras de lodo nas diferentes ETE's avaliadas.

ETE	Data da Coleta	Concentração de enterovírus (UFP/gST)
1	2/fev	0,1
	8/abr	1,4
	9/jun	0,7
	10/ago	0,3
	5/out	<0,3
	8/dez	2,4
2	10/fev	3,0
	8/abr	0,5
	9/jun	0,6
	10/ago	<0,2
	5/out	0,1
	8/dez	<0,1
3	10/fev	0,7
	8/abr	7,9
	9/jun	0,6
	5/out	12,1
	8/dez	12,5

4	16/fev	3,7
	28/abr	2,1
	24/jun	4,3
	24/ago	0,2
	27/out	5,6
	30/nov	3,4
5	23/mar	<0,2
	6/abr	1,1
	22/jun	2,5
	24/ago	0,8
	28/set	<0,2
	14/dez	<0,1
6	23/mar	2,7
	6/abr	1,2
	17/jun	0,2
	17/ago	5,8
	4/nov	0,3
	14/dez	0,2

Figura 2: Porcentagem das amostras positivas e negativas para a ocorrência de *Enterovirus* nas amostras de lodo de esgoto examinadas.

Figura 3: Intervalo da concentração de *Enterovirus* observadas nas amostras positivas.

A figura 3 mostra que 23% das amostras analisadas para *Enterovirus* em lodo de esgoto apresentou intervalo de >0,25 – 0,9 UFP/gST, enquanto 31% apresentou intervalo na faixa de 1,0 – 4,9 UFP/gST, 9% na faixa de 5,0 - 10,00 UFP/gST e apenas 6% apresentou intervalo > 10,00 UFP/gST.

O intervalo destacado do gráfico (figura 3) apresenta concentração de enterovírus < 0,25 UFP/gST, representando 31% das amostras examinadas, as quais estão de acordo com a resolução CONAMA 375/2006, que exige uma concentração < 0,25 UFP/gST de enterovírus no lodo de esgoto para a sua aplicação na agricultura.

Os valores máximos e mínimos de concentração de enterovírus encontradas nas amostras examinadas variariam conforme a ETE, os quais são apresentados, juntamente com as médias aritméticas, na tabela 10.

Tabela 10: Valores médios (média aritmética), máximos e mínimos da concentração de *Enterovirus* em amostras de lodo de esgoto (UFP/gST) por ETE.

ETE	Concentração (UFP/gST)		
	média	máxima	mínima
1	0,80	2,40	<0,3
2	0,70	3,00	<0,1
3	6,76	12,50	0,60
4	3,22	5,60	0,20
5	0,7	2,50	<0,1
6	1,73	5,80	0,20

A ETE 3 apresentou média de concentração de *Enterovirus* de 6,76 UFP/gST, sendo esta a maior média encontrada entre as ETEs, seguida pela ETE 4 com média de 3,22 UFP/gST. Esse resultado pode estar relacionado com o fato de que a ETE 3 recebe, predominantemente esgoto sanitário e que o tratamento dado ao lodo nesta ETE se dá pela adição de polímero e prensa desaguadora.

O tratamento dado ao lodo na ETE 4 é adição de cloreto férrico e polímero seguido de digestor anaeróbio e filtro prensa. As ETEs 1, 2 e 5 mostraram as médias de concentrações abaixo de 1,0 UFP/gST. Estas ETEs além de esgoto sanitário recebem efluentes industriais para realização de tratamento. Essa característica pode estar relacionada com os valores de concentração de *Enterovirus* obtidos, pois a presença de interferentes podem ter ocasionado dificuldades na detecção das partículas virais.

O tratamento dado ao lodo na ETE 1 é a adição de polímero e seguido de digestor anaeróbio, centrífuga e leito de secagem, já o lodo gerado na ETE 2 recebe a adição de polímero, seguido de centrífuga e secagem ao ar com leiras de revolvimento, e a ETE 5 adição de cal e cloreto férrico seguido de digestor e filtro prensa.

A ETE 6 manteve uma média de 1,73 UFP/gST e trata o lodo com adição de cal e cloreto férrico seguido de filtro prensa. Guzmán et al. (2007), pesquisaram *Enterovirus* em amostras de lodo de esgoto, tanto em lodo bruto como em lodos tratados por diferentes tipos de tratamento. Encontraram concentrações médias de $6,0 \times 10^2$ UFP/10g/ST nas amostras de lodo bruto, de $3,5 \times 10^1$ UFP/10g/ST nas de lodo tratado por digestão anaeróbia seguido de desaguamento e de $2,7 \times 10^1$ UFP/10g/ST nas amostras submetidas ao processo de desaguamento. Nas amostras submetidas ao processo de compostagem não detectou a presença desses organismos.

5.2 Desempenho do método

Um dos objetivos deste trabalho foi o de verificar o desempenho do método utilizado na quantificação de *Enterovirus*.

