Encontro Técnico AESABESP
Congresso Nacional de Saneamento e Meio Ambiente



35ETC-06680

DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp. NA ÁGUA: OTIMIZAÇÃO DE UM MÉTODO COLORIMÉTRICO

Letícia Beatriz de Lima
Seila Couso-Pérez, Hipólito Gómez-Couso, Lyda Patricia Sabogal-Paz e Pilar Fernandez-Ibañez
Universidade de São Paulo (EESC-USP) – **leticia.b.lima@usp.br**

OBJETIVOS DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

AESABESP
Associação dos Engenheiros da Sabesp

Prêmio Jovem Profissional 2022

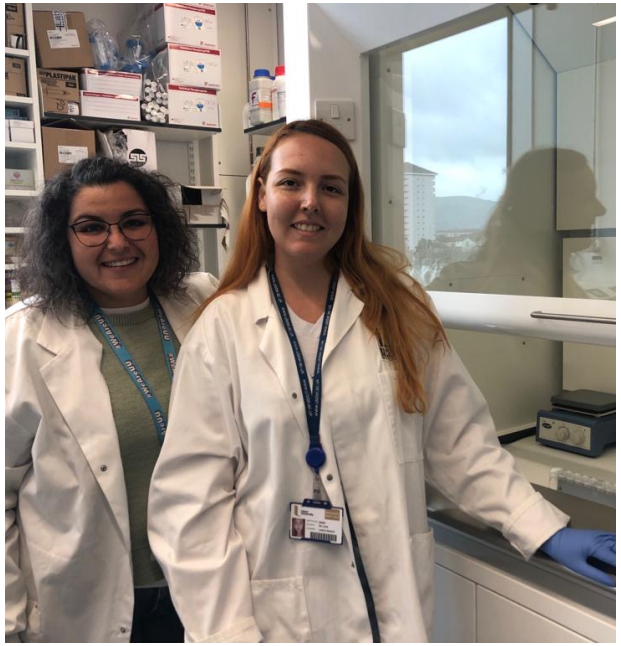




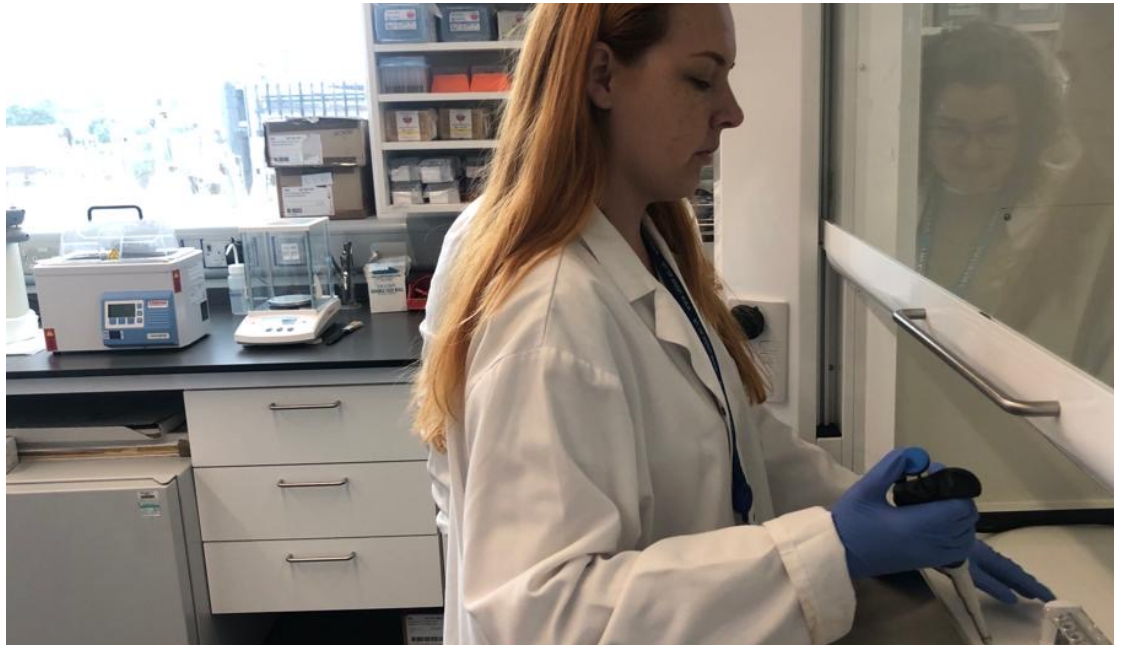


Saneamento em comunidades isoladas: implementação e análise de sistemas alternativos em um assentamento rural

