UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA HIDRÁULICA E SANEAMENTO

FERNANDO CÉSAR ANDREOLI

Remoção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium parvum* em Água de Abastecimento Utilizando Flotação: Estudo em Escala de Bancada e Desafios de Detecção

VERSÃO CORRIGIDA
São Carlos
2016

FERNANDO CÉSAR ANDREOLI

Remoção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium parvum* em Água de Abastecimento Utilizando Flotação: Estudo em Escala de Bancada e Desafios de Detecção

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

ORIENTADORA: Profª Drª Lyda Patricia Sabogal Paz

São Carlos

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

A555r

Andreoli, Fernando César
Remoção de Giardia spp. e Cryptosporidium parvum em Água de Abastecimento Utilizando Flotação: Estudo em Escala de Bancada e Desafios de Detecção / Fernando César Andreoli; orientadora Lyda Patricia Sabogal Paz. São Carlos, 2016.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2016.

1. Giardia. 2. Cryptosporidium. 3. Tratamento de água. 4. Flotação. 5. Floculação em carbonato de cálcio. 6. Separação imunomagnética. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **FERNANDO CESAR ANDREOLI**.

Título da dissertação: "Remoção de Giardia ssp. e Cryptosporidium parvum em água de abastecimento utilizando flotação: estudo em escala de bancada e desafios de detecção".

Data da defesa: 05/09/2016.

Comissão Julgadora:	**Resultado:**
Profa. Dra. **Lyda Patricia Sabogal Paz** **(Orientadora)** (Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)	Aprovado
Profa. Dra. **Regina Maura Bueno Franco** (Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)	Aprovado
Prof. Dr. **Rodrigo Braga Moruzzi** (Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-Rio Claro)	Aprovado

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:
Profa. Associada **Maria Bernadete A. Varesche Silva**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Luis Fernando Costa Alberto**

Dedico à Sede de Sabedoria, Estrela da Manhã,

Porta do Céu, Rainha da Paz:

Nossa Senhora

Agradecimentos

Primeiramente a Deus.

Aos meus pais José e Maria.

Ao meu Irmão Fábio, minha cunhada Ana Paula e meu sobrinho Davi.

À minha namorada Érica.

À professora Lyda.

Aos amigos da Republica Sagrado Coração de Jesus: Ro, Mineiro, Felipin, Sagrado, Ed e Leandro.

Aos amigos do Ministério Universidades Renovadas - MUR, dos GOUs e do GPP.

Aos amigos do Latar, em especial Daiane, Guilherme, Paulo, Fernanda, Gabi, Maria Tereza e tantos outros amigos da pós, da graduação e da vida em São Carlos.

Aos amigos de Itirapina e a toda a minha família.

Aos funcionários e professores do SHS.

Aos membros da banca.

Ao CNPQ pela bolsa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo projeto temático (Processo nº 2012/50522-0) que forneceu as recursos à pesquisa.

À Quimisa S/A por fornecer o coagulante cloreto de polialumínio (PAC).

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível”.

São Francisco de Assis

RESUMO

ANDREOLI, F.C. (2016). **Remoção de *Giardia* spp. *e Cryptosporidium parvum* em Água de Abastecimento Utilizando Flotação : Estudo em Escala de Bancada e Desafios de Detecção**. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Esta pesquisa teve como objetivo analisar a remoção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em água de abastecimento utilizando a tecnologia de tratamento de ciclo completo com flotação (coagulação, floculação, flotação e filtração) em escala de bancada e utilizando cloreto de polialumínio – PAC como coagulante. Para isso, o método de floculação em carbonato de cálcio – FCCa com e sem a separação imunomagnética – IMS foi utilizado para quantificação dos organismos. Os resultados mostraram que as etapas de coagulação, floculação e flotação (Fase1) removeram 1,55 log de cistos de *Giardia* spp. e 1,21 log de oocistos de *Cryptosporidium* spp. O tratamento apenas com filtração (Fase 2) removeu 1,2 log de cistos de *Giardia* spp. e 0,88 log de oocistos de *Cryptosporidium* spp. A combinação dos tratamentos (Fase 3) foi capaz de remover 2,64 log de cistos de *Giardia* spp. e 2,5 log de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Na quantificação de protozoários, o método de FCCa sem IMS demonstrou ser mais econômico e com melhor recuperação do que com IMS. Também foi analisada a influência da terceira dissociação ácida no método com IMS e tal procedimento acarretou em diferenças significativas nos resultados. Mesmo atendendo aos padrões de potabilidade, o tratamento estudado não removeu completamente os protozoários, este fato demonstra a necessidade da preservação dos mananciais, do tratamento dos esgotos e da desinfecção final para maximizar as barreiras que permitam reduzir o risco microbiológico presente na água de consumo.

Palavras-chave: *Giardia*; *Cryptosporidium*; tratamento de água; flotação; floculação em carbonato de cálcio; separação imunomagnética.

ABSTRACT

ANDREOLI, F.C. (2016). **Removal of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium parvum* in Drinking Water Using Flotation: Study Bench Scale and Detection Challenges.** Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

This research aimed to analyze the removal of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in drinking water using the full cycle of treatment with flotation technology (coagulation, flocculation, flotation and filtration) at bench scale and using polyaluminum chloride - PAC as coagulant. For this, the flocculation in calcium carbonate – FCCa method with and without immunomagnetic separation - IMS was used for quantification of organisms. The results showed that the stages of coagulation, flocculation and flotation (Step 1) removed 1,55 log *Giardia* spp. and 1,21 log *Cryptosporidium* spp. oocysts. Only the treatment with filtration (Step 2) removed 1,2 log *Giardia* spp. and 0,88 log *Cryptosporidium* spp. oocysts. The combination of treatment (Step 3) was able to remove 2,64 log *Giardia* spp. and 2,5 log *Cryptosporidium* spp. oocysts. In quantifying of protozoa, the FCCa method without IMS proved to be more economical and better recovery than with IMS. It also analyzed the influence of the third acid dissociation in the method with IMS and this procedure resulted in significant differences in the results. Even taking into account the potability standards, the treatment studied didn’t completely remove protozoa, this fact demonstrates the need for preservation of water sources, treatment of sewage and final disinfection to maximize the barriers to reduce the microbiological risk present in drinking water.

Keywords: *Giardia*; *Cryptosporidium*; water treatment; flotation; flocculation of calcium carbonate; immunomagnetic separation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Seleção da tecnologia baseado na qualidade da água bruta (VALADE; BECKER; EDZWALD, 2009). 39
Figura 2 – Flotateste de coluna 40
Figura 3 – Floteste 50
Figura 4 – Esquema do tratamento por ciclo completo com flotação em escala de bancada ... 50
Figura 5 – Esquema dos passos seguidos para otimizar os parâmetros nos ensaios de tratabilidade 52
Figura 6 – Esquema do protocolo da floculação em carbonato de cálcio no ensaio de qualidade analítica do método 54
Figura 7 – Esquema simplificado dos procedimentos da IMS (MACIEL, 2014) 55
Figura 8 – Visualização de cistos de *Giardia* spp. (>400x) 56
Figura 9 – Visualização de oocisto de *Cryptosporidium* spp. (>400x) 56
Figura 10 – Divisão do tratamento em fases 58
Figura 11 – Esquema simplificado do tratamento e separação de resíduos da Fase 1 59
Figura 12 – Coleta de água clarificada na Fase 1 59
Figura 13 – Esquema simplificado da distribuição de (oo)cistos na Fase 1 60
Figura 14 – Esquema simplificado do tratamento e separação de resíduos da Fase 2 61
Figura 15 – Filtração da amostra na Fase 2 61
Figura 16 – Esquema simplificado da distribuição de (oo)cistos na Fase 2 62
Figura 17 – Esquema simplificado do tratamento e separação de resíduos da Fase 3 62
Figura 18 – Amostras de lodo (1), água filtrada (2) e água de lavagem (3) obtidas na Fase 3 63
Figura 19 – Esquema simplificado da distribuição de (oo)cistos na Fase 3 63
Figura 20 – Diagrama de coagulação para turbidez nas seguintes condições: dosagem de PAC entre 25 e 45 mg/L, Gmr = 700 s^{-1}, Tmr = 15s, Gml = 50s^{-1}, Tml = 4 min, Tf = 5min e Rec = 5% 70
Figura 21 – Diagrama de coagulação para cor aparente nas seguintes condições: dosagem de PAC entre 25 e 45 mg/L, Gmr = 700 s^{-1}, Tmr = 15s, Gml = 50s^{-1}, Tml = 4 min,Tf = 5min e Rec = 5% 71
Figura 22 – Otimização do gradiente de mistura rápida em função das condições: Tmr = 15s, Gml = 50s^{-1}, Tml = 4min, Tf = 5min e Rec = 5% para a) remoção de turbidez e b) remoção de cor aparente. 72

Figura 23 – Otimização do tempo de mistura rápida em função das condições: Gmr = 700s^{-1}, Gml = 50s^{-1}, Tml = 4min, Tf = 5min e Rec = 5% para a) remoção de turbidez e b) remoção de cor aparente. 72
Figura 24 – Otimização do gradiente de mistura lenta em função das condições: Gmr = 700s^{-1}, Tmr = 10s, Tml = 4min, Tf = 5min e Rec = 5% para a) remoção de turbidez e b) remoção de cor aparente. 73
Figura 25 – Otimização do tempo de mistura lenta em função das condições: Gmr = 700s^{-1}, Tmr = 10s, Gml = 60s^{-1}, Tf = 5min e Rec = 5% para a) remoção de turbidez e b) remoção de cor aparente. 73
Figura 26 – Otimização do tempo de flotação em função das condições: Gmr = 700s^{-1}, Tmr = 10s, Gml = 60s^{-1}, Tml = 4min e Rec = 5% para a) remoção de turbidez e b) remoção de cor aparente. 74
Figura 27 – Otimização da taxa de recirculação em função das condições: Gmr = 700s^{-1}, Tmr = 10s, Gml = 60s^{-1}, Tml = 4min e Tf = 10min para a) remoção de turbidez e b) remoção de cor aparente. 74
Figura 28 – Curvas de flotação para turbidez (a) e cor aparente (b) 75
Figura 29 – *Pellet* das amostras de água clarificada (a) e do lodo flotado (b), após centrifugação 89
Figura 30 - Lâmina com alíquotas de lodo (a) e água clarificada (b) 90
Figura 31 – Visualização, fluorescência, de (oo)cistos em amostra de lodo flotado (400x) ... 92
Figura 32 – Lâmina com alíquotas de água filtrada (a) e água de lavagem dos filtros (b) 96
Figura 33 – Visualização, fluorescência, de (oo)cistos em amostra de água de lavagem (400x) 102
Figura 34 – Influência do número de dissociações ácidas na recuperação dos (oo)cistos no lodo flotado 113
Figura 35 – Influência do número de dissociações ácidas na recuperação dos (oo)cistos na água de lavagem dos filtros 114
Figura 36 – Influência do número de dissociações ácidas na recuperação dos (oo)cistos na água filtrada 115
Figura 37 – Efeito do número de dissociações ácidas sobre o número acumulado de oocisto em água deionizada (CHANG et al., 2007) 116
Figura 38 – Visualização de cistos de *Giardia* spp. em matriz lodo flotado (>400x) 118
Figura 39 – Visualização de cistos de *Cryptosporidium* spp. em matriz lodo flotado (>400x) 119

Figura 40 – Visualização de cistos de *Giardia* spp. em matriz água de lavagem dos filtros (>400x) 120
Figura 41 – Visualização de cistos de *Cryptosporidium* spp. em matriz água de lavagem dos filtros (>400x) 121
Figura 42 – Visualização de cistos de *Giardia* spp. em matriz água filtrada (>400x) 122
Figura 43 – Visualização de cistos de *Cryptosporidium* spp. em matriz água filtrada (>400x) 123
Figura A1 – Esquema do floteste 141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características da água de lavagem dos filtros segundo alguns autores.....42
Tabela 2: Considerações sobre os testes de hipóteses adotados para comparar as recuperações dos métodos analíticos utilizados (FCCa com e sem IMS).....64
Tabela 3: Considerações sobre os testes de hipóteses adotados para comparar as proporções de (oo)cistos detectados nos resíduos de cada ensaio 65
Tabela 4: Considerações sobre os testes de hipóteses adotados para comparação entre as recuperações com duas e três dissociações ácidas 65
Tabela 5: Preparo da água de estudo 67
Tabela 6: Caracterização da água de estudo.....68
Tabela 7: Melhores resultados nos diagramas de coagulação 69
Tabela 8: Parâmetros de tratabilidade otimizados.....75
Tabela 9: Características da água de estudo tratada 76
Tabela 10: Características das águas clarificada e filtrada e dos resíduos gerados no floteste 77
Tabela 11: Contagem das suspensões de Giardia spp. e Cryptosporidium spp.....79
Tabela 12: Resultados do controle de qualidade analítica do método de FCCa sem IMS utilizando as suspensões de Giardia spp. e Cryptosporidium spp. 79
Tabela 13: Ensaio inicial de qualidade analítica do método com AccuSpike® 80
Tabela 14: Ensaio final de qualidade analítica do método de FCCa sem IMS e com AccuSpike®.....81
Tabela 15: Contagem das suspensões de Giardia spp. e Cryptosporidium spp.....82
Tabela 16: Resultados do controle de qualidade analítica do método de FCCa com IMS utilizando as suspensões de Giardia spp. e Cryptosporidium spp. 83
Tabela 17. Ensaio final de qualidade analítica do método de FCCa com IMS e com Easy-Seed® 84
Tabela 18 – Recuperações de (oo)cistos entre os métodos de qualidade testados (FCCa com e sem IMS). 85
Tabela 19: Dados dos testes de hipóteses segundo as considerações da Tabela 2 86
Tabela 20: Valores orçados dos materiais utilizados, para uma única amostra, em 1 de abril de 2016 87
Tabela 21: Custo médio do teste de qualidade analítica do método de FCCa com e sem IMS, em 1 de abril de 2016, com dados atualizados utilizando o índice IGP-M (FGV) 88
Tabela 22: Contagem das suspensões para o primeiro ensaio da Fase 1.....89