O método utilizado recomenda que se utilize uma quantidade de lodo equivalente a 12 gramas de sólidos totais. No entanto, neste trabalho se utilizou as 12 gramas recomendadas em 29 amostras e em 6 amostras utilizou-se uma quantidade de lodo equivalente a 4 gramas de sólidos totais, no intuito de se comparar o desempenho do método e de se verificar se haveria diferença nas faixas de recuperação. As tabelas 11 e 12 mostram as taxas de recuperação de *Enterovirus* nas amostras para porções de 12 e 4 gramas de sólidos totais.

Tabela 11: Taxa de recuperação obtida nas sementeiras utilizando-se 12 gramas de ST.

ETE	Data da Coleta	Taxa de Recuperação (%)
1	02/fev	4,50
	08/abr	40,40
	09/jun	32,10
	10/ago	0,20
	05/out	1,00
2	10/fev	17,10
	08/abr	68,50
	09/jun	2,70

	10/ago	0,60
	05/out	1,00
3	10/fev	2,50
	08/abr	9,30
	10/ago	16,80
	05/out	20,10
4	16/fev	37,60
	28/abr	9,80
	24/jun	1,20
	24/ago	16,70
	27/out	1,50
5	23/mar	10,10
	06/abr	7,00
	22/jun	5,00
	28/set	2,40
6	23/mar	8,90
	06/abr	20,80
	17/jun	5,70
	17/ago	8,00
	04/nov	4,30

Tabela 12: Taxa de recuperação obtida nas sementeiras utilizando-se 4 gramas de ST.

ETE	Data da Coleta	Taxa de Recuperação (%)
1	08/dez	45,90
2	08/dez	68,60
3	08/dez	49,20
4	30/nov	10,10
5	14/dez	15,00
6	14/dez	41,40

As médias das taxas de recuperação para a porção de 12 gramas de ST variam entre 9,54% (mínima) e 17,98% (máxima). A tabela 13 ilustra os valores médios e os desvios padrão das taxas de recuperação obtidas para cada ETE. Para a porção de 4 gramas avaliada, a média global foi de 38,37, pois neste caso apenas uma amostra de cada ETE estudada foi analisada.

Tabela 13: Médias e desvios padrão das taxas de recuperação obtidas utilizando semeaduras com amostras de 12 gramas.

ETE	Média Taxa de Recuperação (%)	Desvio Padrão (%)
1	15,64	19,11
2	17,98	29,06
3	12,18	7,88
4	13,36	15,00
5	6,13	3,25
6	9,54	6,55

6 Discussão

Os resultados obtidos nessa pesquisa mostraram que 83% das amostras apresentaram presença de enterovírus, exibindo concentração que variaram de não detectado a 12,50 UFP/gST. Resultados similares a este estudo foram encontrados por Viau e Peccia (2009) que obtiveram 88% de amostras positivas para adenovírus em amostras de lodo de esgoto. Já em estudo realizado por Pepper et al. (2010) a concentração média de vírus entéricos foi de 0,419 UFP/4g de lodo enquanto que a concentração média de adenovírus foi de 17,6 UFP/g seca de lodo. Em estudo realizado por Shanahan et al. (2010) para análise de *Enterovirus* em lodo de esgoto na Austrália, foram obtidas concentrações de 32 UFP/10gST nas amostras de lodo em fase de pré tratamento e de <0,1 UFP/10gST no lodo tratado. Guzmán et al. (2007) analisaram seis amostras de lodos que receberam diferentes tratamentos e obtiveram 100% de amostras positivas para enterovírus com concentração variando de $4,8 \times 10^2$ a $2,1 \times 10^3$ UFP/10g secas.

Os resultados obtidos revelaram que 31% das amostras analisadas estavam de acordo com a resolução CONAMA 375/2006, ficando abaixo da concentração exigida que é de <0,25UFP/gST, conforme ilustrado na figura 3. As ETEs 1, 2, 5 e 6, conforme a tabela 10, apresentaram amostras de lodo que não atenderam o estabelecido pela Resolução CONAMA 375/2006.

Nenhuma das amostras originadas da ETE 3 atenderam ao estabelecido pela Resolução CONAMA e ainda apresentaram concentrações de *Enterovirus* de 12,1 e de 12,5 UFP/gST, sendo estes os maiores valores encontrados ao longo do estudo. Esse resultado pode estar relacionado com o fato de que essa ETE recebe, predominantemente esgoto sanitário.

As ETEs 1, 2 e 5 mostraram as concentrações abaixo do limite teórico de detecção. Nas amostras examinadas na ETE 1, uma amostra (16,7%) apresentou valor abaixo de limite teórico de detecção. Na ETE 5, foram três amostras (50%) e duas amostras (33%) na ETE 2.

Um fato a ser considerado é que as ETEs 2 e 5 recebem, além do esgoto sanitário, efluentes industriais que podem conter substâncias que interferem na detecção das partículas virais.

Na ETE 5 constata-se ainda a adição de cal, o que eleva o pH para valores acima de 10, o que pode interferir na recuperação das partículas virais.