Estágio na Ulster University (2023)







Belfast, Irlanda do Norte – Reino Unido

OBJETIVOS DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

Encontro Técnico AESABESP
Congresso Nacional de Saneamento e Meio Ambiente

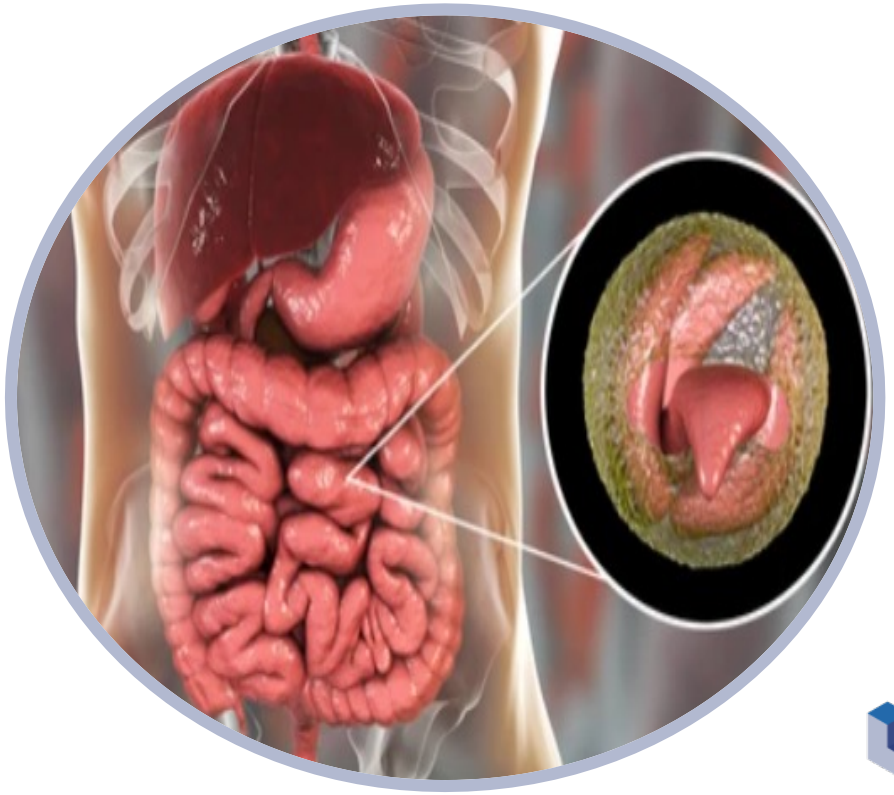




Garantir a disponibilidade e a gestão sustentável da água potável e do saneamento para todos