Tabela 23: Contagem dos (oo)cistos no primeiro ensaio da Fase 1 89
Tabela 24: Contagem das suspensões, ensaio em triplicata da Fase 1, utilizando o método de FCCa sem IMS 90
Tabela 25: Contagem dos (oo)cistos presentes na água clarificada e no lodo flotado, ensaio em triplicata da Fase 1, utilizando o método de FCCa sem IMS 91
Tabela 26: Contagem das suspensões, ensaio em triplicata da Fase 1, utilizando FCCa com IMS. 92
Tabela 27: Contagem dos (oo)cistos presentes na água clarificada e no lodo flotado, ensaio em triplicata da fase 1, utilizando FCCa com IMS 93
Tabela 28: Distribuição dos protozoários na Fase 1, em função do método adotado (com ou sem IMS) 94
Tabela 29: Contagem das suspensões para o ensaio inicial da Fase 2 96
Tabela 30: Contagem dos (oo)cistos presentes na água filtrada e na água de lavagem dos filtros, ensaio inicial da Fase 2, utilizando o método de FCCa sem IMS 96
Tabela 31: Contagem das suspensões, ensaio em triplicata da Fase 2, utilizando o método de FCCa sem IMS 97
Tabela 32: Contagem dos (oo)cistos presentes na água filtrada e na água de lavagem dos filtros, ensaio em triplicata da Fase 2, utilizando o método de FCCa sem IMS (continua) 97
Tabela 32: Contagem dos (oo)cistos presentes na água filtrada e na água de lavagem dos filtros, ensaio em triplicata da Fase 2, utilizando o método de FCCa sem IMS (Continuação): 98
Tabela 33: Contagem das suspensões, ensaio em triplicata da Fase 2, FCCa com IMS 98
Tabela 34 Contagem dos (oo)cistos presentes na água filtrada e na água de lavagem dos filtros, ensaio em triplicata da Fase 2, utilizando o método de FCCa com IMS 99
Tabela 35: Distribuição dos protozoários, no tratamento, na Fase 2 100
Tabela 36: Contagem das suspensões, ensaio em triplicata da Fase 3, utilizando FCCa sem IMS 102
Tabela 37: Contagem dos (oo)cistos presentes na água filtrada, na água de lavagem dos filtros e no lodo flotado, ensaio em triplicata da Fase 3, utilizando FCCa sem IMS (continua)..... 103
Tabela 37 Contagem dos (oo)cistos presentes na água filtrada, na água de lavagem dos filtros e no lodo flotado, ensaio em triplicata da Fase 3, utilizando FCCa sem IMS(Continuação) 104
Tabela 38: Contagem das suspensões, ensaio em triplicata da Fase 3, utilizando o protocolo de FCCa com IMS 104

Tabela 39 Contagem dos (oo)cistos presentes na água filtrada, na água de lavagem dos filtros e no lodo flotado, ensaio em triplicata da Fase 3, utilizando FCCa com IMS (continua)..... 105
Tabela 39 Contagem dos (oo)cistos presentes na água filtrada, na água de lavagem dos filtros e no lodo flotado, ensaio em triplicata da Fase 3, utilizando FCCa com IMS (Continuação) 106
Tabela 40: Distribuição dos protozoários ao longo do tratamento na Fase 3..... 107
Tabela 41: Eficiências dos ensaios de tratabilidade para remoção de (oo)cistos em Log_{10} ... 108
Tabela 42: (oo)cistos retidos nos resíduos dos ensaios de tratabilidade, em log_{10}..... 109
Tabela 43: Resultados dos cálculos para os testes de hipóteses segundo as considerações da Tabela 3 111
Tabela 44: Resultados do teste de hipóteses visando comparar as recuperações com duas e três dissociações ácidas, segundo as considerações da Tabela 43 117
Tabela 45: Custo médio de uma aplicação do método de FCCa com e sem IMS, em 1 de abril de 2016, com dados atualizados pelo índice IGP-M (FGV) 125
Tabela 1B: Volume de reagentes, em mL, utilizados para cada água/resíduo no método de FCC..... 143

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COT – Carbono orgânico total

CV – Coeficiente de variação (desvio padrão relativo)

DAPI – 4’,6-diamino-2fenil-indol

DIC - Contraste interferencial diferencial

DPBS - Solução salina fosfato-tamponada dulbecco

ETA – Estações de Tratamento de Água

FAD – Flotação por ar dissolvido

FCCa – Floculação em Carbonato de Cálcio

FM – Fator de Multiplicação

Gml – Gradiente de velocidade de mistura lenta

Gmr – Gradiente de velocidade de mistura rápida

IMS – Separação Imunomagnética

MPC-1 – Concentrador de partículas magnéticas 1

MPC-2 – Concentrador de partículas magnéticas 2

PAC – Cloreto de Polialumínio

PBS – Solução salina de fosfato

PCR – Método de Reação em Cadeia de Polimerase

Rec – Taxa de recirculação

Tf – Tempo de flotação

TLP- Tubo de lado plano

Tml – Tempo de mistura lenta

Tmr – Tempo de mistura rápida

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

USEPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

UV – Ultra-Violeta

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA 27
2- OBJETIVO 29
2.1 – Objetivos específicos 29
3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 31
3.1 – Características dos protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium* 31
3.2- Tratamento de água por ciclo completo 34
3.3- Princípios da flotação 37
3.4 – Características dos resíduos de ETA com flotação 40
3.5 – Remoção de protozoários em ETA 43
3.6 – Avaliação de protozoários em águas e resíduos de ETA 46
4- METODOLOGIA 49
4.1 – Preparo da água de estudo 49
4.2 – Ensaios de tratabilidade 49
4.3 – Coleta e caracterização de resíduos 53
4.4 – Métodos de avaliação de protozoários 53
4.5 – Testes de qualidade analítica do método 56
4.6 – Ensaios de tratabilidade com protozoários 58
4.6.1 – Fase 1 59
4.6.2 – Fase 2 60
4.6.3 – Fase 3 62
4.7- Análise dos resultados 63
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO 67
5.1 – Preparo da água de estudo 67
5.2 – Ensaios de tratabilidade 68
5.2.1 – Diagramas de coagulação 68
5.2.2 – Otimização dos parâmetros de tratabilidade 72
5.2.3 – Curvas de flotação 75
5.3 – Coleta e caracterização das fases líquida e sólida do tratamento em floteste 76
5.4- Ensaios de qualidade do protocolo adotado para detecção de (oo)cistos 78
5.4.1- Floculação em Carbonato de Cálcio – FCCa sem IMS 78
5.4.2- Floculação em Carbonato de Cálcio – FCCa com IMS 82
5.4.3 Comparação entre os métodos de FCCa com e sem IMS 85

5.5- Ensaios de tratabilidade com protozoários 88
5.5.1- Fase 1 – Coagulação, floculação e flotação 88
5.5.2- Fase 2 – Eficiência da filtração 95
5.5.3- Fase 3 – União das fases 1 e 2 representando o tratamento por ciclo completo 102
5.5.4 - Comparação entre as Fases 1, 2 e 3 108
5.6 - Influência da terceira dissociação ácida nos ensaios com IMS 112
5.7 – Custo dos ensaios de FCCa com e sem IMS em amostras ambientais 124
6- CONCLUSÕES 127
7- RECOMENDAÇÕES PARA ESTUDOS FUTUROS 129
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 131
APÊNDICES 141
APÊNDICE A – Protocolo do ensaio de tratabilidade realizado 141
APÊNDICE B – Protocolo de Floculação em carbonato de cálcio 143
APÊNDICE C – Protocolo de Purificação com IMS 145
APÊNDICE D – Procedimentos utilizados para montagem das lâminas 147
ANEXOS 149
ANEXO A – Informações técnicas do PAC utilizado 149
ANEXO B – Informações sobre as suspensões de protozoários utilizadas 150
ANEXO C – Informações sobre o kit AccuSpyke® 151
ANEXO D – Informações sobre o kit Easyseed™ 152
ANEXO E – Orçamentos dos reagentes utilizados para análises de protozoários 153

1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A degradação da qualidade dos mananciais devida, principalmente, ao lançamento de efluentes domésticos sem tratamento adequado tem causado, entre outros fatores, a presença de microrganismos emergentes como os protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., que apresentam um grande problema para a saúde publica. A criptosporidiose e a giardíase são doenças caracterizadas por causarem diarreias que podem trazer séria morbidade.

O estudo desses microrganismos na água de abastecimento no Brasil é ainda pouco realizado, apesar da Portaria nº 2914/2011 obrigar a necessidade de monitoramento de cistos de G*iardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp., quando detectada média geométrica anual maior ou igual a 1000 *Escherichia coli*.100mL^{-1} na captação. Historicamente, os serviços de abastecimento no país foram voltados para atender a demanda de quantidade de água e, em relação à qualidade, muitas vezes se limitou a atender apenas os aspectos econômicos e a remoção de parâmetros estéticos. Assim, é relevante verificar se as tecnologias de tratamento de água usualmente empregadas removem com eficiência esses microrganismos emergentes.

Entre as alternativas de tratamento de água utilizadas, o ciclo completo com flotação possui grande capacidade de remoção de cor verdadeira, muitas vezes associada à presença de algas nos mananciais. Com o aumento da eutrofização dos corpos d' água, pode-se supor a tendência de maior utilização dessa tecnologia.

A correta disposição dos resíduos gerados nas estações de tratamento de água – ETA apresenta um grande desafio para as instituições que gerenciam tais sistemas, tanto do ponto de vista qualitativo como quantitativo. No Brasil, é comum o despejo desses resíduos em rios. Dessa forma, assumindo que sob esses resíduos estão presentes os (oo)cistos retidos nos processos de tratamento, a disposição inadequada dos lodos de ETA acaba apresentando um risco microbiológico à população exposta.

Em certas ETA é comum retornar ao sistema a água utilizada para a lavagem dos filtros. Tal pratica possui um risco associado, tendo em vista que os (oo)cistos removidos pelos filtros poderão circular e se acumular no sistema continuamente.

Infelizmente, existe grande dificuldade para alcançar a remoção/inativação satisfatória de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. das águas de consumo. Tais patógenos podem sobreviver por longos períodos em ambientes desfavoráveis e possuem forte resistência aos métodos tradicionais de desinfecção por cloração.

Além disso, os métodos existentes para a quantificação de (oo)cistos apresentam grande complexidade, exigindo qualificação específica e um alto custo. Igualmente, geram uma alta dependência de empresas e de padrões estrangeiros. Considerando a realidade dos municípios brasileiros, onde ainda nem todos possuem rede de abastecimento de água e muitos com tratamento insipiente, quantificar e remover protozoários torna-se um grande desafio.

Assim, com base no cenário exposto, a presente pesquisa avaliou, através de simulação em escala de laboratório, a remoção de (oo)cistos de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em água de abastecimento utilizando a tecnologia de ciclo completo com flotação e tendo o cloreto de polialumínio – PAC como coagulante. Também foram ponderadas duas propostas de protocolo analítico de detecção de protozoários: concentração por floculação em carbonato de cálcio –FCCa com e sem a separação imunomagnética –IMS.

2- OBJETIVO

Avaliar a remoção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em todas as fases do tratamento envolvendo ciclo completo com flotação em escala de bancada.

2.1 – Objetivos específicos

- Avaliar a remoção de (oo)cistos na água de estudo e a deposição dos mesmos no resíduo (lodo flotado) após coagulação, floculação e flotação;
- Avaliar a remoção de (oo)cistos na água de estudo clarificada e a acumulação dos mesmos no resíduo (água de lavagem) após a filtração;
- Analisar as perdas de (oo)cistos quando comparadas as entradas (inoculados) e saídas (detectados nos resíduos e águas tratadas) de organismos no sistema de tratamento;
- Ponderar o método de floculação em carbonato de cálcio com e sem separação imunomagnética na detecção de (oo)cistos nas águas e nos resíduos estudados;
- Ponderar a influência da terceira dissociação ácida no método de detecção utilizando separação imunomagnética;
- Analisar os custos envolvidos na utilização dos métodos.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 – Características dos protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium*

O protozoário *Giardia*, relatado em 1681 pelo pesquisador Anton van Leeuwenhoek, é um dos principais responsáveis pelas infecções entéricas causadas no mundo todo (ADAM, 2000).

Segundo Plutzer, Ongerth e Karanis (2010), o gênero *Giardia* pertence ao filo Metamonada, subfilo Trichozoa, superclasse Eopharyngia, classe Trepomonadea, subclasse Diplozoa, ordem Giardiida e família Giardiidae.

De acordo com Neves et al. (2004), *Giardia* é um parasito do intestino delgado de mamíferos, aves, répteis e anfíbios. O protozoário apresenta duas formas evolutivas: trofozoíto e cisto. O trofozoíto tem formato de pera, com simetria bilateral e mede cerca de 20µm de comprimento por 10µm de largura. O cisto é oval ou elipsoide, medindo cerca de 12µm de comprimento por 8µm de largura e, quando corado, pode mostrar uma delicada membrana destacada do citoplasma.

A espécie *Giardia duodenalis* (sinonímia de *Giardia intestinalis* e *Giargia lambria*) é a única que pode ser encontrada em humanos, comum em países desenvolvidos ou em desenvolvimento (CACCIÒ; SPRONG, 2011).

Em humanos um pequeno número de cistos (de 10 a 100) já é suficiente para produzir a infecção chamada de giardiose. Após a ingestão do cisto acontece o desencistamento, onde o intestino delgado torna-se colonizado pelos trofozoítos que se multiplicam e completam o ciclo com o encistamento do parasito e sua eliminação para o meio exterior. Os cistos são resistentes e, em condições favoráveis de temperatura e umidade, podem sobreviver, pelo menos, dois meses no meio ambiente (NEVES et al., 2004).

A transmissão em humanos de *Giardia* pode ocorrer por contato pessoa-a-pessoa ou animal-a-pessoa, também a contaminação do ambiente pode levar à contaminação de águas de abastecimento e alimentos. Já a infecção acontece exclusivamente pela ingestão de cistos, na água ou em alimentos, e por ingestão acidental devido ao contato direto em situações de higiene insuficiente ou em relações sexuais (CACCIÒ; SPRONG, 2011).

Embora na maior parte dos casos a infecção é considerada assintomática, alguns indivíduos podem apresentar diarreia, dores abdominais, vômitos, entre outros problemas. Os maiores riscos acontecem com crianças e pessoas imunodeficientes. Neves et al. (2004) alerta que a giardíase, nos países em desenvolvimento, é uma das causas mais comuns de diarreia

entre crianças que em consequência da infecção, muitas vezes, apresentam problemas de má nutrição e retardo no desenvolvimento.

O protozoário *Cryptosporidium* foi descrito por Ernest E. Tyzzer no início do século 20 e a primeira infecção humana pelo parasito foi registrada em 1976 (LEITCH; HE, 2011).

O gênero *Cryptosporidium* pertence ao reino Chromalveolata, filo Apicomplexa, classe Conoidasida, ordem Coccidia e sub ordem Eucoccidiorida. Recentemente, percebeu-se que o gênero *Cryptosporidium* apresenta algumas particularidades em seu ciclo de vida que diferenciam dos outros coccídios e aproximam das características dos gregarinas (RYAN; XIAO, 2014).