Embora haja adição de cal no lodo gerado na ETE 6, o que confere ao lodo valores elevados (< 10) de pH, não se observou interferências no isolamento das partículas virais.

As ETEs avaliadas neste estudo utilizam diferentes tipos de tratamento para os lodos de esgoto, como ilustra a tabela 9. No entanto, a variação dos valores de concentração de enterovírus observada não permite estabelecer qual foi o tratamento mais eficiente na remoção de partículas virais. Esse fato pode também estar relacionado a qualidade de esgoto de chega na estação, se ele é predominantemente sanitário, como é o caso da ETE 3 onde se encontrou as maiores concentrações, ou se tem esgoto industrial em demasia, o que ocorre nas estações 2 e 5 onde se encontrou a maioria das concentrações no limite teórico de detecção.

Os resultados mostram grande variação da concentração de enterovírus ao longo do ano em todas as ETE's estudadas e, portanto, não foi possível identificar um padrão sazonal, embora no período de verão tenha havido um aumento dessa concentração. Uma hipótese para esse fato é que nesse período do ano o consumo de água aumenta o que resulta em aumento de volume de esgotos gerados. Shanahan et al. (2010) estudaram variações ambientais como pressão atmosférica, umidade, período chuvoso, irradiação UV e temperatura na sobrevivência das partículas virais no solo e concluíram que além da temperatura, os outros fatores estudados não apresentaram influência. Os achados de Payment et al. (2001), corroboram com os nossos, pois também não foram capazes de estabelecer um padrão sazonal desses organismos em função da grande variação da concentração encontrada. No entanto, estudo realizado por Berg e Berman (1980) apud Sidhu et al. (2009) no qual

avaliaram a ocorrência de enterovírus em amostras de lodo de esgoto, constataram aumento na concentração desses vírus no final do verão e início do outono.

Um dos objetivos deste estudo foi o de se avaliar o desempenho do método utilizado para a detecção de *Enterovirus* nas amostras de lodo examinadas. Para a realização da avaliação, o método EPA 625/R-92/013 recomenda a utilização de 12 gramas de peso seco. No entanto, nesse estudo, além de se usar a massa recomendada de 12 gramas, também se utilizou massa de 4 gramas de peso seco para efeito de comparação. Como mostrado nas tabelas 12 e 13, as taxas de recuperação, usando-se a massa de 12 gramas seca, variou de 9,54% a 17,98% com média de 12,47%, considerando-se todas as ETES estudadas.

Em relação aos desvios padrão obtidos, observou-se variação de 3,25% a 29,06%, considerando todas as ETES avaliadas. Esses resultados evidenciam variação elevada na recuperação das partículas virais, isso pode ser um reflexo da variabilidade inerente da própria amostra.

Já quando utilizada a massa de 4 gramas seca, o valor mínimo de taxa de recuperação foi de 10,10% e máximo foi de 68,60% com média de 38,37%.

Embora hajam dificuldades a serem superadas, o método utilizado nessa pesquisa foi o da Agência Ambiental Americana (USEPA 2003) o qual é recomendado pela resolução CONAMA 375/2006, e é utilizado por vários pesquisadores em âmbito mundial na investigação da ocorrência e quantificação de enterovírus em amostras ambientais.

Estudo realizado por Belguith et al. (2006), avaliaram diferentes métodos de extração de *Enterovirus* em amostras ambientais incluindo lodo de esgoto. Concluíram que o método de adsorção/eluição recomendado pela USEPA (1992) foi o melhor para a recuperação de echovirus 11, pois resultou em níveis mais elevados de detecção por cultura celular e RT-PCR. No entanto, estudos da USEPA (2003) mostram taxas de recuperação utilizando diferentes técnicas de extração, tais como o

método EPA 625/R-092/013, técnica do clorofórmio e da sonicação. A média de taxa de recuperação foi de 0,7% para a técnica descrita pela EPA, 36% para a técnica do clorofórmio e 59% para a sonicação. No caso do lodo tratado as médias foram de 66% para a EPA, 103% para o clorofórmio e 116% para a sonicação.

Observa-se que há dificuldades no preparo das amostra para a realização dessa técnica, como por exemplo os valores de pH da amostra, que devem ser ajustados sempre para 3,0 – 3,5 ou a filtração em membrana.

As amostras da ETE 5 e 6 apresentaram pH inicial de 13-14, sendo necessário manter seu pH em 3,0-3,5. Isso pode ter influenciado nos resultados. A ETE 1 e 2 apresentaram muitas partículas finas, dificultando a filtragem na etapa da esterilização das amostras, ficando-se as vezes com volumes muito reduzidos de amostra, para a inoculação na cultura celular.