Cryptosporidium

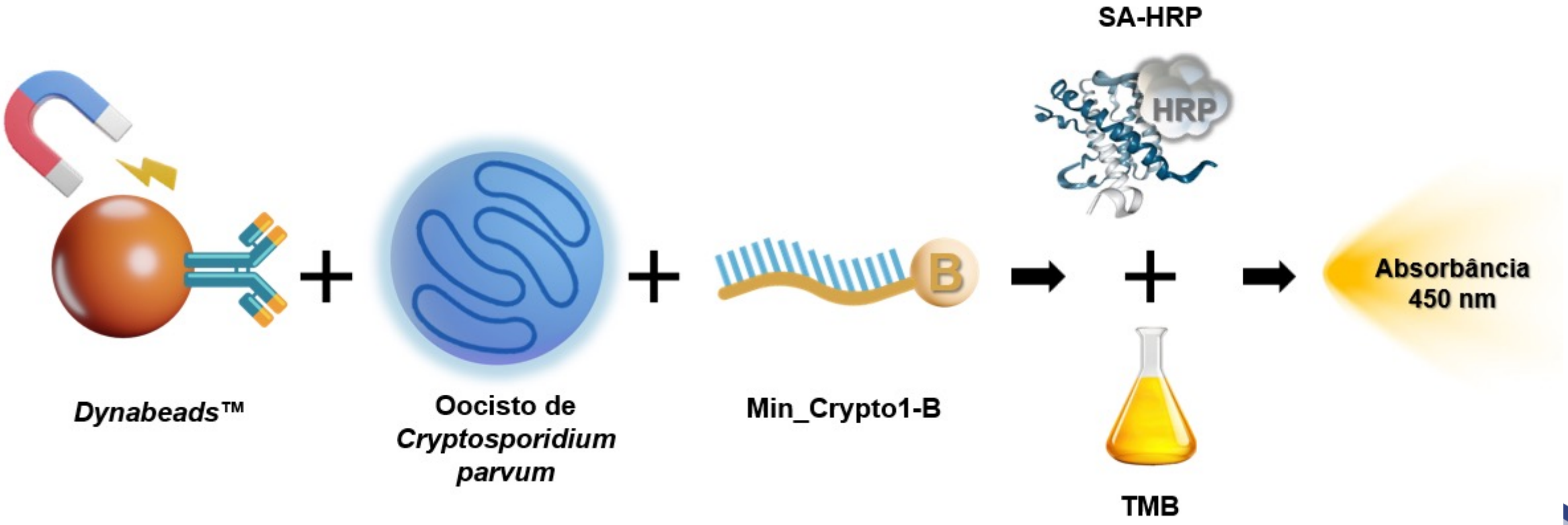
- Protozoário parasita
- Mortalidade infantil
- Criptosporidiose → doença de veiculação hídrica e transmissão fecal-oral
- Oocisto → forma infecciosa
- Análise onerosa e complexa
- Otimizar para viabilizar