Segundo Xiao e Fayer (2008) existe alta diversidade biológica entre as espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, que diferenciam a forma de infectar os hospedeiros e a prevalência das infecções variam com a localização geográfica.

Em humanos a ingestão de apenas 9 oocistos de *Cryptosporidium parvum* já é suficiente para que o indivíduo se infecte (OKHUYSEN et al., 1999). As variadas espécies desse organismo também podem infectar peixes, anfíbios, répteis, aves e outros mamíferos. Ambas são intracelulares e, quando fora do hospedeiro, existem na forma de oocisto (FAYER, 2004).

De acordo com WHO (2006), os oocistos de *Criptosporidium* spp. possuem formato de esférico a ovoide, medem de 3 a 8,5 µm e a composição da sua parede (dupla e espessa) permite alta resistência ambiental. Em ambientes frios e úmidos, chegam a permanecer infecciosos por mais de seis meses na água.

Quando há contaminação do solo por oocistos de *Cryptosporidium* spp., existe também o risco de contaminação da água subterrânea. Zilberman et al. (2009) afirma que a contaminação das águas subterrâneas por oocistos é um grande problema, apesar da crença comum de que tais águas estão protegidas pela filtração nas camadas superiores do solo.

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2010b), a criptosporidiose é uma infecção causada por protozoário e é responsável por diarreia em indivíduos de todas as idades. Em pessoas imunocomprometidas, como os portadores de HIV, pode desenvolver diarreia crônica e severa, chegando ao óbito. A transmissão pode ocorrer via fecal-oral ou pela ingestão de alimentos ou água contaminados por oocistos.

Giardia e *Cryptosporidium* são responsáveis por grande parte dos surtos associados à transmissão de protozoários por via hídrica. No Canadá, por exemplo, de 155 surtos registrados 33% foram causados por *Giardia* e 8% por *Cryptosporidium* (SCHUSTER et al.,

2005). Há também relatos, em outras localidades, de que juntos, tais patógenos provocaram cerca de 90% dos casos registrados (KARANIS e KOURENTI, 2004).

Em 1993, houve um surto de criptosporidiose em Milwaukee, nos Estados Unidos, tal evento teve grande repercussão, visto que cerca de 400.000 pessoas apresentaram os sintomas da doença, 4400 foram hospitalizadas e 100 portadoras do vírus HIV foram a óbito (MACKENZIE et al., 1994). Cardoso et al.(2002) apontam que surtos, como esse, detectados nas décadas de 80 e 90 nos Estados Unidos ocorreram em comunidades abastecidas com água tratada, seguindo os padrões de potabilidade locais. Tal fato indica que as estações de tratamento de água não conseguiram garantir continuamente a remoção completa desses protozoários na água de abastecimento.

Em 2004, houve um surto de giardiose em Bergen, na Noruega, mais de 1200 casos foram confirmados e muitos sintomas da doença permaneceram nos indivíduos afetados mesmo depois de passados dois anos do evento (MORCH et al., 2009). Tal fato revela que a simples eliminação do parasito não cessa o problema.

Em 2007, 63% da população abastecida por um poço de água subterrânea, nos Estados Unidos, adquiriram giardiose. Posteriormente se revelou que fonte de contaminação vinha do poço, o qual não estava em cumprimento com a legislação local (DALY et al., 2010). Também em 2012, aconteceu um surto de criptosporidiose em Seul, na Coréia do Sul, com os residentes de um condomínio. Neste caso, a água distribuída aos apartamentos era armazenada em um tanque subterrâneo, onde fora contaminada com esgoto do tanque séptico do condomínio (CHO et al., 2013). Esses eventos mostram que a responsabilidade de evitar as contaminações por protozoários não deve ser apenas do sistema de tratamento e de distribuição de água municipal, mas também dos sistemas individuais e condominiais.

Quando o tratamento de água não remove totalmente esses microrganismos, a população abastecida torna-se alvo fácil para os surtos que alteram sua rotina e impactam na qualidade de vida. Exemplo disso foi o surto de criptosporidiose na Suécia em 2011, onde os mais de 6000 casos com sintomas da doença, dos quais cerca de 150 diagnosticados, obrigaram à população a ferver a água por meses (MANSER et al., 2014).

No Brasil ainda há poucos estudos com relação à ocorrência de protozoários em água de abastecimento, embora avanços nos estudos de detecção desses organismos tenham acontecido. Infelizmente ainda existem dificuldades na comprovação dos surtos devido à falta de dados devidamente documentados e de pesquisas científicas sobre o assunto (FRANCO, 2007).

Estudos realizados no nordeste brasileiro encontraram giardiose em 25% de crianças (n=189) de uma favela em Fortaleza – CE (KOHLI et al., 2008). Tal fato pode estar ligado às deficiências de saneamento nessas localidades.

Segundo Franco et al.(2012), os surtos ocorridos no Brasil até o momento, na maioria são de transmissão por contato interpessoal. Por enquanto, não foram encontrados registros de surtos de giardíase e criptosporidiose devidamente documentados pela veiculação hídrica.

Apesar disso, o risco de ocorrência desses surtos no país pode existir, visto que há muitas pesquisas que relatam a presença de protozoários potencialmente patógenos nos mananciais brasileiros. Como, por exemplo, no rio Atibaia, onde foram registradas presenças de *Giardia* e *Cryptosporidium* (CANTUSIO NETO et al., 2010).

Em alguns casos, mesmo com a existência do tratamento de esgotos domésticos, os microrganismos não são completamente removidos e são despejados juntamente com o efluente tratado nos corpos hídricos, aumentando os riscos de contaminação dos mananciais. Segundo Lim, Wan Hafiz e Nissapatorn (2007) existe necessidade de repensar sobre a contaminação de (oo)cistos nas bacias hidrográficas.

Para se adequar à questão dos riscos dos protozoários, a última atualização da legislação brasileira que descreve os padrões de potabilidade da água, Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde, incluiu em seu texto a obrigação da detecção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em amostras de água.

3.2- Tratamento de água por ciclo completo

Entre os tipos de ETA, a tecnologia de ciclo completo é a mais utilizada no Brasil. Segundo a Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (IBGE, 2010), entre os municípios que possuem tratamento de água, 54% utilizam esse tipo de tratamento. Porém, em termos de volume, tal tecnologia responde por cerca de 70% da água tratada no país.

O ciclo completo consiste, basicamente, no conjunto dos seguintes processos e operações: coagulação, floculação, decantação ou flotação, filtração. Após tal tratamento, também são realizados os processos de desinfecção e ajuste do pH.

Coagulação

Segundo Di Bernardo e Dantas (2005), o processo de coagulação consiste na desestabilização das partículas coloidais. A adição de coagulante na água a ser tratada realiza

reações químicas que formam espécies hidrolisadas com carga positiva, com isso, a alta movimentação da água permite o contato dessas espécies com as impurezas presentes, aglomerando-as. Os principais mecanismos da coagulação são: compressão da dupla camada, neutralização-adsorção de cargas, varredura e formação de pontes.

De acordo com Guimarães (2007), o mecanismo de coagulação mais recomendado para a flotação é aquele próximo ao de neutralização-adsorção de cargas, que permite economia no consumo de coagulante e para a decantação recomenda-se o mecanismo de varredura.

Os principais parâmetros relacionados à coagulação são o gradiente médio de velocidade e o tempo de coagulação.

Entre os coagulantes utilizados, destaca-se o cloreto de polialumínio – PAC, cada vez mais frequente no tratamento de água no Brasil. Produzido a partir da bauxita (Al_2O_3) com adição de base forte, o PAC apresenta vantagens em relação aos outros coagulantes, tais como menor geração de lodo (FERREIRA FILHO e WAELKENS, 2009) e maior eficiência (PAVANELLI, 2001).

Di Bernardo, Dantas e Voltan (2011) recomendam a confecção de diagramas de coagulação para definir as condições de tratabilidade da água. Esses diagramas relacionam os parâmetros monitorados, após diversos ensaios de tratabilidade, em gráficos com curvas de isoeficiência. Normalmente, os valores do pH de coagulação estão no eixo das abscissas e a dosagem de coagulante no eixo das ordenadas, marcando no interior do diagrama todos os pontos com seus respectivos valores de tratabilidade; assim, é possível traças curvas para delimitar as regiões de melhor eficiência.

Floculação

Na floculação, as impurezas presentes na água, previamente desestabilizadas pela coagulação, agregam-se para formar flocos, os quais serão removidos nas unidades posteriores.

Yoon e Deng (2004) alertam que uma agitação inadequada pode provocar a ruptura dos flocos e, consequente, alteração na eficiência do tratamento.

Kawamura (2000) afirma que, dependendo dos processos seguintes à floculação (decantação ou flotação), existem algumas diferenças no tamanho dos flocos. Para a flotação são necessários flocos menores e mais leves, para isso demandam de mais energia (gradiente

de velocidade) e menor tempo de floculação, em comparação com os flocos produzidos na decantação.

Os principais parâmetros relacionados à floculação são o gradiente médio de velocidade e o tempo de floculação.

Clarificação

A clarificação é a primeira barreira de remoção do tratamento de ciclo completo, tal operação consiste em separar da água os flocos formados pelas etapas anteriores através de decantação ou flotação.

Na decantação, os flocos são separados devido à ação da gravidade. Por apresentarem massa específica maior que a do líquido, os sólidos realizam movimento descendente e se sedimentam no fundo das unidades, formando o lodo.

A flotação consiste na clarificação da água através da introdução de microbolhas de ar que colidem e aderem-se aos flocos presentes na água, arrastando-os ascendentemente. Os princípios dessa tecnologia serão descritos no item 3.3.

Filtração

A filtração tem grande importância no tratamento em uma ETA, responsável pelo polimento da água. Na unidade as partículas suspensas e coloidais, que ainda estão presentes na água mesmo após os processos e operações anteriores, são retidas através da passagem da água por um meio poroso.

A taxa de filtração é um dos principais parâmetros de projeto e, após determinado tempo de operação, lavagens nos filtros são necessárias para desobstrução dos poros.

Em estudos com filtração direta ascendente e descendente, Di Bernardo et al. (2002) demonstraram que a hidrofobicidade das partículas a serem filtradas tem grande relevância na eficiência de remoção, visto que partículas hidrofóbicas tem maior afinidade de aderência do que as partículas hidrofílicas.

Segundo Freitas et al. (2010) a água utilizada para lavagem dos filtros chega a ser 5% ou mais do volume total da água tratada. Para minimizar a geração de resíduos e economizar água, tem crescido a prática de retorno da água de lavagem ao sistema de tratamento, promovendo sua recirculação. Tal atividade pode conter riscos associados à acumulação de organismos patógenos, como descrito no item 3.5.

Desinfecção

Apesar dos processos e operações de tratamento anteriores, é possível que ainda existam organismos patógenos na água tratada. Para eliminar esse risco, a desinfecção tem a finalidade de inativar tais organismos e garantir a segurança da população abastecida.

Para isso, entre os principais parâmetros de projeto estão a dosagem de desinfetante e o tempo de contato do mesmo com a água. Alguns dos principais agentes químicos de desinfecção são o cloro gasoso, o hipoclorito de sódio ou de cálcio e o ozônio e os principais agentes físicos são a radiação ultravioleta – UV, o calor e a radiação solar.

Além disso, a Portaria nº 2.914/2011 indica a necessidade de residual do agente desinfetante na água de consumo (0,2 $mg.L^{-1}$ para cloro residual livre) visando manter a qualidade da água até a torneira do consumidor, reduzindo, assim, os eventuais riscos de contaminação pelo transporte ou armazenamento da água após tratada.

3.3- Princípios da flotação

A separação promovida pela flotação consiste na introdução de bolhas de ar em uma suspensão contendo partículas (que podem ser flocos, metais, microrganismos, etc.), as quais se objetiva remover do líquido a ser tratado. Tais sólidos se aderem às bolhas que os arrastam e os concentram formando uma camada na superfície que pode então ser removida.

Esta tecnologia pode ser utilizada para diversos fins, como na mineração, no tratamento de efluentes, nos processos industriais, na clarificação *in situ* de mananciais e no tratamento de água.

Para que ocorra a flotação, entre os principais fatores existem a tensão superficial do meio de dispersão e o ângulo de contato formado entre as bolhas e as partículas (SOUSA et al., 2003). O ângulo de contato pode ser usado como uma medida de hidrofobicidade das partículas. Sendo que, superfícies hidrofílicas apresentam ângulo menor que 90º e superfícies hidrofóbicas possuem ângulo maior que 90º.

Assim, na flotação, partículas hidrofóbicas aderem-se às bolhas de ar com mais afinidade do que as hidrofílicas. Pois quanto maior o ângulo de contato, mais a tensão superficial da água “expulsa” a partícula do líquido e promove a adesão da partícula na superfície da bolha (VENDITTI, 2004).

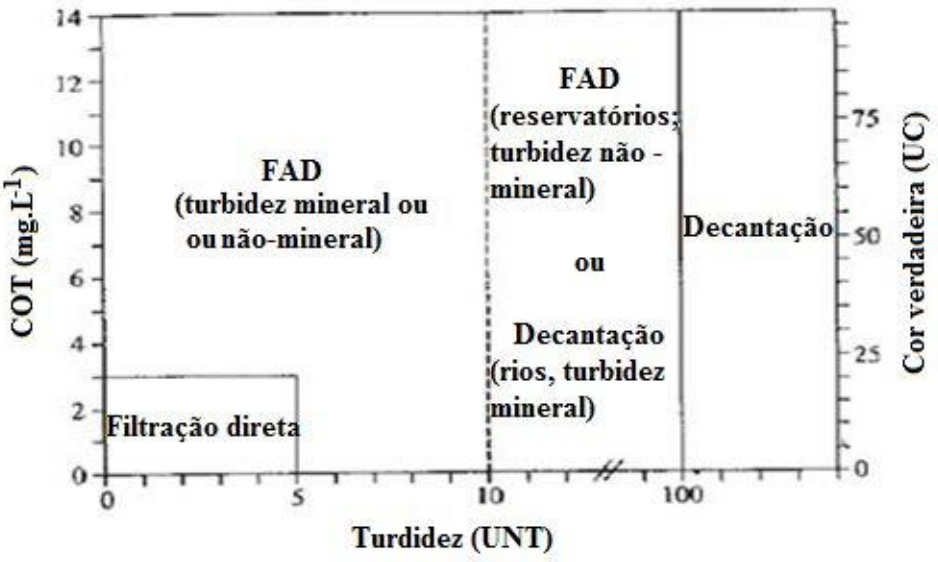
O aglomerado floco-bolha geralmente é formado pela colisão da bolha com a partícula, pelo contato ou aprisionamento das bolhas nos flocos e pelo crescimento das bolhas entre os flocos. Tais mecanismos podem ocorrer simultaneamente durante a flotação (HAHN, 1982).