7 Conclusão

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- 1) *Enterovirus* estiveram presentes em 83% das amostras analisadas, com concentrações que variaram de $< 0,1$ a $12,5$ UFP/gST.
- 2) Das amostras de lodos analisadas 31% atendem o estabelecido pela Resolução CONAMA 375/2006.
- 3) Não foi possível identificar um padrão para a detecção e quantificação sazonal de *Enterovirus*.
- 4) Não foi possível identificar qual o tratamento aplicado ao lodo é o mais eficiente na remoção de partículas virais.
- 5) As taxas de recuperação obtidas variaram de $0,20$ a $68,50\%$ nas sementeiras utilizando 12 gramas de sólidos totais e de $10,10$ a $68,60\%$ nas de 4 gramas de sólidos totais.

8 BIBLIOGRAFIA

Andreoli CV, Fernandes F, Domaszak SC. Reciclagem agrícola do lodo de esgoto. Curitiba: SANEPAR, 1997.

Archie SG, Smith M. Survival and growth of plantations in sludge-treated soils and older forest growth studies. In: C.S. Bledsoe, Ed. Municipal Sludge Application to Pacific Northwest Forest Lands Inst. For. Resources Contrib. aNo. 41, College of Forest Resources, University of Washington, Seattle 1981.

Belguith K, Hassen A, Aouni M. Comparative study of four extraction methods for enterovirus recovery from wastewater and sewage sludge. *Biores Techn.* 2006. 97, 414 – 419.

Berg K, Hansen MB, Nielsen SE. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. of Immun. Methods.* 1989.119 (2) 203-210.

Bettiol W, Camargo AO. Lodo de Esgoto: Impactos Ambientais na Agricultura. 1ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006. V1. 374p.

Bofill-Mas S, Gimenez NA, Casares PC, Hundesa A, Ribas F, Girones R, Distribution of Human Polyomaviruses, Adenoviruses, and Hepatitis E Virus in the Environment and in a Drinking-Water Treatment Plant. *Environ. Sci. Technol.* 2006; 7416-7422.

Bonnet BRP, LARA AI, Domaszak SC. Indicadores biológicos de qualidade sanitária do lodo de esgoto. In: Andreoli CV, Bonnet BRP. Manual de métodos para análises microbiológicas e parasitológicas em reciclagem agrícola de lodo de esgoto. Curitiba: SANEPAR, 1998.

BRASIL Ministério do Meio Ambiente. CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução 375 de 29 de agosto de 2006, seção 1, páginas 141-146, Brasília – DF.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Censo 2010. Rio de Janeiro, 2011.

Brooks JP, Maxwell C, Rensing CP, Gerba IL, Pepper IL. Occurrence of antibiotic-resistance bacteria and endotoxin associated with the land application of biosolids. *Can. J. of Microbiol.* 2007; 53 (5) 616-622.

Carter MJ. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *J Appl Microbiol* 2005;98:1354-1380.

Chile. Ministerio Secretaría General de La Presidencia; Subsecretaria General de La Presidencia. Reglamento para El Manejo de Lodos Generados en Plantas de Tratamiento de Aguas Servidas. Versão única, 2010. Disponível em <http://www.leychile.cl/N?i=1007456&f=2010-04-06&p=>

Eisenberg JNS, Moore K, Soller JA, Eisenberg D, Colford Jr JM. Microbial risk assessment framework for exposure to amended sludge projects. *Environ Health Perspec* 2008; 116 (6): 727-733.

Eisenberg JNS, Soller AS, Scott J, Eisenberg DN, Colford JR JM. A dynamic model to assess microbial health risks associated with beneficial uses of biosolids. *Risk Analysis*; 2004 24(1); 221-236.

EU, União Europeia, 1986. Commission Staff Working Document accompanying the Communication from the Commission to the Council and the European Parliament on implementation of the Community waste legislation – Directive 86/278/EEC on sewage sludge – For the period 2004-2006 (COM(2009)633 final). Disponível em <http://eur-lex.europa.eu> acesso em 15/02/2011.

Fitzmorris KB, Sarmiento F, O’Callaghan. Biosolids and Sludge Management. *Water Environ. Research.* 2009, vol 81, nº 10, p. 1376-1393.

Fong TT, Lipp EK. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection and potential water quality assessment tools. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2005;69 (2): 357-371.

Gerba CP, Pepper IL, Whitehead III LF, A risk assessment of emerging pathogens of concern in the land application of biosolids. *Wat Sci Tech.* 2002; 46: 225-230.

Gerba CP, Rodríguez RA, Pepper IL, Application of PCR-Based Methods To Assess the Infectivity of Enteric Viruses in Environmental Samples. *Appl. and Environ. Microb.* 2009; 75(2) 297-307.

Gerba CP, Smith JE. Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. *J Environ Quality.* 2005. 34, 42 – 48.

Goss M, Richards C. Development of a risk-based index for source water protection planning, which supports the reduction of pathogens from agricultural activity entering water resources. *J of Environ. Manag.* 2008; 87 (4) 623-632.

Guzmán C, Jofre J, Montemayor M, Lucena F. Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolids. *J Appl Microbiol.* 2007. 103, 2420 – 2429.