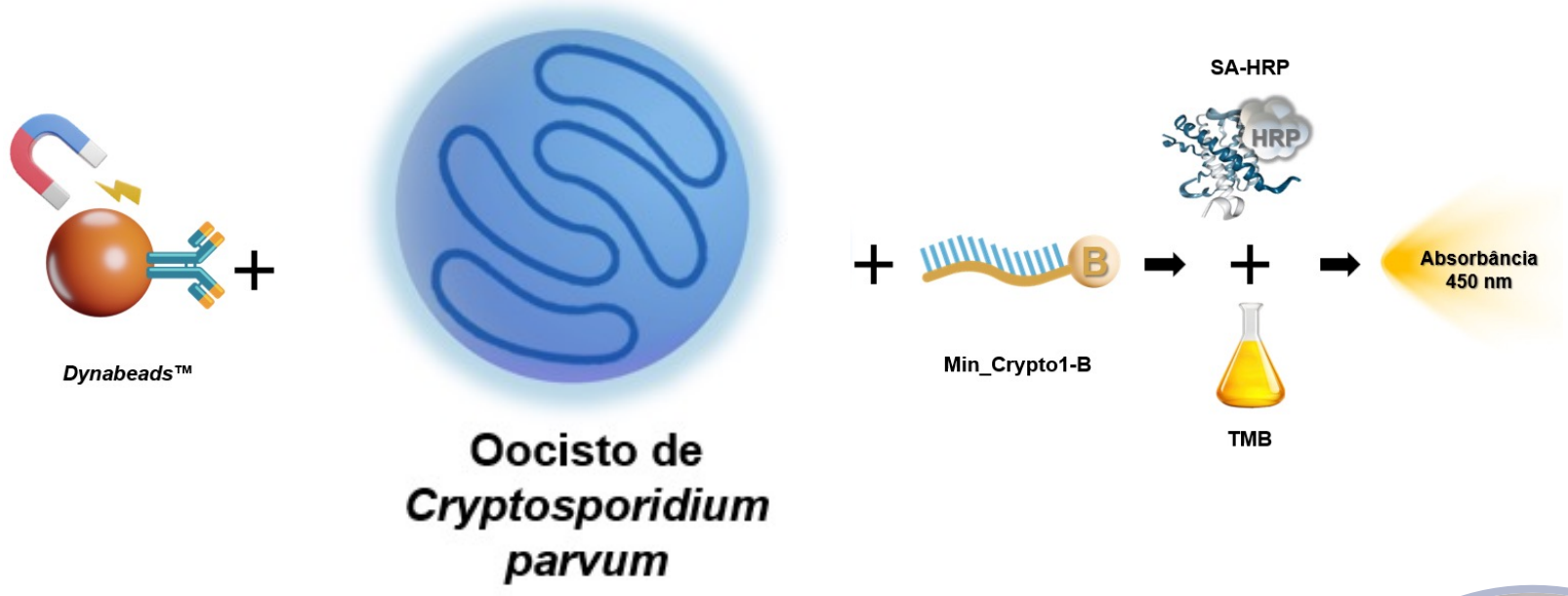


OBJETIVO

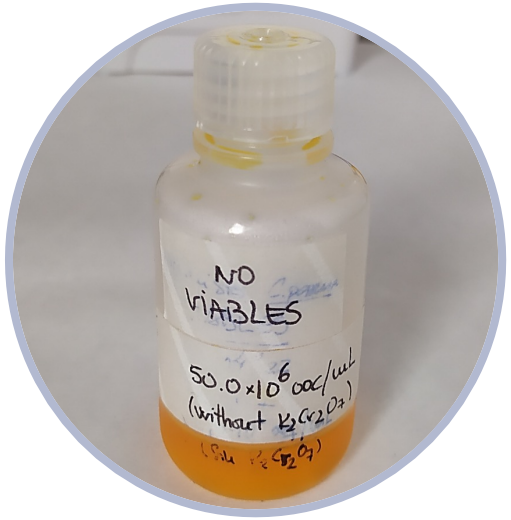
Otimizar as condições experimentais (reagentes e tempo) de um método colorimétrico de detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de água, garantindo a sensibilidade e reprodutibilidade da análise