Os principais tipos de flotação, em relação à produção de microbolhas são: flotação por ar disperso, flotação eletrostática e flotação por ar dissolvido – FAD (AWWA, 2002).

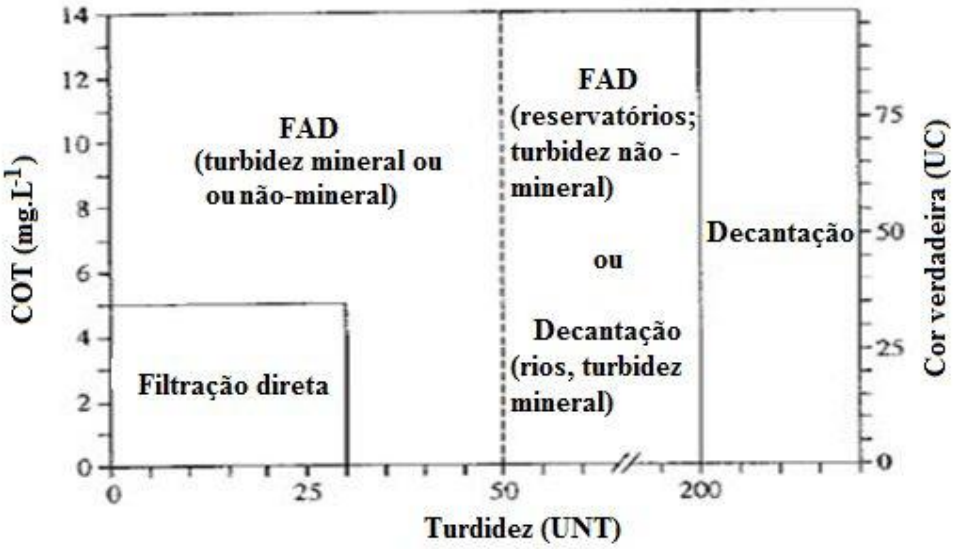
Na técnica de FAD as microbolhas são produzidas reduzindo a pressão da água saturada com ar. Os principais tipos de FAD são: flotação a vácuo, microflotação e flotação pressurizada, sendo este último o mais utilizado (DI BERNARDO; DANTAS, 2005).

Na flotação pressurizada, a pressurização pode ser realizada no afluente de forma parcial ou total e, também, na recirculação. Nesta ultima, parte da água tratada é bombeada para a unidade de saturação onde o ar é adicionado sobre pressão e dissolvido. Com isso, a água saturada é, então, introduzida na zona de contato do tanque de FAD; assim, a mudança repentina de pressão provoca a formação de microbolhas de ar.

Para a escolha da tecnologia de FAD considerando a qualidade da água bruta, Valade, Becker e Edzwald (2009) indicaram os diagramas da Figura 1.



a) condições médias



b) condições máximas

Figura 1- Seleção da tecnologia baseado na qualidade da água bruta (VALADE; BECKER; EDZWALD, 2009).

A Figura 1 indica que a flotação pode ser recomendada em águas com turbidez de até 200 UNT com cor verdadeira e carbono orgânico total – COT altos.

Edzwald e Harrhoff (2011) citam diversas razões para a escolha da FAD na clarificação da água ao invés da decantação, principalmente para o tratamento de águas de consumo. Entre elas estão a alta remoção de algas, patógenos, cor, gosto e odor, o lodo mais concentrado e os menores volumes em planta dos tanques de flotação comparados aos decantadores.

Porém, em relação aos custos envolvidos, Kawamura (2000) mostra que os equipamentos utilizados, tanto para o sistema de saturação do ar quanto para o de remoção de lodo, trazem um acréscimo considerável de custos na instalação, manutenção e operação. Dessa forma, a FAD tende a demandar gastos mais elevados quando comparada com ETA similar envolvendo decantação.

O tratamento por flotação pode ser simulado através de ensaios em escala de bancada, assim é possível obter de forma mais rápida e econômica alguns parâmetros de projeto. O aparelho floteste pode ser utilizado para tal fim, sendo constituído por câmara de pressurização, jarros, conjuntos de dosagem e de coleta e motor agitador. Em alguns casos o floteste permite a instalação de filtros de laboratório visando simular o tratamento completo, da coagulação até a filtração.

Entre as variáveis possíveis de serem estudadas em escala de bancada, mais especificamente para a tecnologia FAD, Edzwald e Harrhoff (2011) recomendam o tempo de floculação de 5 a 20 min, o tempo de flotação de 10 min, a pressão de saturação de 400 a 600 kPa e a taxa de recirculação de 6 a 12 %. A velocidade de flotação não pode ser obtida em floteste de bancada devido à limitada altura dos jarros.

A velocidade de flotação pode ser estimada através de ensaios com o aparelho conhecido como flotateste de coluna. Tal equipamento (Figura 2), modificado por Reali (1991), apresenta colunas de flotação maiores e com melhor distribuição das bolhas em relação ao floteste. Assim, é possível realizar a curva de flotação relacionando as taxas de flotação aos parâmetros de controle.

Figura 2 – Flotateste de coluna

3.4 – Características dos resíduos de ETA com flotação

A tecnologia de ciclo completo com flotação necessita da aplicação de coagulante para que ocorra a formação de flocos, permitindo assim a remoção das impurezas e compatibilizando a qualidade da água com o padrão de potabilidade exigido. Sendo um sistema, as impurezas que entram com a água devem sair na forma de resíduos, assim, é inevitável que ocorra a geração de despejos, especialmente na raspagem contínua dos flotadores e limpeza dos filtros (DI BERNARDO; DANTAS; VOLTAN, 2011).

Os resíduos gerados nas ETA convencionais podem ser divididos em 4 categorias: I- lodos: gerados pela descarga de decantadores ou raspagens de flotadores, lavagens de filtros e por abrandamento e remoção de ferro e manganês da água bruta; II- concentrado salino: gerados no tratamento por membranas, osmose reversa, eletrodiálise e troca iônica; III- material gasto: carvão ativado, resinas de troca iônica e leito filtrante usado e IV- emissões

gasosas (ASCE et al., 1996). Os resíduos mais representativos são os lodos gerados na lavagem dos filtros e na descarga dos decantadores/flotadores (CORNWELL et al.,1987).

Segundo Reali (1999) a quantidade e as características dos lodos gerados nos sistemas de tratamento de água variam em função das características do manancial e dos insumos utilizados no tratamento. Igualmente, é preciso considerar que um mesmo manancial pode apresentar variações sazonais significativas na qualidade da água bruta, que, por sua vez, influenciam nas características do resíduo formado.

De acordo com Smollen e Kafaar (1994) em todos os tipos de lodos existe uma combinação entre a fase sólida e certa quantidade de líquido. Assim, as águas distribuídas nos resíduos são classificadas em: agua livre, água intersticial ou capilar, água vicinal e água de hidratação.

Mais especificamente sobre os resíduos de flotação, o lodo acumulado na superfície do flotador pode ser removido por equipamentos mecânicos de raspagem, por transbordamento ou hidraulicamente. MHW (2005) afirma que o volume de sólidos presente no lodo flotado varia conforme a técnica adotada para retirada da camada flutuante. Técnicas hidráulicas de separação geram lodo com teor de sólidos em torno de 0,3% e técnicas mecânicas de raspagem produzem lodo mais concentrado com cerca de 1 a 3% de sólidos.

Segundo cálculos da pesquisa de Sabogal-Paz (2007) o volume diário de resíduos gerados em uma ETA com flotação (floto-flotação) é de cerca de 6 a 8% do volume de água produzido.

Na região metropolitana de São Paulo foi criado, em caráter experimental, um protótipo de processo de flotação das águas do rio Pinheiros, chamado de flotação em fluxo, a fim de melhorar a qualidade das águas que abastecem o reservatório da represa Billings. Tal experimento permite a clarificação da água diretamente no curso hídrico. Em 2008, análises de metais realizadas no lodo gerado por este experimento revelaram a presença média para cada 1kg de lodo seco de 34mg de chumbo, 0,43mg de cádmio e 0,21mg de mercúrio (CIRQUEIRA, 2009). Esses dados demonstram que a flotação pode remover metais, concentrando-os no resíduo.

Segundo Marwell (2004, apud GUIMARÃES, 2007) o lodo produzido na flotação da instalação piloto da ETA de Brasília, utilizando PAC como coagulante, obteve como características: 19,1mg.L^{-1} de DQO, pH de 5,4 e 2,6% de sólidos totais.

[1] MARWELL, D.T.B. Estudo da Desidratação por Centrifugação do Lodo Produzido do Flotador da ETA Piloto Brasília. Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

Em relação à água de lavagem dos filtros, a presente revisão não encontrou na literatura dados específicos sobre as características desse resíduo gerado pela tecnologia de ciclo completo com flotação, as pesquisas publicadas sobre água de lavagem dos filtros são, em geral, com a tecnologia de ciclo completo com decantação.

Di Bernardo; Scalize e Souza Filho (1999) pesquisaram as características da água de lavagem dos filtros de uma ETA utilizando ciclo completo com decantação e sulfato de alumínio como coagulante. Também Giglio (2015) caracterizou a água de lavagem dos filtros após experimentos em escala de bancada (jarteste) considerando ciclo completo com decantação e PAC como coagulante. A Tabela 1 apresenta os resultados dos autores supracitados.

Tabela 1: Características da água de lavagem dos filtros segundo alguns autores

Parâmetros	Di Bernardo; Scalize e Souza Filho (1999)	Giglio (2015)
Sólidos totais ($mg.L^{-1}$)	88	90
DQO ($mg.L^{-1}$)	35	6,7
Turbidez (uT)	58	6,51
pH	6,9	7,01
Alumínio ($mg.L^{-1}$)	0,3	NM
Ferro ($mg.L^{-1}$)	6,9	NM
Manganês ($mg.L^{-1}$)	0,1	NM

NM: Não medido

Na Tabela 1 alguns parâmetros das águas de lavagem dos filtros podem ser semelhantes, como os sólidos totais e o pH, outros podem apresentar grandes diferenças, como a DQO e a turbidez. Evidentemente, a qualidade da água bruta e o tipo de coagulante empregado tem influência direta na quantidade e qualidade dos resíduos líquidos gerados durante a lavagem dos filtros (DI BERNARDO; SCALIZE e SOUZA FILHO, 1999).

Segundo Souza Filho (1998), o processo de recirculação da água de lavagem dos filtros acontece quando o resíduo líquido retorna à câmara de chegada de água bruta para ser misturado com a mesma. Para isso, utiliza-se de um tanque de equalização de vazão, visto que o volume de água de lavagem é variado e depende da qualidade da água bruta, da eficiência dos processos de clarificação anteriores e das condições de operação e manutenção. Segundo

o autor, a vazão de recirculação não pode ultrapassar de 10% da vazão de água bruta, também a recirculação pode ser com a água de lavagem integral ou após tratá-la.

Porém, a recirculação da água de lavagem dos filtros, se não existir controle adequado, pode prejudicar a qualidade da água tratada ou comprometer o funcionamento da ETA pela presença de metais, sólidos suspensos, precursores de trihalometanos e de protozoários como *Cryptosporidium* e *Giardia* (CORNWELL e LEER, 1994).

A NBR 10004 (ABNT, 2004) diz que os resíduos de ETA, mesmo contendo mais de 95% de água na maioria dos casos, são considerados como "resíduos sólidos", portanto, não podem ser lançados nos cursos hídricos.

De acordo com a Política Nacional de Resíduos Sólidos, instituída pela Lei nº 12.305/2010 (BRASIL, 2010a), os resíduos gerados em ETA são classificados, quanto à origem, como resíduos dos serviços públicos de saneamento básico. A lei também afirma que é proibido o lançamento de resíduos sólidos ou rejeitos em praias, no mar ou em qualquer corpo hídrico como forma de destinação ou disposição final.

Mesmo com essas proibições, 67% dos municípios brasileiros que geram lodo no tratamento de água despejam esses resíduos nos rios (IBGE, 2010).

O lançamento indiscriminado de resíduos de ETA nos corpos hídricos trás uma alteração significativa na qualidade dos mananciais. Segundo Di Bernardo, Dantas e Voltan, (2012), essa prática provoca o aumento na concentração de metais, afeta a reprodutividade da biota devido à limitação da luminosidade e restringe o uso do recurso hídrico à jusante do lançamento para abastecimento ou dessendentação de animais.

Bidone, Silva e Marques (2001) aponta que os despejos desses resíduos nos mananciais têm piorado a qualidade da água bruta captada, o que exige a adição de mais produtos químicos como coagulantes e desinfetantes no tratamento, portanto, aumenta a geração de resíduos na ETA.

3.5 – Remoção de protozoários em ETA

Apesar da tecnologia de ciclo completo apresentar múltiplas barreiras de tratamento, tais processos e operações não garantem a total remoção dos protozoários. Segundo Smith e Grimason (2003), até mesmo os eficientes processos físico-químicos adequadamente combinados não removem totalmente os (oo)cistos.

Segundo Assavacilavasukul et al., (2008) estudos mostram que, no tratamento da água, cistos de *Giardia* spp. são removidos com mais eficiência do que os oocistos de

Cryptosporidium spp. Tal fato pode estar ligado às dimensões desses organismos, pois os oocistos são menores. A eficiência de remoção também depende da quantidade de protozoários presentes na água captada.

No tratamento, o processo de coagulação influencia significativamente a remoção de *Cryptosporidium* (DUGAN et al., 2001). Dessa forma, a escolha correta da dosagem do coagulante é essencial para a remoção desses patógenos.

Maciel e Sabogal-Paz (2016), em estudo de tratamento de água com ciclo completo em escala de bancada, observaram que a utilização de PAC como coagulante resultou em remoções em torno de 2 log para *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.

Entre os mecanismos de coagulação, é possível que a coagulação por varredura seja mais eficiente na remoção de oocistos do que aquela por adsorção-neutralização de cargas, conforme Xagoraraki e Harrington (2004). Mesmo assim, Nishi et al. (2012), testando sementes de moringa como coagulante natural no mecanismo de adsorção - neutralização de cargas, devido à presença de proteínas catiônicas nas sementes, obtiveram remoções de 1,2 log de *Giardia* spp. e 1 log de *Cryptosporidium* spp.

Porém, os estudos supracitados foram realizados utilizando decantação, não sabendo, assim, se tais resultados são similares ou não aos da flotação.