Husman AMR, Lodder WJ, Rutjes SA, Schijven JF, Teunis PFM. Long-Term Inactivation Study of Three Enteroviruses in Artificial Surface and Groundwaters, Using PCR and Cell Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, vol 70, n° 4, p. 1050-1057.

Jones APW, Sellwood J. A review: Enteric viruses in the aquatic environment. *Journal of appl. Microbiol.* 200; 91, 945-962.

Jones DL. Potential health risks associated with persistence of *Escherichia coli* O157 in agricultural environments. *Soil use and Manag.* 1999; 15 76-83.

Leclerc H, Schwartzbrod L, Dei-Cas E, Microbial agents associated with waterborne diseases. *Critical Reviews in Microbiol.* 2002; 28(4) 371-409.

Lee C, Seung-Hoon L, Han E, Sang-Jong K. Use of Cell Culture-PCR Assay Based on Combination of A549 and BGMK Cell Lines and Molecular Identification as a

Tool To Monitor Infectious Adenoviruses and Enteroviruses in River Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, vol 70, n° 11, p. 6695-6705.

Lennet, EH; Smith, TF. *Laboratory Diagnosis of Viral Infections*, 3 ed. New York, 1999.

Lewis DL, Gattie DF. Pathogen risks from applying sewage sludge to land. *Environ. Sci. Technol.* 2002; 36 286A-293A.

Metacalf & Eddy. *Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse*, 4 ed., 2003. New York.

Metcalf TG, Melnick JL, Estes MK. Environmental virology: from detection of virus in sewage e water by isolation to identification by molecular biology--a trip of over 50 years. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:461-87. Review.

México, 2002. Secretaria de Medio Ambiente e Recursos Naturales. NOM-004-ECOL-2002. Protección ambiental – Lodos y biosólidos – especificaciones y limites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final. Disponível em <http://www.minambiente.gov.co//contenido/busqueda.aspx?k=lodo>. Acesso em 15/02/2011.

Monpoeho S, Maul A, Bonnin C, Patria L, Ranarijaona S, Billaudel S, Ferré V. Clearance of human-pathogenic viruses from sludge: study of four stabilization processes by real-time reverse transcription-PCR e cell culture. *Appl Environ Microbiol.* 2004 Sep;70(9):5434-40.

Payment P, Plante R, Cejka P, Removal of indicator bacteria, human enteric viruses, Giardia cysts, and Cryptosporidium oocysts at a large wastewater primary treatment facility. *Can. J. Microbiol.* 2001;47(3):188-93.

Pepper IL, Brooks JP, Sinclair RG, Gurian PL, Gerba CP. Pathogens and indicators in United States Class B Biosolids: National and Historic Distributions. *J Environ. Qual.* 2010, 39:2185-2190.

Pepper IL, Zerzhi H, Brooks JP, Gerba CP. Sustainability of Land Application of Class B Biosolids. *J. Environ. Qual.* 2008; 37 S-58–S-67.

PROSAB. Uso e manejo do lodo de esgoto na agricultura. Rio de Janeiro, 1999.

Rodríguez RA, Gundy PM, Gerba CP. Comparison of BGM and PLC/PRC/5 Cell Lines for Total Culturable Viral Assay of Treated Sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, vol 74, n° 9, p. 2583-2587.

Sanchez Monedero MA, Mondini C, De Nobili M, Leita L, Roig A, Land applications of biossolids. Soil response to different stabilization degree or treated organic matter. *Waster Manage.* 2004; 24(4) 325-332.

Schwartzbrod L. Virus humains et santé publique: consequences de l'utilisation des eaux uses et des boues en agriculture et conchyliculture. World health organization - WHO: 2000; France

Servais P, Garcia-Armisen T, George I, Billen G, Fecal bacteria in the rivers oh the Seine drainage network (France): sources, fate and modeling. *Sci. Of the total Environ.* 2007; 375 152-167.

Shanahan EF, Roiko A, Tindale NW, Thomas MP, Walpole R, Kurtböke DI, Evaluation of Pathogen Removal in a Solar Sludge Drying Facility Using Microbial Indicators. *Inter. J. of Environ. Res. Pub. Health.* 2010; 7 565-582.

Shieg YC, Wong CI, Krantz JA, Hsu FC. Detection of naturally occurring enteroviroses in waters using direct RT-PCR and integrated cell culture RT-PCR. *J Virol Met.* 2008; 149: 184-189.

Sidhu JPS; Toze SG. Human pathogens and their indicators in biossolids: A literature review. *Environmental International.* 2009; 35, 187 – 201.

Skraber S, Ogorzaly KH, Maul A, Hoffman L, Cauchie HM, Gantzer C. Occurrence and persistense of enteroviruses, noroviruses and F-specific RNA phages in natural wastewater biofilms. *Water Research.* 2009, vol 43, p. 4780-4789.

Soccol VT, Paulino RC. Riscos de contaminação do agroecossistema com parasitos pelo uso do lodo de esgoto. In: Bettiol W, Camargo OA. (Eds.). Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000, p. 245-259.