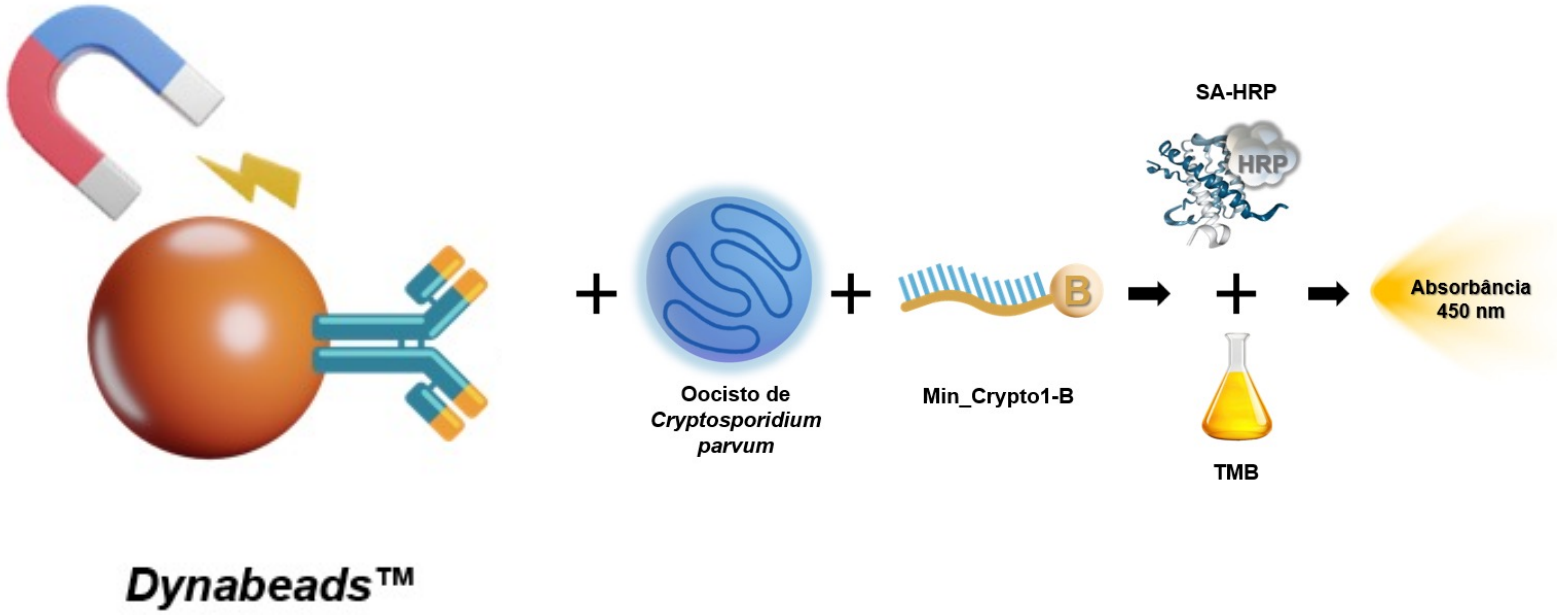
Método


SA-HRP
HRP
B
Absorbância
450 nm
Dynabeads™
Oocisto de
Cryptosporidium
parvum
Min_Crypto1-B
TMB



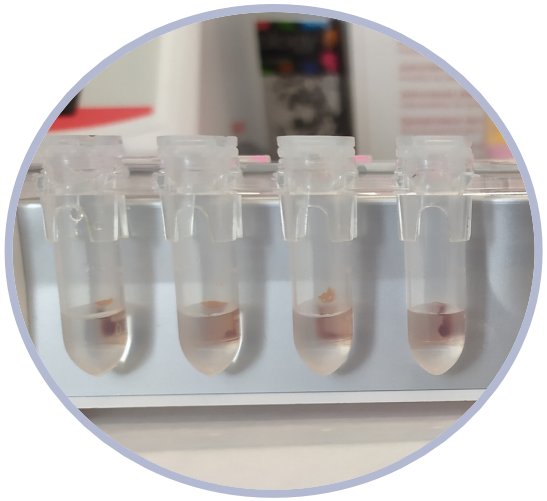
- Amostras fecais de bezerros contaminados
- Purificação, concentração e quantificação
- Suspensão de 10^3 ooc/mL





SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA

- Microesferas superparamagnéticas revestidas por anticorpos anti-*Cryptosporidium*
- Ligam-se aos oocistos
- Separação do complexo da amostra com ímã
- Remoção do sobrenadante