Plummer, Edzwald e Kelley (1995) realizaram experimentos comparando a FAD com a decantação na remoção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em águas de abastecimento. Os autores observaram que a flotação removeu cerca de 3 log de oocistos e a decantação 1 log de oocistos.

Ao analisarem oocistos recém-purificados removidos pela flotação e, consequentemente, retidos no lodo, Keegan et al. (2008) demonstraram que haviam organismos ainda potencialmente ativos, mesmo após passarem pela coagulação, floculação e flotação. Tal fato ocorreu porque o tratamento por flotação tem a finalidade apenas de separar os patógenos, e não de inativá-los. Dessa forma, os autores comprovaram a necessidade do tratamento e desinfecção do lodo flotado. Uma vez que os resíduos de ETA não apresentam destinação adequada na maioria dos municípios brasileiros, conforme descrito no item 3.4, a quantificação desses organismos nos resíduos torna-se indispensável.

Após a FAD, os protozoários que não foram retidos passam pela filtração, na qual podem ser removidos no leito e retirados na água de lavagem dos filtros. Estudos em escala piloto demonstraram a eficiência da FAD seguida da filtração na remoção de mais de 2 log de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. (HALI et al., 1994; EDZWALD et al., 2000).

Com a presença de (oo)cistos na água de lavagem dos filtros, a prática da reciclagem no sistema pode reintroduzi-los à ETA, acumulando os organismos e aumentando, assim, os riscos à saúde da população. Igualmente, cabe observar que oocistos de *Criptosporidium* spp. possuem a capacidade de se comprimir, podendo passar pelas camadas filtrantes e, finalmente, atingir a água tratada (FRANCO, 2007).

Edzwald e Tobiasin (2001) realizaram análises, em sistema de ciclo completo com flotação, da recirculação da água de lavagem dos filtros em escala piloto e não identificaram impactos na remoção de *Cryptosporidium* nas etapas de flotação e filtração com e sem a recirculação da água em questão. Os autores afirmaram que, havendo remoção de 1,6 log ou mais de oocistos na clarificação por FAD e usando 2,5% da água para retrolavagem, a recirculação não terá acúmulo de organismos no efluente tratado.

Em relação à desinfecção, *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. apresentam características morfológicas que dificultam sua inativação nos sistemas de tratamento de água convencionais. Sobre essas características, é possível citar a alta resistência dos (oo)cistos à desinfecção com cloro, uma vez que as concentrações de desinfetante necessárias para inativá-los são extremamente elevadas em relação às dosagens regularmente empregadas nas ETA (BEVILACQUA; AZEVEDO; CERQUEIRA, 2009).

Nesse sentido, existem várias pesquisas sobre métodos de desinfecção alternativos ao cloro visando à inativação de protozoários. Como, por exemplo, as pesquisas de Widmer et al. (2002) sobre o tratamento de água com ozônio para a inativação de cistos de *Giardia* spp. e de Hijnen, Beerendonk e Medema (2006) sobre o uso de radiação UV para a inativação de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.

Segundo Hsu e Yeh (2003), os processos de tratamento avançados de água, como a microfiltração e a nanofiltração, podem interceptar completamente cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. Visto que tais tecnologias possuem membranas com tamanhos de poros menores do que os organismos em questão, removendo-os totalmente, desde que mantidas intactas as membranas.

Por fim, o tratamento de água utilizando a abordagem de multibarreiras, ou seja, com uma combinação de tecnologias de separação e desinfecção, pode remover e inativar diferentes agentes patógenos, como os protozoários, garantindo assim um menor risco de contaminação microbiana (BETANCOURT e ROSE, 2004).

3.6 – Avaliação de protozoários em águas e resíduos de ETA

Segundo Fregonesi et al. (2012), as metodologias para detecção de protozoários em água aceitas globalmente são de alta especificidade tecnológica, como o Método 1623.1 proposto pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos – USEPA para detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.. Tal método é reconhecido internacionalmente, porém, é pouco acessível em muitos laboratórios, pois sua implementação requer vasta experiência e investimentos consideráveis, devido ao alto custo dos insumos e equipamentos utilizados. A inserção desse tipo de metodologia na rotina dos laboratórios de saneamento ainda é incipiente no Brasil.

A detecção de protozoários consiste, simplificadamente, nas seguintes fases: I- concentração, em que são aplicadas técnicas como filtração e floculação para reduzir o volume de amostra mantendo o mesmo número de protozoários; II- purificação, em que se busca a separação dos (oo)cistos das impurezas da amostra; e III- enumeração, na qual os organismos-alvo são identificados e contados.

Para realizar a concentração dos protozoários, entre os métodos existentes, destaca-se o método de floculação em carbonato de cálcio – FCCa. Tal método foi proposto por Vesey et al. (1993) e posteriormente adaptado por Feng et al. (2011). Giglio (2015) testou vários métodos diferentes para detectar (oo)cistos e apontou a FCCa como o mais indicado para análises em resíduos de ETAs. Tal método, resumidamente, consiste na adição de determinadas soluções de cloreto de cálcio e bicarbonato de sódio na amostra e posterior ajuste do pH com hidróxido de sódio, produzindo, assim, a floculação. Após determinado tempo de repouso, o sobrenadante é removido e se adiciona ácido sulfâmico para dissolver o precipitado. Por fim, a suspensão é centrifugada e neutraliza-se o pH com solução tampão. Nessa etapa dos procedimentos, antes de iniciar a purificação da amostra, o ajuste e neutralização do pH é importante para melhorar a eficiência de recuperação dos organismos. Conforme recomenda Kuhn, Rock e Oshima (2002) para a purificação por separação imunomagnética – IMS.

Feng et al. (2011), utilizando a FCCa em amostras de água de abastecimento, obtiveram recuperações de 62 a 66% de cistos de *Giardia* spp. e de 54 a 58% do oocistos de *Cryptosporidium* spp.

Na etapa de purificação, o Método 1623.1 (USEPA, 2012) descreve a técnica de IMS, onde microesferas magnéticas (Dynabeads®) contendo anticorpos se juntam aos (oo)cistos e, através de um imã, separam os protozoários dos materiais estranhos presentes da amostra.

Após isso, técnicas como a dissociação ácida separam as microesferas dos (oo)cistos e a amostra pode então ser adicionada às lâminas de microscopia.

Segundo Chakraborty et al. (2011), a técnica de IMS é eficiente para a recuperação de microrganismos de amostras heterogêneas. Alguns exemplos de aplicação são os estudos de detecção de protozoários em alimentos (COOK et al., 2006) e em amostras de solos (McELROY; CABELLO e PILLAI, 2001).

A escolha do fabricante do material utilizado para a realização da IMS deve ser criteriosa, como demonstraram Bukhari et al. (1998) e Rochelle et al. (1999). Ambas as pesquisas testaram diferentes marcas de kits IMS e encontraram variações nas recuperações de organismos.

Para separar os (oo)cistos das microesferas magnéticas, na dissociação ácida, a quantidade de dissociações e o tempo de exposição do patógeno ao ácido pode também influenciar na recuperação dos organismos. Zhang et al. (2008) observaram que o uso de duas dissociações ácidas em vez de uma é capaz de aumentar a recuperação dos métodos testados.

Além da dissociação ácida, existe também a possibilidade da utilização da dissociação térmica. Pinto (2013), em ensaios utilizando a filtração em membranas e Filta-Max® em água bruta e com purificação por IMS, testou o desempenho das dissociações térmica e ácida na recuperação de (oo)cistos. Para *Giardia* spp., o autor observou que a dissociação ácida apresentou maior média de eficiência de recuperação e precisão do que a dissociação térmica, também não encontrou diferença estatística significativa na detecção de *Cryptosporidium* spp. entre as dissociações.

Na etapa de enumeração dos protozoários, lâminas de microscópio são preparadas com reagentes (como os do kit Merifluor®) contendo anticorpos monoclonais que marcam os (oo)cistos. Assim, é possível contar os organismos que atendem os critérios de identificação através das seguintes visualizações: I- fluorescência, observando o tamanho, formato e coloração; II- impregnação com 4’,6-diamino-2fenil-indol – DAPI em teste confirmatório, que confirma com a coloração da estrutura interna dos (oo)cistos (núcleos); e III- microscopia de contraste interferencial diferencial – DIC, que permite observação mais detalhada da morfologia do organismo.

Dependendo da amostra avaliada, é possível evitar a etapa de purificação, realizando a enumeração logo após a etapa de concentração. Maciel e Sabogal-Paz (2016), realizando ensaios de detecção com e sem esta etapa de purificação, constataram que os testes com IMS melhoram a visualização dos organismos devido à retirada de impurezas da amostra. Contudo, o procedimento implica na introdução de vários passos para o protocolo de detecção. Assim,

para escolher essa etapa devem ser considerados as características da amostra, o tempo de análise e a viabilidade econômica.

Recentemente, as pesquisas em avaliação de protozoários têm voltado à atenção para os métodos que utilizam análises moleculares, como o PCR – Método de Reação em Cadeia de Polimerase. Tal método permite identificar até as espécies dos parasitos através da reprodução de cópias de DNA (ácido desoxirribonucleico) do patógeno. Segundo Osaki et al. (2013), o PCR é uma técnica promissora para o uso em amostras de água em que os organismos de interesse estão presentes em pequenas quantidades. Também Fontaine e Guillot (2003) destacam que a capacidade desse método de quantificar os organismos rapidamente poderá permitir a avaliação nos controles de rotina da qualidade da água potável, na eficácia do tratamento e na identificação dos riscos presentes na água bruta.

Lindquist et al. (1999) indicaram que uma proliferação de técnicas e métodos têm surgido para a análise de amostras de água visando determinar a presença de protozoários patógenos. As comparações entre os métodos de detecção utilizados, as modificações e aperfeiçoamentos dos mesmos são práticas de grande interesse. Exemplos disso são as pesquisas de Inoue et al. (2003), que desenvolveram um novo tipo de filtro para eluição, e Helmi et al. (2010), que compararam a eficiência de três métodos utilizados para concentrar (oo)cistos em água de abastecimento.

Segundo Zarlenga e Trout (2004), entre as fortes razões para continuar a busca de métodos de detecção mais sensíveis e precisos, estão: a demanda social por condições de vida mais seguras, as ameaças impostas pelo bioterrorismo e a distribuição global dos parasitas humanos mais resistentes e prejudiciais. Outros aspectos podem estar relacionados à capacidade técnica, à disponibilidade de mão de obra e aos recursos disponíveis localmente.

4- METODOLOGIA

4.1 – Preparo da água de estudo

Para a preparação da água de estudo, foi definido que tal água apresentasse características comuns às águas brutas tratadas pela tecnologia de ciclo completo com flotação, especialmente em relação aos parâmetros de cor verdadeira e turbidez. Também foi importante que as características da água de estudo fossem constantes para obter controle em relação ao desempenho dos métodos de detecção dos (oo)cistos testados.

Nesse sentido, para a preparação da água de estudo, foram coletados 2000L de água do poço da EESC-USP e armazenados em reservatórios de 1000L cada, os quais foram previamente higienizados com hipoclorito de sódio e abrigados com lonas plásticas para evitar proliferação de algas.

Bateladas dessa água foram periodicamente coletadas e preparadas em bombona de 200L com adição de caulinita (*Sigma –Aldrich®*, Fluka 60609) para elevar a turbidez em torno de 50uT e ácido húmico (*Sigma –Aldrich®*, H16752) para aumentar a cor verdadeira em torno de 100uH, utilizando um misturador elétrico para agitação.

Para a caracterização da água de estudo ensaios foram realizados, seguindo as metodologias do APHA et al. (2012), para avaliar os seguintes parâmetros: turbidez, cor aparente, cor verdadeira, pH, potencial zeta, condutividade, absorbância, alcalinidade, coliformes totais, dureza, COT e metais (alumínio, chumbo, cadmio, ferro, manganês e mercúrio).

Para padronizar os parâmetros da água estudada, antes de cada ensaio de tratabilidade a turbidez inicial foi medida, controlando-a na faixa entre 50 a 60uT, diluindo a água de estudo ou produzindo-a novamente conforme a qualidade requerida. Da mesma forma, a temperatura foi controlada em 23 ± 2°C, aquecendo as amostras com um ebulidor quando necessário.

4.2 – Ensaios de tratabilidade

Através do equipamento conhecido como floteste (marca: Nova Ética, modelo: 218/3), foram realizados diversos ensaios visando reproduzir a tecnologia de ciclo completo com flotação, em escala de bancada (Figura 3).

Figura 3 – Floteste

Os ensaios foram realizados utilizando como referência as metodologias de Di Bernardo, Dantas e Voltan (2011) e Edzwald e Haarhoff (2011), visando obter as melhores condições para remoção de turbidez e cor verdadeira. O esquema da Figura 4 representa o tratamento estudado.

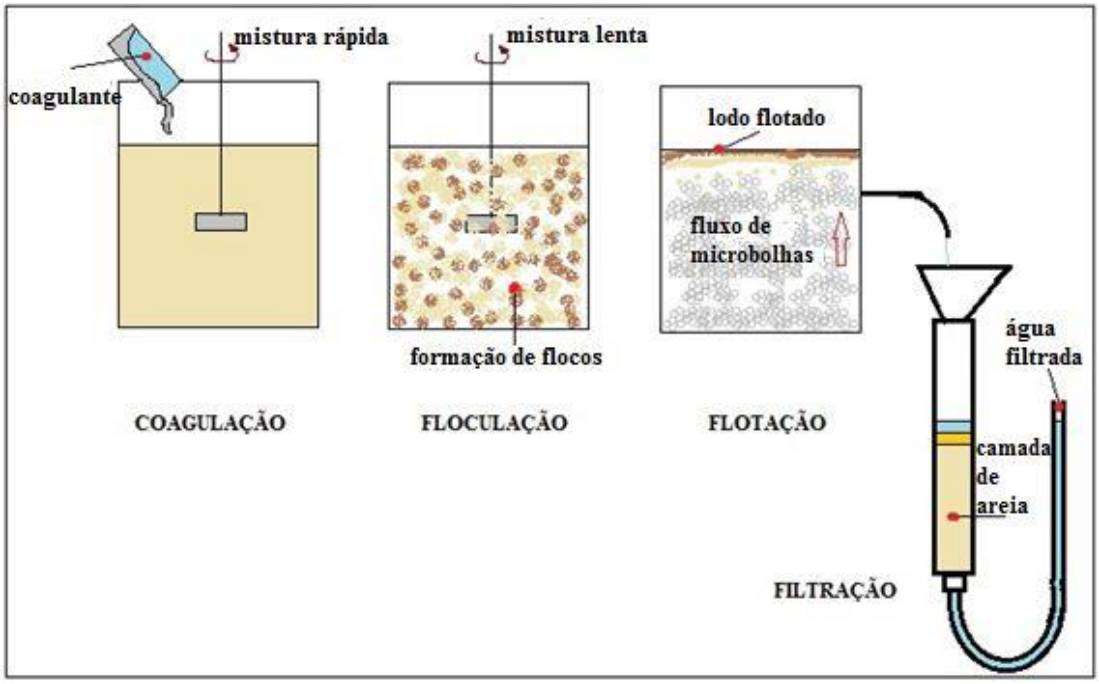


Figura 4 – Esquema do tratamento por ciclo completo com flotação em escala de bancada

O cloreto de polialumínio – PAC foi avaliado como coagulante devido a sua recente utilização nas ETA do país. Isto se deu tendo em vista sua capacidade de dispensar, eventualmente, a aplicação de alcalinizante e de reduzir o volume de resíduos, resultando em

vantagens operacionais e econômicas. Assim, utilizou-se o PAC da empresa Quimisa S/A, com 17,56% de teor de AL_2SO_3, segundo o fabricante (Anexo A).