Soule H, Gratacap-Cavallier B, Genoulaz O, Brengel-Pesce K, Innocenti-Francillard P, Bost M, Gofiti L, Zmirou D, Seigneurin JM. Detection of human and animal rotavirus sequences in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66(6) 2690-2

Straub TM, Pepper IL, Gerba CP. Hazards from pathogenic microorganisms in le-disposed sewage sludge. *Rev Environ Contam Toxicol.* 1993;132:55-91. Review.

Tavares, TM; Cardoso, DDP; Brito, WMED. Vírus entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos e de controle de qualidade da água. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), 2004.

Thomaz-Soccol V, Aspectos sanitários do lodo de esgoto. In: Seminário sobre gerenciamento de biossólidos do Mercosul. Curitiba: SANEPAR/ABES, 1998.

United Nations Human Settlements Programme (UN-HABITAT), 2008. Global Atlas of Excreta, Wastewater Sludge, and Biosolids Management: Moving Forward the Sustainable and Welcome Uses of a Global Resource. Quênia – Canadá.

US Environmental Protection Agency (USEPA) Control of Pathogens e vector Attraction in sewage sludge. EPA/625/R-92/013. Cincinnati, OH 2003

US Environmental Protection Agency (USEPA) Standards for the use or disposal of sewage sludge; final rules, 40 CFR parts 257, 403 and 503. Federal Register 58 (32), 9248-9415, 1993.

US Environmental Protection Agency.(USEPA) Manual of methods for virology. EPA/600/4-84/013 (R-7). Washington DC 1989.

US Environmental Protection Agency.(USEPA) Preliminary comparative study of methods to extract virus from raw and processed sewage sludge. EPA/600/R-07/118, September 2007.

US Environmental Protection Agency.(USEPA) Standarts for the disposal of sewage sludge. EPA part 503. Washington DC 1992.

US. Environmental Protection Agency.(USEPA) Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge. Under 40 CFR Part. 503, appendix H – Method for recovery and assay of total culturable viruses from sludge, EPA/625/R-92/013, 2003.

Viau E, Peccia J, Survey of Wastewater Indicators and Human Pathogen Genomes in Biosolids Produced by Class A and Class B Stabilization Treatments. Appl. Environ. Microbiol. 2009, vol 75, n° 1, p. 164-174.

Ward RL. Evidence that microorganisms cause inactivation of viruses in activated sludge. Appl Environ Microbiol. 1982. 43, n° 5 1221 – 1224.

WHO-World Health Organization. Guidelines for drinking water quality. Vol. 1. Recommendations. Genebra. 2004.

Wyn-Jones AP, Sellwood J. Enteric viruses in the aquatic environmental. J Appl Microbiol. 2001; 91: 945-962.

Zaleski KJ, Josephson KL, Gerba CP, Pepper IL. Potencial Regrowth and Recolonization of Salmonellae and Indicators in Biosolids and Biosolid-Amended Soil. Appl and Environ. Microbiol. 2005; 3701-3708.

ANEXOS

ANEXO 1 – Meios de Cultura

A seguir são descritos os meios de cultura e as soluções utilizadas nas culturas de células, na concentração das amostras e nas inoculações.

Agar ou Agarose 3%

a) Fórmula:

Agar ou agarose:	3,0g
Água ultrapura:	100,00mL

b) Preparo:

Em um erlenmeyer de 250 mL pesou-se 3,0 g de ágar ou agarose onde acrescentou 100,0 mL de água ultrapura fria, mantido sob agitação constante até completa dissolução. Depois se aqueceu, agitando até a completa dissolução do agar, tomando o cuidado para que não fosse atingida a temperatura de ebulição.

Esterilizou-se por autoclavação a 121°C por 15 minutos. Foi mantido em banho-maria a 46-47°C até o momento do uso, para evitar a solidificação.

ATV (Associação de tripsina e versene)

O ATV é composto pelas soluções A, B, C e D.

Solução A – Solução Salina

a) Fórmula:

Cloreto de sódio:	8,0g	
Cloreto de potássio:	0,2g	
Monohidrogeno fosfato de sódio dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)		1,5g
Dihidrogeno fosfato de potássio anidro (KH_2PO_4):		0,2g
Água ultrapura q.s.p.:		1000mL

b) Preparo:

Pesou-se cada um dos reagentes que foram dissolvidos em água ultrapura até completarem 1000 mL, com agitação constante até completa solubilização.

Solução B –Tripsina**a) Fórmula:**

Tripsina 1:250:	2,0g
Solução A q.s.p.:	50mL

b) Preparo:

Pesou-se 2,0 g de tripsina que foi dissolvido em 50 mL de solução salina (solução A) e deixado agitar em banho de gelo durante 3 horas. A solução foi filtrada em papel de filtro.

Solução C –Versene**a) Fórmula:**

Versene titriplex III ou EDTA:	1,0g
Solução A q.s.p.:	50mL

b) Preparo:

Pesou-se 1,0 g de Versene titriplex III ou EDTA que foi dissolvido em 50 mL de solução salina (solução A) até completa solubilização.