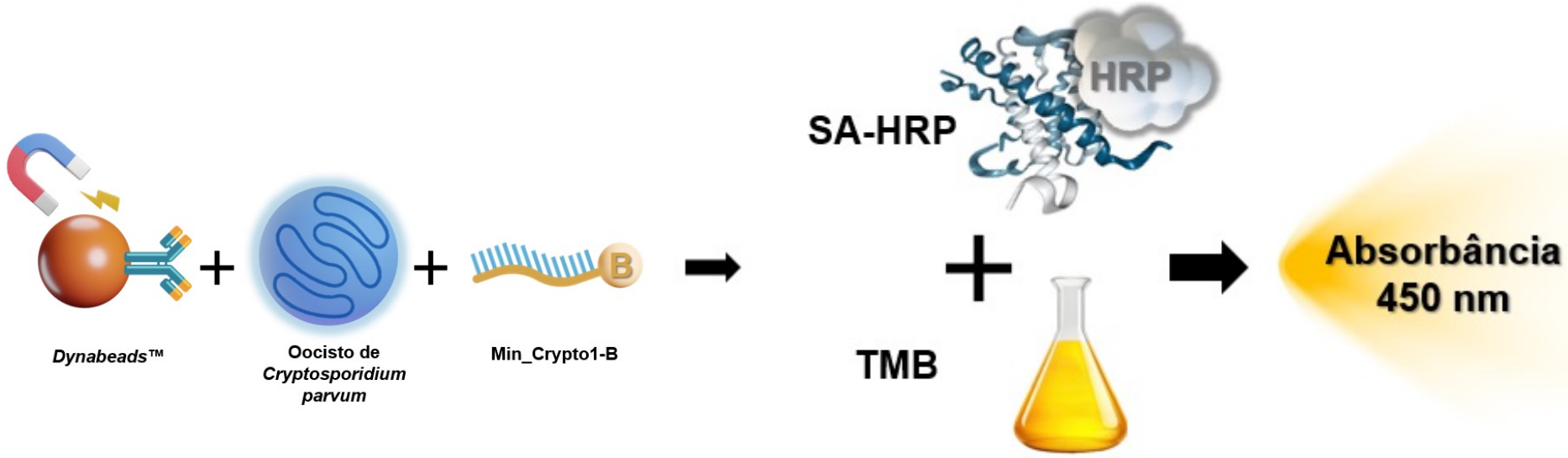




REFORÇO DA SEPARAÇÃO

- Aptâmero → molécula sintética de DNA com afinidade com o *Cryptosporidium*
- Biotina → vitamina com afinidade com a SA





DETECÇÃO COLORIMÉTRICA

- Estreptavidina (SA) → proteína com afinidade com a biotina
- Peroxidase (HRP) → enzima catalizadora da reação
- 3,3’,5,5’-tetrametilbenzidina (TMB) → substrato que gera cor
- Medição da absorbância a 450 nm



Configurações experimentais

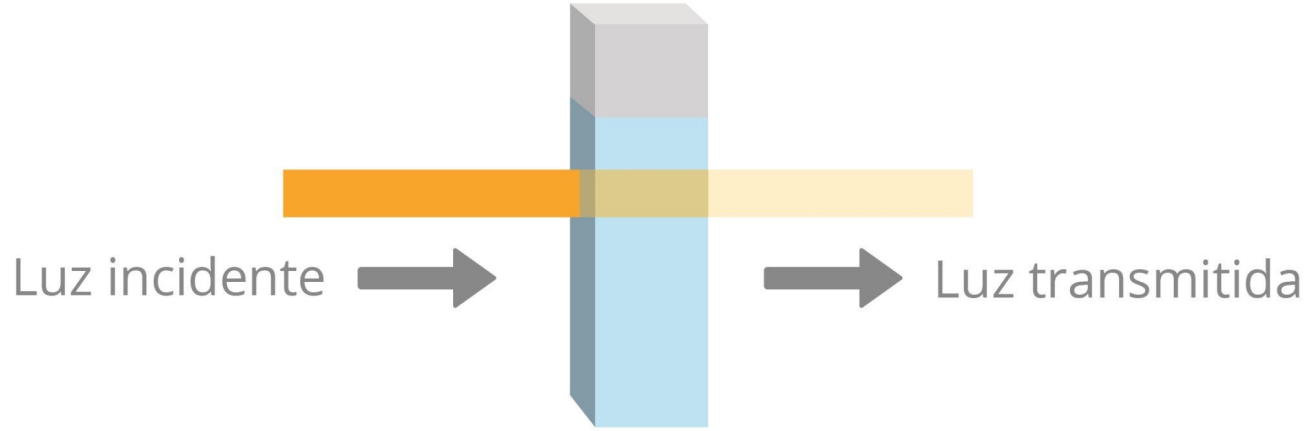
Tabela 1 - Configurações experimentais com diferentes diluições do reagent SA-HRP e diferentes tempos de incubação com o substrato TMB