Para realizar os ensaios de tratabilidade, foram fixados os seguintes parâmetros e atendidos os seguintes critérios: I- pressão de saturação de 5bar, devido às limitações na rede pneumática do laboratório LATAR para pressões maiores; II- tempo mínimo de saturação do ar na câmara de saturação de 10min, segundo recomendações de Di Bernardo, Dantas e Voltan (2011); e III- utilização da água do poço armazenada para o preparo da água saturada na câmara de saturação.

Na programação do floteste foi considerado: I- rotação das paletas de 200rpm no início; II- aumento em 30s até a rotação do gradiente de coagulação; e III- redução em 5s para o gradiente de floculação após tempo de coagulação.

A correção dos valores de turbidez e cor final foi realizada devido à diluição feita pela entrada da água saturada na flotação. O cálculo da correção foi efetuado acrescentando a taxa de recirculação segundo Couto, Melo e Massarani (2004).

Após alguns ensaios preliminares, foram fixados os parâmetros de tratabilidade e repetidos vários ensaios variando apenas as dosagens de coagulante e alcalinizante (hidróxido de sódio). Assim, foi possível construir os diagramas de coagulação da água de estudo, os quais indicaram as melhores remoções de cor aparente e turbidez na água clarificada dentro de faixas específicas de pH e de dosagem de coagulante.

Ao definir o ponto ótimo (dosagem de coagulante e pH de coagulação), ensaios foram realizados visando a otimização dos seguintes parâmetros: gradiente médio de mistura rápida - Gmr e tempo de mistura rápida - Tmr; gradiente médio de mistura lenta - Gml e tempo de mistura lenta - Tml; tempo de flotação - Tf e taxa de recirculação - Rec. Tais ensaios foram realizados fixando a dosagem de coagulante, a pressão da câmara de saturação (5bar) e o tempo de saturação (10min), segundo esquema da Figura 5.

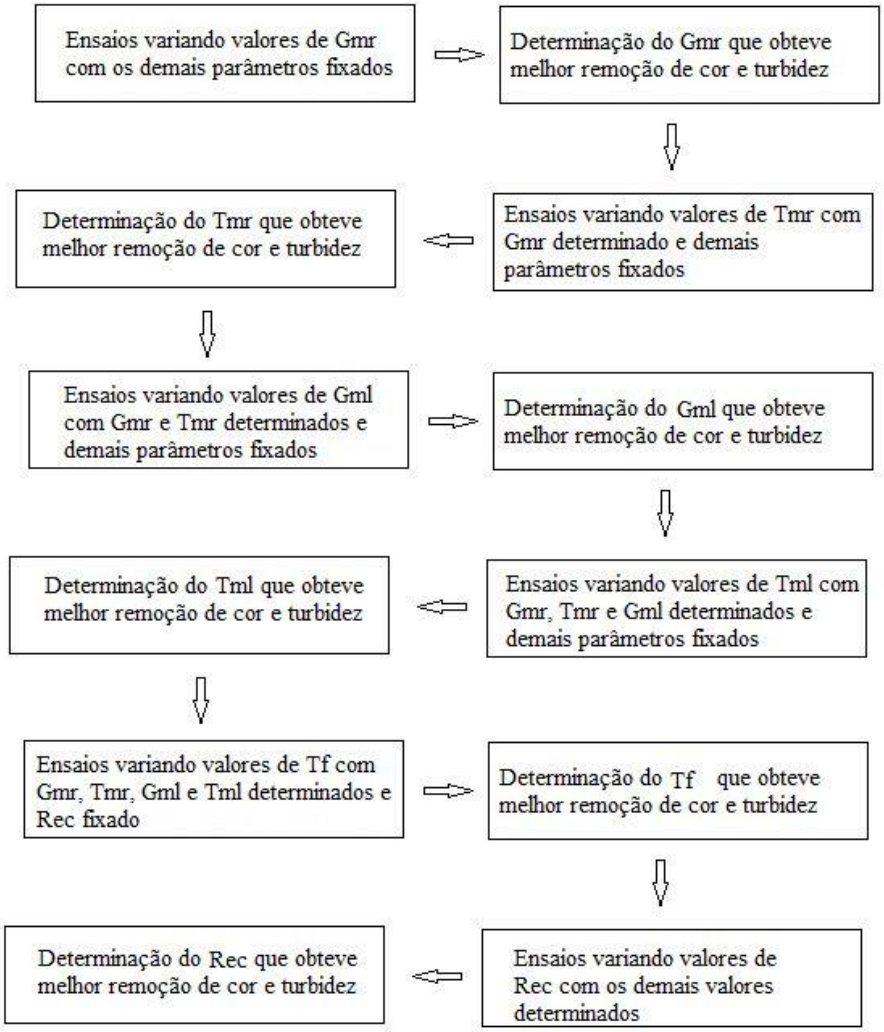


Figura 5 – Esquema dos passos seguidos para otimizar os parâmetros nos ensaios de tratabilidade

Posteriormente, o aparelho conhecido como Flotateste de coluna foi utilizado para a determinação das curvas de flotação da água de estudo. Para os ensaios com filtração, foram utilizados filtros de laboratório de areia, constituídos de acrílico, com 19mm de diâmetro e 40cm de altura. A areia utilizada possuía granulometria entre 0,30 e 0,59mm e tamanho efetivo de 0,42mm. Cada filtro foi preenchido com camada de 15cm de areia, previamente higienizada, conforme metodologia adotada por Giglio (2015). A taxa de filtração máxima estabelecida foi de $100m^3.m^{-2}.dia^{-1}$.

4.3 – Coleta e caracterização de resíduos

Uma vez determinados o diagrama de coagulação e os parâmetros de tratabilidade da água de estudo, foram repetidos mais ensaios, na condição ótima, visando a produção das amostras desejadas de resíduos (lodo flotado e água de lavagem dos filtros).

Para coletar o lodo flotado produzido, a água clarificada foi escoada pelo fundo do floteste, através dos mesmos canais de entrada de água saturada, até a superfície de lodo atingir marcação de 200mL no jarro. Feito isto, o resíduo foi removido do jarro com enxagues de 100mL de água deionizada.

Para a produção da água de lavagem, foram realizadas lavagens ascensionais nos filtros através de sucessivas injeções, com uma seringa, de 300mL de água deionizada.

Os resíduos obtidos no floteste foram caracterizados seguindo as metodologias de APHA et al. (2012), analisando os seguintes parâmetros: turbidez, cor aparente, cor verdadeira, pH, potencial zeta, condutividade, absorbância, alcalinidade, série de sólidos (sólidos totais, fixos e voláteis e sólidos solúveis totais, fixos e voláteis), sólidos sedimentáveis, COT, DQO e metais (alumínio, chumbo, cadmio, ferro, manganês e mercúrio).

4.4 – Métodos de avaliação de protozoários

A pesquisa utilizou como referência as recomendações do Método 1623.1 (USEPA, 2012) e os trabalhos de Maciel (2014) e Giglio (2015).

Para a fase de concentração dos (oo)cistos inoculados foi definida a utilização do método de FCCa, proposto por Vesey et al. (1993) adaptado por Feng et al. (2011) e Giglio (2015), conforme Figura 6 e Apêndice B.

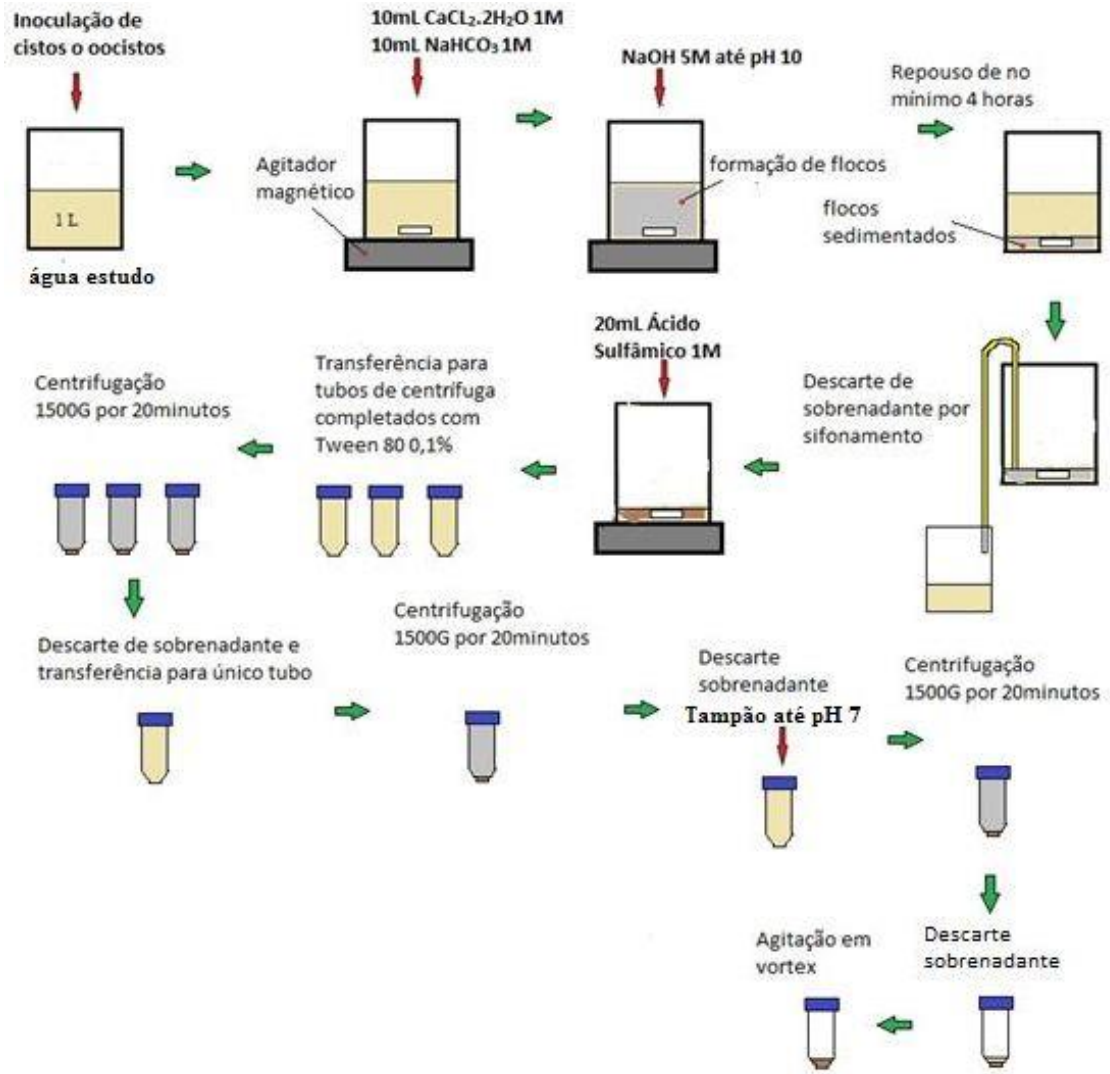


Figura 6 – Esquema do protocolo da floculação em carbonato de cálcio no ensaio de qualidade analítica do método

Para a escolha da solução tampão, foram realizados ensaios comparando a solução salina de fosfato – PBS com a solução salina fosfato-tamponada Dulbecco – DPBS, ambos da marca *Sigma –Aldrich*®. Durante a aplicação do método de FCCa, após a penúltima centrifugação e descarte do sobrenadante, diferentes volumes de PBS e DPBS foram adicionados ao *pellet* (material armazenado no fundo dos tubos após a centrifugação) e medido o pH. Esses testes mostraram que o pH das amostras neutraliza-se com a adição de menor volume de PBS do que DPBS. Assim, foi definido PBS como solução tampão para todos os ensaios com este método.

Para evitar o contato entre as amostras inoculadas e o dispositivo de medição de pH, o que permitiria o risco de perdas de organismos na parede do eletrodo, foram realizados ensaios preliminares com as águas e resíduos estudados sem oo(cistos), anotando os volumes

utilizados de reagentes para correção de pH. Assim, foi possível padronizar os volumes de hidróxido de sódio necessários para cada amostra (água/resíduo), conforme Apêndice B.

Ensaios foram realizados com e sem a fase de purificação das amostras para posterior comparação entre os resultados. Quando não realizada a purificação, uma alíquota da amostra era colocada diretamente na lâmina de microscopia, seguindo o procedimento de Maciel (2014).

Quando era realizada a purificação, utilizou-se o método de separação imonumagnética - IMS seguindo recomendações da USEPA (2012). Para isso, foram utilizados os produtos do *kit Dynadeads®* (*Life Technologies*^{TM}) e os procedimentos descritos no Apêndice C e resumidos na Figura 7.