Solução D –Vermelho de Fenol**a) Fórmula:**

Vermelho de fenol:	0,5g
Água ultrapura q.s.p.:	50mL
NaOH 6N (GE 010).	

b) Preparo:

Pesou-se 0,5g de Vermelho de fenol que foi dissolvido em algumas gotas de NaOH 6N, em seguida acrescentou-se água ultrapura até completar o volume de 50mL, agitando-se até completa solubilização.

Preparo final da solução de ATV (associação de tripsina 0,20% e versene 0,02%)

Se misturou sob agitação as soluções B e C à solução A, adicionando no final 15 mL da solução D, sempre homogeneizando bem.

O meio foi esterilizado por filtração com membrana clarificante AP 20 e membrana filtrante 0,22µm estéreis.

Azul de Tripán 0,1%**a) Fórmula:**

Corante de azul de tripan:	0,1g
PBS:	100 mL

b) Preparo:

Se diluiu 0,1g de azul de tripan em 100mL de PBS e homogeneizou-se até completa dissolução. A solução foi esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Bicarbonato de Sódio 7,5%**a) Fórmula:**

Bicarbonato de Sódio (NaHCO ₃):	7,5g
Água ultrapura:	1000mL

b) Preparo:

Pesou-se 7,5 g de bicarbonato de sódio e acrescentou-se água ultrapura até completar o volume de 1000 mL. Esterilizou-se a solução por autoclavação a 121°C por 15 minutos.

Cloreto de Magnésio 1%**a) Fórmula:**

Cloreto de Magnésio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$):	5,0g
Água ultrapura q.s.p.:	500mL

b) Preparo:

Pesou-se 5,0 g de cloreto de magnésio e dissolveu-se em 500 mL de água ultrapura. A solução foi esterilizada por autoclavação a 121°C por 15 minutos.

L-GLUTAMINA 2%**a) Fórmula:**

L-glutamina:	3,0g
Água ultrapura q.s.p.:	100mL

b) Preparo:

- Pesou-se 3,0 g da L-Glutamina e dissolveu-se em 100,0 mL de água ultrapura, mantendo sob agitação constante até completa dissolução. Esterilizada por filtração em membrana 0,22 μm .

Vermelho Neutro 0,33%**a) Fórmula:**

Vermelho neutro:	0,66g
Água ultrapura q.s.p.:	200mL

b) Preparo:

Pesou-se 0,66 g do vermelho neutro e dissolveu-se em 200,0 mL de água ultrapura, mantendo sob agitação constante até completa dissolução. Esterilizada por filtração em membrana 0,22 μm .

SORO FETAL BOVINO (FBS) Inativado**a) Fórmula:**

Soro Fetal Bovino

b) Preparo:

Inativação: processo pelo qual, por aquecimento em banho-maria a 56°C durante 30 minutos, são inativados inibidores e/ou aglutininas inespecíficas contidas no soro.

Solução Tamponada de Fsofato (PBS)**a) Fórmula:**

Cloreto de sódio:	8,0g
Cloreto de potássio:	0,2g
Monohidrogeno fosfato de sódio (Na_2HPO_4)	0,91g
Dihidrogeno fosfato de potássio anidro (KH_2PO_4):	0,12g
Água ultrapura q.s.p.:	1000mL

b) Preparo:

Pesou-se cada um dos reagentes que foram dissolvidos em 500mL de água ultrapura e depois completado 1000 mL, com agitação constante até completa solubilização. Esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Meio Mínimo Essencial Eagle com sais de EARLE (MEM Eagle Earle)**a) Fórmula:**

Meio Mínimo Essencial Eagle com sais de EARLE:	9,4g
Água ultrapura q.s.p.:	1000mL

b) Preparo:

Dissolveu-se o MEM Eagle EARLE em 800mL de água ultrapura até completa solubilização e depois completou-se para 1000 mL, com agitação constante. Esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Meio Formulado para Filtração (com L-glutamina)**a) Fórmula:**

Meio Mínimo Essencial Eagle com sais de EARLE:	9,57g
Água ultrapura q.s.p.:	1000mL

b) Preparo:

Dissolveu-se o MEM Eagle EARLE em 800mL de água ultrapura até completa solubilização e depois completou-se para 1000 mL, com agitação constante. Esterilizado em membrana filtrante de 0,22 µm.

MEM Eagle EARLE suplementado (sem soro)**a) Fórmula:**

Meio Mínimo Essencial Eagle com sais de EARLE q.s.p:	500mL
Solução de Gentamicina (10mg/mL):	0,5mL
L-glutamina 2%:	10mL
Solução tampão HEPES 1m:	5,0ml
Bicarbonato de Sódio 7,5%:	6 a 8mL

b) Preparo:

Na cabine de segurança biológica, suplementou-se o MEM Eagle EARLE, adicionando-se os demais reagentes nesta ordem: solução de gentamicina; L-glutamina; solução tampão HEPES 1M e o bicarbonato de sódio 7,5%. Homogeneizou-se bem. Retirou-se uma alíquota para a verificação do pH, que deve estar entre $7,3 \pm 0,1$, se necessário ajuste-o com o bicarbonato de sódio.