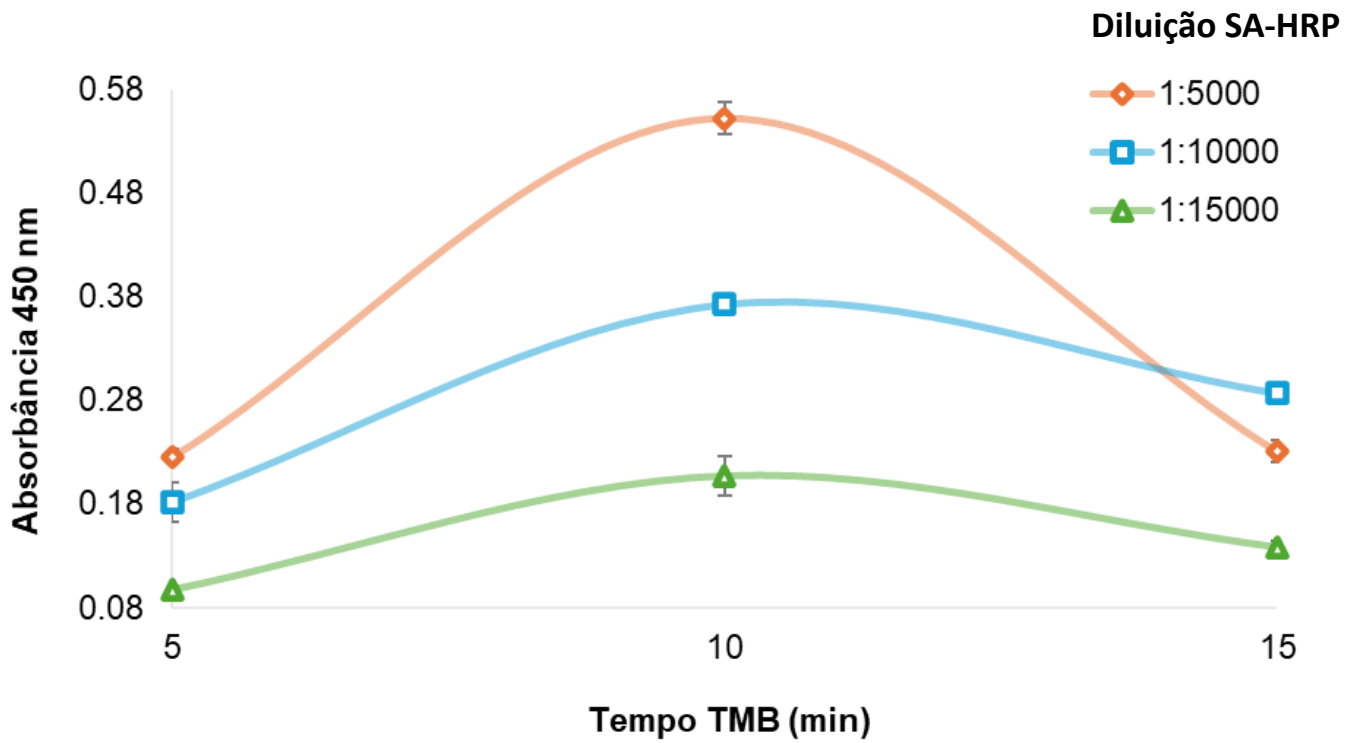
Configuração experimental	Diluição SA-HRP	Tempo de incubação TMB
1	1:15000	5 min
2	1:15000	10 min
3	1:15000	15 min
4	1:10000	5 min
5	1:10000	10 min
6	1:10000	15 min
7	1:5000	5 min
8	1:5000	10 min
9	1:5000	15 min

Resultados

LEI DE BEER (1852)

- Maior concentração → maior absorbância
- Absorbância mais alta → mais oocistos foram separados e detectados (análise mais eficaz)





- Maior a diluição SA-HRP → menor a concentração do reagente → menos oocistos são separados → menor absorbância
- Maior tempo de incubação TMB → maior absorbância <u>ATÉ A SATURAÇÃO</u>

Conclusões

- Combinação da **diluição 1:10.000 do SA-HRP** com o **tempo de incubação de 10 minutos com o substrato TMB** → segunda maior absorbância obtida (0,37298 ± 0,00742)

- Equilíbrio entre um sinal colorimétrico satisfatório com uma boa economia de reagentes e de tempo (condição experimental ótima)

- Método de detecção de oocistos de *Cryptosporidium* mais eficiente → viabilização de um monitoramento mais frequente → aumento da segurança hídrica

Agradecimentos

Encontro Técnico AESABESP
Congresso Nacional de Saneamento e Meio Ambiente

AESABESP
Associação dos Engenheiros da Sabesp

CAPES

THE ROYAL SOCIETY

EESC • USP®
São Carlos School of Engineering
University of São Paulo

Ulster University