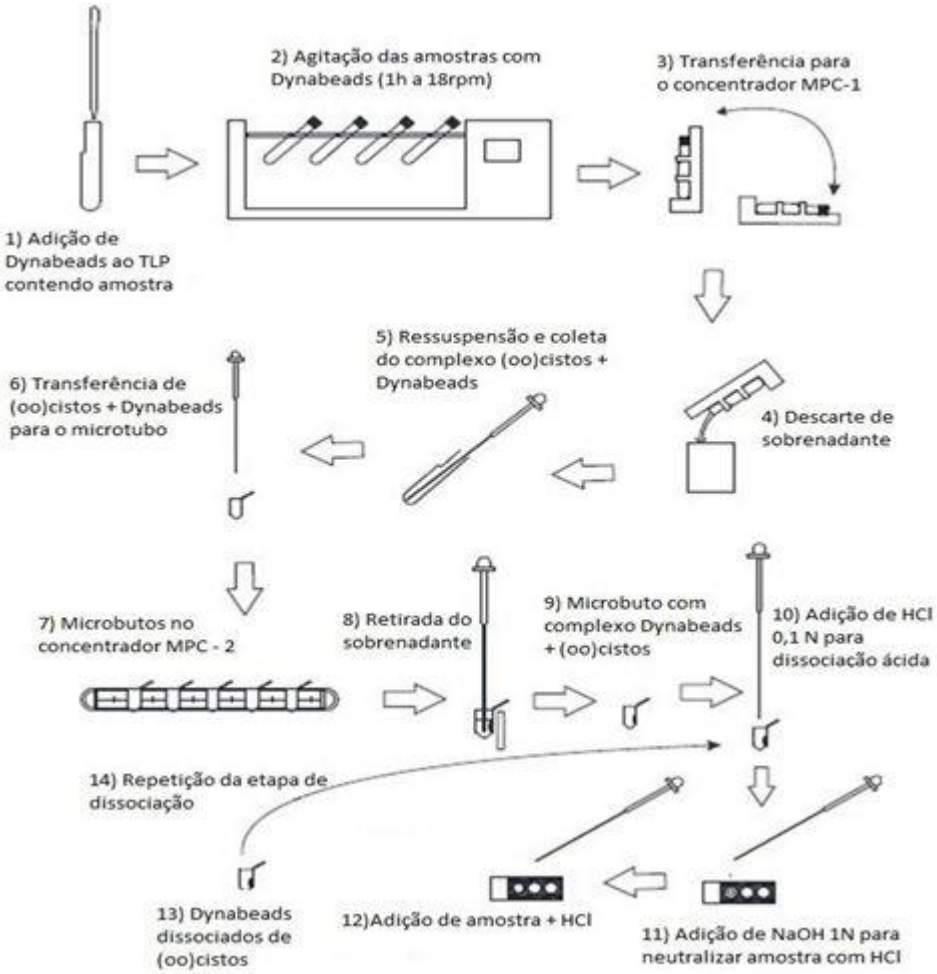


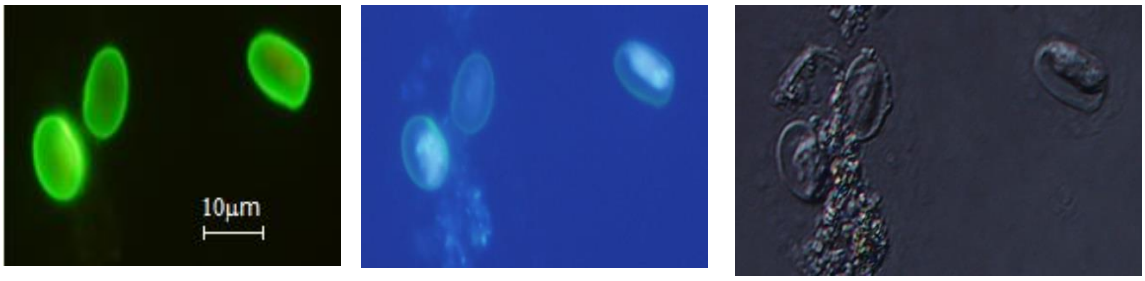
Figura 7 – Esquema simplificado dos procedimentos da IMS (MACIEL, 2014)

Entre os procedimentos da IMS adotados, Maciel (2014) e Giglio (2015) realizaram em suas pesquisas duas dissociações ácidas. Giglio (2015) recomendou a inclusão de uma

terceira dissociação para observar se existem melhorias na detecção dos protozoários. Assim, todos os ensaios com IMS desta pesquisa foram realizados com três dissociações.

A montagem das lâminas para leitura microscópica foi realizada utilizando o kit comercial *Merifluor*® com adição de corante vital com DAPI (*Fluoroshield*™ da marca *Sigma –Aldrich*®) para melhor visualização.

Para a identificação e contagem dos protozoários foi utilizada microscopia de fluorescência, combinando com visualizações em DAPI e DIC para testes confirmatórios, segundo exemplos nas Figuras 8 e 9.



Fluorescência DAPI DIC

Figura 8 – Visualização de cistos de *Giardia* spp. (>400x)

Fluorescência DAPI DIC

Figura 9 – Visualização de oocisto de *Cryptosporidium* spp. (>400x)

4.5 – Testes de qualidade analítica do método

Para verificar a recuperação dos protozoários e validar a metodologia utilizada realizou-se inoculações de uma quantidade conhecida de (oo)cistos na água de estudo (matriz) e aplicou-se os métodos de concentração (FCCa) com e sem purificação por IMS.

A princípio, na metodologia sem IMS, a princípio foi realizado um ensaio em triplicata utilizando suspensões de cistos de *Giardia* spp. (purificadas pela UNICAMP) e

oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Anexo B). Antes do ensaio, determinados volumes de alíquotas de cepas foram introduzido nas lâminas em triplicata para contagem e obtenção da média e coeficiente de variação (CV), esses mesmos volumes foram inoculados em triplicata na água de estudo. Dessa forma, assumiu-se que o número de (oo)cistos inoculados era igual ao número obtido pela contagem dessas lâminas.

Após a concentração das amostras pela FCCa, foram aplicadas alíquotas da amostra final diretamente nos poços das laminas. Após a contagem dos organismos, realizou-se o cálculo do fator de multiplicação - FM, utilizando a Equação 1.

$$FM = \frac{\text{volume da amostra após concentração}}{\text{volume colocado nos poços da lâmina de microscopia}} \quad \text{(Equação 1)}$$

Posteriormente, estimou-se a quantidade de (oo)cistos recuperados com a Equação 2.

$$\text{Numero de (oo)cistos} = \Sigma \text{ (oo)cistos identificados x FM} \quad \text{(Equação 2)}$$

Assim, foi possível calcular a porcentagem de recuperação e o CV da metodologia adotada, comparando o número total de (oo)cistos identificados com o número inicialmente inoculado.

Também juntamente com esse ensaio, foi realizado um ensaio em branco, sem inoculação, para verificar se havia contaminação das amostras.

Após esse ensaio inicial, foi realizado um teste em triplicata utilizando (oo)cistos do *kit AccuSpyke®*, que contêm cepas com número conhecido de organismos (Anexo C). Tal procedimento, realizado antes dos ensaios de tratabilidade, permitiu verificar a precisão inicial do método.

Ao final dos ensaios de tratabilidade, foi realizado mais um teste de qualidade com *AccuSpyke®*, desta vez utilizando quatro amostras da água de estudo a fim de atender aos critérios de qualidade apresentados pela USEPA (2012).

Na metodologia com IMS, ao final da purificação, todo o volume da amostra é descartado, restando apenas o material dissociado dos *Dynabeads*. Dessa forma, o cálculo dos organismos recuperados se dá apenas pela soma dos (oo)cistos identificados nas lâminas de microscopia, sem utilizar fator de multiplicação.

Primeiramente foi realizado um teste de qualidade utilizando inoculação com as suspensões de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp., analogamente ao teste inicial sem IMS.

Após observar a recuperação inicial deste método, realizou-se mais um ensaio utilizando, desta vez, o kit *Easy-Seed*® (Anexo D).

4.6 – Ensaios de tratabilidade com protozoários

Devido aos diferentes processos e operações que compõe o tratamento de ciclo completo com flotação e as diferentes formações de resíduos (lodo flotado e água de lavagem dos filtros), para o estudo da retenção e separação dos (oo)cistos da água foi definido a separação do tratamento em fases, segundo esquema da Figura 10.

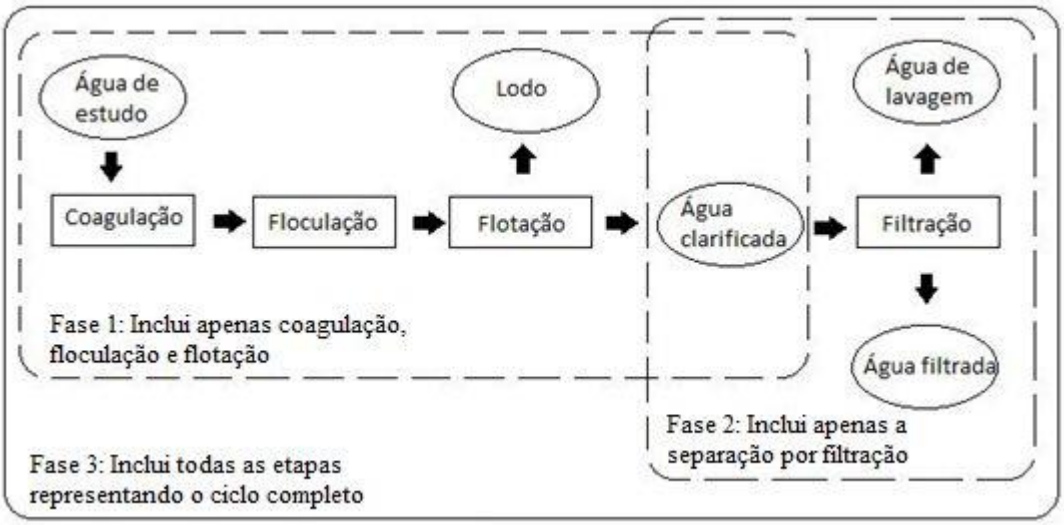


Figura 10 – Divisão do tratamento em fases

A pesquisa utilizou, para cada fase, suspensões específicas cistos de *Giardia* spp. (purificadas pela UNICAMP) e oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Anexo B). Durante a inoculação, alíquotas das suspensões com os mesmos volumes inoculados nos jarros foram aplicadas na lamina de microscopia e contadas em triplicata, visando estimar o número médio de organismos-alvo inoculados nos ensaios. Calculando, assim, a média e o desvio padrão de (oo)cistos.

A finalidade de realizar experimentos em fases foi de possibilitar os estudos individuais de cada processo e operação, bem como de observar a combinação entre eles.

4.6.1 – Fase 1

O ensaio avaliou a distribuição dos protozoários na fase líquida (água clarificada) e sólida (lodo flotado), segundo Figuras 11 e 12. Os (oo)cistos foram inoculados com uma quantidade de cerca de 500 organismos.L^{-1} a partir das suspensões.

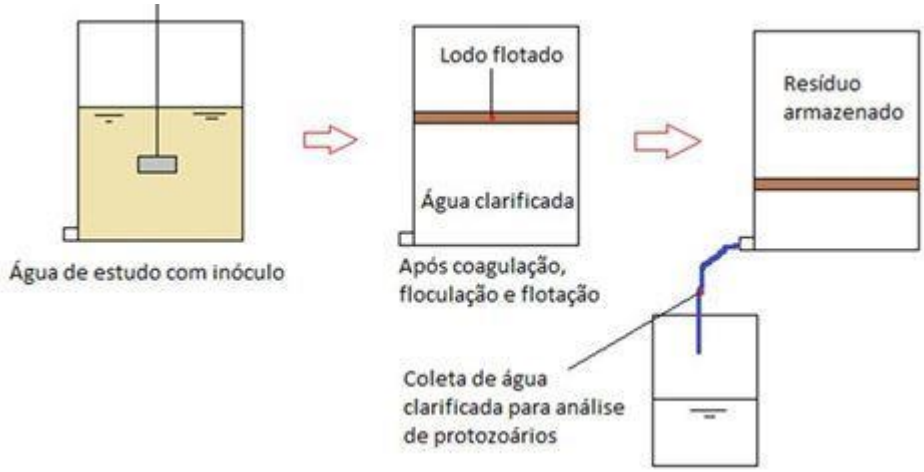


Figura 11 – Esquema simplificado do tratamento e separação de resíduos da Fase 1

Figura 12 – Coleta de água clarificada na Fase 1

Para cada jarro contendo 2L de água de estudo inoculada com (oo)cistos foi produzido 1L de água clarificada e 1,3L de lodo (considerando também como lodo o restante da água clarificada presente no jarro até a camada flotada, incluindo 300mL utilizados para enxagues com água deionizada e *Tween* 80 a 0,1% para a transferência total da amostra no béquer).

Dois ensaios da Fase 1 foram realizados em triplicada, um com e outro sem a etapa de purificação por IMS. Em ambos se realizou o estudo da distribuição dos (oo)cistos no sistema de acordo com a Figura 13.

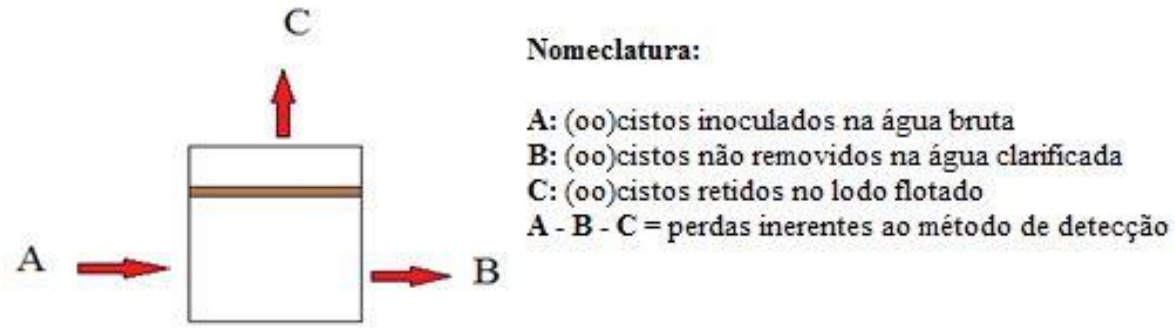


Figura 13 – Esquema simplificado da distribuição de (oo)cistos na Fase 1

4.6.2 – Fase 2

A etapa avaliou, igualmente, a distribuição dos protozoários nas fases líquida (água filtrada) e sólida (água de lavagem dos filtros). Neste contexto, amostras de água clarificada, previamente coletadas em ensaios de tratabilidade, foram inoculadas com cerca de 500 (oo)cistos nos jarros e filtradas. Posteriormente, foram realizadas lavagens ascensionais aos filtros através de uma seringa de 50mL com água deionizada e coletado o resíduo da lavagem até o acúmulo de 300mL do mesmo.

Para cada jarro contendo 800 mL de água clarificada inoculada com (oo)cistos foi produzido 1L de água filtrada (considerando a adição de 200mL de enxagues de água deionizada e *Tween* 80 a 0,1% no jarro após filtração de toda a amostra) e 300 mL de água de lavagem, conforme Figuras 14 e 15.