Meio Formulado para Autoclavação (sem L-glutamina)**a) Fórmula:**

Meio Mínimo Essencial Eagle com sais de EARLE:	9,4g
Água ultrapura q.s.p.:	500mL

b) Preparo:

Dissolveu-se o MEM Eagle EARLE em 400mL de água ultrapura até completa solubilização e depois completou-se para 500 mL, com agitação constante. Esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Solução Balanceada de sais de Earle**a) Fórmula:**

CaCl ₂ . 2H ₂ O:	0,26g
KCl:	0,4g
MgSO ₄ . 7H ₂ O:	0,198g
NaCl:	6,8g
NaHCO ₃ :	2,2g
NaH ₂ PO ₄ anidro:	0,124g
D-glicose:	1,0g
Vermelho de Fenol:	0,01g
Água ultrapura q.s.p.:	1000mL

b) Preparo:

Dissolveu-se os reagentes pesados em 900mL de água ultrapura e homogeneizou-se até completa solubilização e depois completou-se o volume para 1000 mL. Esterilizado com membrana filtrante de 0,22 µm. Retirar uma pequena alíquota e medir o pH, se necessário ajustar assepticamente para 7,1 – 7,4.

Meio para Congelamento**a) Fórmula:**

Soro Fetal Bovino Inativado:	2,2mL
DMSO (dimetil-sulfóxido) estéril:	0,8g
MEM Eagle suplementado (sem soro):	2,0mL

b) Preparo:

Em condições assépticas dissolveu-se os reagentes em tubo de 15 mL. Manter em banho de gelo até o momento do uso.

Solução de HEPES 1M**a) Fórmula:**

HEPES:	23,83g
Água ultrapura q.s.p.:	100mL

b) Preparo:

Dissolveu-se o reagente HEPES em 80mL de água ultrapura e homogeneizou-se até completa solubilização e depois completou-se o volume para 100 mL. Esterilizado em autoclave 121°C por 15 minutos.

Solução de Extrato de Carne em pó a 10%, com fosfato de sódio dibásico e ácido cítrico pH7,0**a) Fórmula:**

Extrato de Carne em pó:	10,0g
Fosfato de sódio dibásico:	1,34g
Ácido cítrico:	0,12g
Água ultrapura q.s.p.:	100mL

b) Preparo:

Pesou-se os reagentes em um béquer e acrescentou-se os 100mL de água ultrapura, homogeneizou-se até completa solubilização. Esterilizou-se o meio em autoclave a 121°C por 15 minutos.

ANEXO 2 – Manutenção da Cultura Celular RD

- **Congelamento**

Após a verificação da condição de semi-confluência ou confluência das células realizou-se o procedimento de congelamento das mesmas. As células foram lavadas com cerca de 10mL de PBS sendo o produto da lavagem descartado e então adicionou-se o ATV em volume suficiente para a formação de uma fina película sobre a monocamada celular. Adicionou-se 3,0mL do meio Eagle completo, e após homogeneização o conteúdo foi transferido para tubo cônico de 15mL para a realização da etapa de centrifugação a 1500 rpm durante 10 minutos. Após essa etapa, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado com aproximadamente 2mL do meio de crescimento. Efetuou-se a contagem das células em câmara de Newbauer e, enquanto a contagem era realizada os tubos contendo as células foram mantidos em banho de gelo. Quando a concentração de células foi de 10^6 /mL adicionou-se 5mL do meio para congelamento recém-preparado e assim distribuídos volumes de 1mL em criotubos para congelamento (também mantidos no banho de gelo). Os criotubos foram previamente identificados constando-se a linhagem celular, data e número da passagem e armazenados em freezer -70°C durante 24h, após esse tempo transferidos para o cilindro de nitrogênio líquido.

- **Descongelamento:**

Para se efetuar o descongelamento das células, transferiu-se o criotubo do nitrogênio líquido para banho-maria a 37°C . Após completo descongelamento das células, efetuou-se nova contagem utilizando-se câmara de Newbauer para verificação da concentração e viabilidade das células. Quando a concentração era de 10^6 /mL e as células apresetaram-se viáveis, o conteúdo dos criotubos foi transferido, lenta e cuidadosamente, para garrafa de 25 cm^2 ou 75 cm^2 . À garrafa contendo as células adicionou-se volume de meio Eagle completo suficiente para atingir um volume final de 10 – 12 mL ou 20 – 25 mL. Novamente, efetuou-se a contagem e

verificação da viabilidade das células e então foram incubadas a $36,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Leituras, utilizando-se microscópio de fase invertida, foram efetuadas até a observação a formação da monocamada e então se descartou o meio de crescimento.