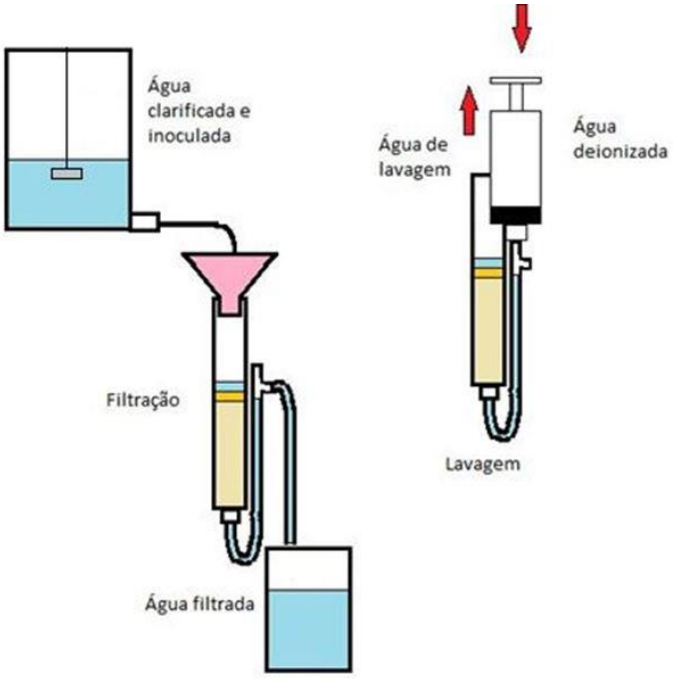


Figura 14 – Esquema simplificado do tratamento e separação de resíduos da Fase 2

Figura 15 – Filtração da amostra na Fase 2

Dois ensaios foram realizados na Fase 2, em triplicada, um com e outro sem a etapa de purificação por IMS. Em ambos se realizou o estudo da distribuição dos (oo)cistos no sistema de acordo com a Figura 16.

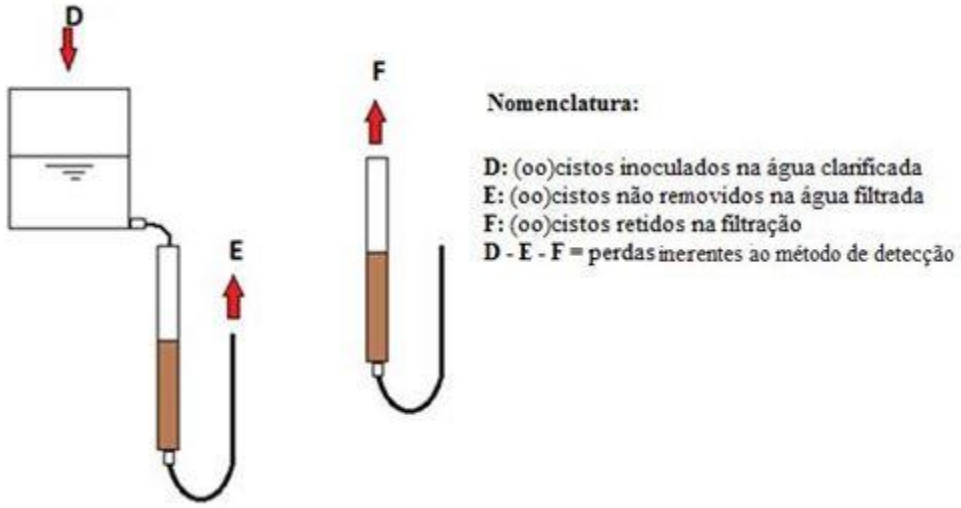


Figura 16 – Esquema simplificado da distribuição de (oo)cistos na Fase 2

4.6.3 – Fase 3

Esta ultima fase avaliou o tratamento completo, segundo Figura 17, quantificando todas as entradas e saídas e comparando, também, com os resultados das outras fases.

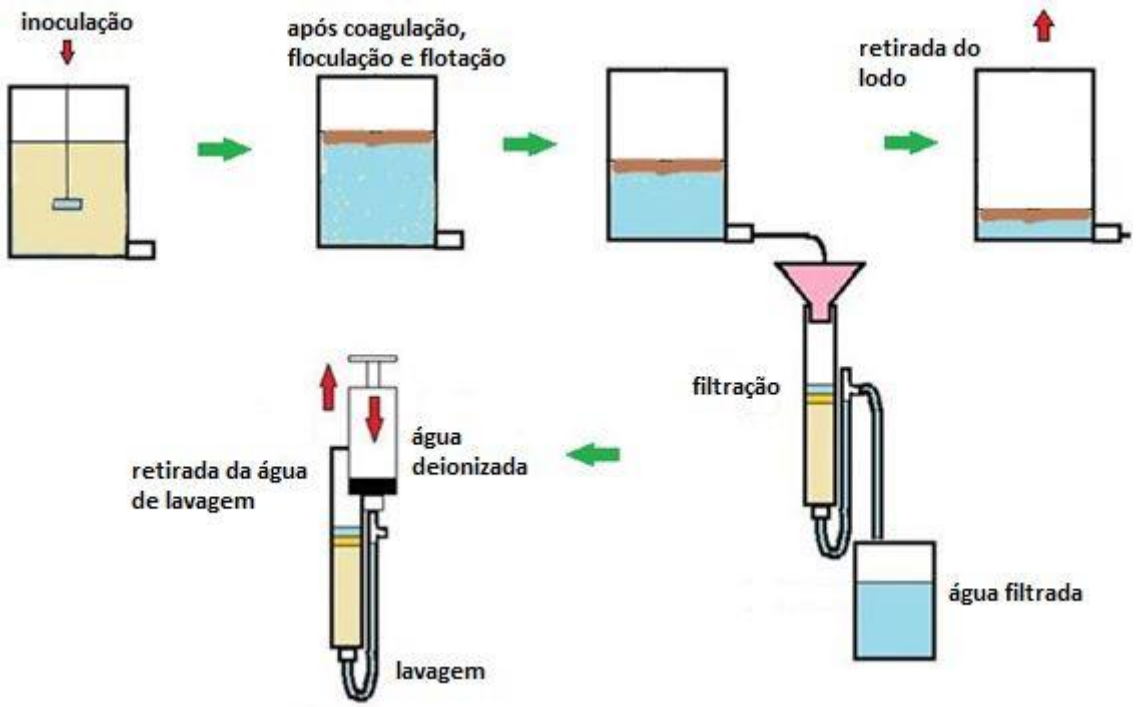


Figura 17 – Esquema simplificado do tratamento e separação de resíduos da Fase 3

Para cada jarro contendo 2L de água de estudo inoculada com (oo)cistos foi produzido 1L de água filtrada, 1,3L de lodo e 300mL de água de lavagem, conforme Figura 18.

Figura 18 – Amostras de lodo (1), água filtrada (2) e água de lavagem (3) obtidas na Fase 3

Dois ensaios foram realizados em triplicada para avaliar os resultados com e sem a separação por IMS. Em ambos se realizou o estudo da distribuição dos (oo)cistos no sistema de acordo com a Figura 19.

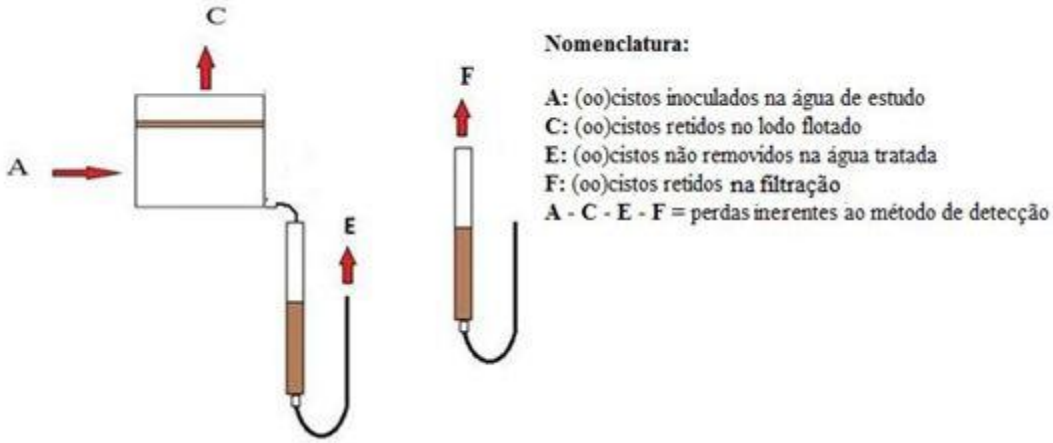


Figura 19 – Esquema simplificado da distribuição de (oo)cistos na Fase 3

4.7- Análise dos resultados

Após a obtenção dos resultados, foram aplicados testes de hipóteses para verificar se as diferenças entre os métodos utilizados são significativas estatisticamente. Para isso, os testes se basearam na tabela T *Student*, assumindo 95% de confiança.

A Tabela 2 apresenta as considerações para a comparação entre as recuperações dos ensaios de qualidade analítica dos métodos de FCCa com e sem IMS.

Tabela 2: Considerações sobre os testes de hipóteses adotados para comparar as recuperações dos métodos analíticos utilizados (FCCa com e sem IMS)

Hipótese 1: As recuperações de (oo)cistos entre os métodos não são significativamente diferentes.

Hipótese 2: As recuperações de (oo)cistos entre os métodos são significativamente diferentes; portanto, um método recupera mais do que o outro.

n: número de amostras do ensaio de qualidade sem IMS

m: número de amostras do ensaio de qualidade com IMS

X_1 e S_1^2: média e variância das recuperações de (oo)cistos do ensaio de qualidade sem IMS

X_2 e S_2^2: média e variância das recuperações de (oo)cistos do ensaio de qualidade com IMS

g: Grau de liberdade

$$g = m + n - 2 \quad \text{(Equação 3)}$$

$$S_p^2 = \frac{(n-1) \times S_1^2 + (m-1) \times S_2^2}{g} \quad \text{(Equação 4)}$$

$$T = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{S_p^2 \times (n^{-1} + m^{-1})}} \quad \text{(Equação 5)}$$

Z: tamanho da cauda (consultando Tabela T *Student*)

Região crítica: Intervalo entre -Z e Z

Se T estiver contido na região crítica, assume-se a hipótese 1

Se T não pertencer à região crítica, assume-se a hipótese 2

Para comparar as proporções de (oo)cistos detectados nos resíduos, em relação às quantidades inoculadas, foram utilizadas as considerações da Tabela 3.

Tabela 3: Considerações sobre os testes de hipóteses adotados para comparar as proporções de (oo)cistos detectados nos resíduos de cada ensaio

Hipótese 1: As proporções de (oo) cistos nos resíduos não são significativamente diferentes entre os métodos.

Hipótese 2: As proporções de (oo)cistos nos resíduos são significativamente diferentes entre os métodos.

n: número médio de (oo)cistos inoculados no ensaio de tratabilidade de FCCa com IMS

m: número médio de (oo)cistos inoculados no ensaio de tratabilidade de FCCa sem IMS

P1: proporção dos (oo)cistos no resíduo em relação aos inoculados em cada ensaio com IMS

P2: proporção dos (oo)cistos no resíduo em relação aos inoculados em cada ensaio sem IMS

$$z = \frac{P_1 - P_2}{\sqrt{\frac{P_1(1-P_1)}{n} + \frac{P_2(1-P_2)}{m}}}$$ (Equação 6)

I: tamanho da cauda (consultando tabela T S*tudent*)

Região crítica: intervalo entre -I e I

Se Z estiver contido na região crítica, assume-se a hipótese 1

Se Z não pertencer à região crítica, assume-se a hipótese 2

Nos ensaios do método de FCCa com IMS, para comparar a influência da adição da terceira dissociação ácida nos resultados, a Tabela 4 apresenta as considerações adotadas utilizando abordagem paramétrica entre as variáveis.

Tabela 4: Considerações sobre os testes de hipóteses adotados para comparação entre as recuperações com duas e três dissociações ácidas

Hipótese 1: O número de organismos contados com três dissociações ácidas é igual ao número contado com duas dissociações.

Hipótese 2: O número de organismos contados com três dissociações ácidas é maior do que o número contado com duas dissociações.

$$t = \frac{\overline{D} \cdot \sqrt{n}}{S_D}$$ (Equação 7)

t: número calculado do teste

D: médias das diferenças entre as contagens (números contados na terceira dissociação)

n: número de amostras

S_d: desvio padrão de D

Se t estiver contido na região crítica do teste assume-se hipótese 1

Se t não pertencer a região crítica assume-se hipótese 2

Também foram realizadas análises de custos dos principais materiais utilizados, os kits *Merifluor®*, *Easyseed®* e *Dynadeads®*, a fim de comparar economicamente os protocolos testados (FCCa com e sem IMS). Para isso, a média e o desvio padrão dos orçamentos desses materiais (Anexo E) foram calculados com os dados atualizados para 1 de abril de 2016, segundo correções do índice IGP – M (FGV).

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Preparo da água de estudo

Para definir as dosagens de caulinita e ácido húmico, foram realizados testes experimentais, no misturador elétrico, aplicando progressivamente quantidades controladas desses produtos e monitorando a cor aparente e a turbidez alcançada após agitação de 15 min a 500 rpm, conforme Tabela 5.

Tabela 5: Preparo da água de estudo

Caulinita ($mg.L^{-1}$)	Ácido Húmico ($mg.L^{-1}$)	Turbidez da água de estudo (uT)	Cor aparente da água de estudo (uH)
50	10	26,0	146
90	10	54,8	165

Com base nesses resultados, foram definidas as dosagens de 18g de caulinita e 2g de ácido húmico para cada batelada de 200L de água do poço, obtendo a água de estudo desejada. As características da água de estudo são apresentadas na Tabela 6.

Ao comparar as características da água de estudo com os diagramas de seleção de tecnologias de Valade; Becker; Edzwald (2009), apresentados no capítulo anterior (Figura 1), nota-se que os valores de COT, turbidez e cor verdadeira se enquadram. Assim, a água de estudo preparada foi representativa da tecnologia de ciclo completo com flotação.

Tabela 6: Caracterização da água de estudo

Parâmetro	Unidade	Valor
Turbidez	uT	54,8
Cor aparente	uH	165
Cor verdadeira	uH	86,8
Temperatura	°C	25
pH	-	6,64
Potencial zeta	mV	25,2
Condutividade	$\mu S.cm^{-1}$	60,7
Absorbância (254)	-	0,259
Alcalinidade	mg $CaCO_3.L^{-1}$	51,35
Coliformes totais	$NMP.100mL^{-1}$	1
Escherichia coli	$NMP.100mL^{-1}$	1
Dureza	mg $CaCO_3.L^{-1}$	0
COT	mg $.L^{-1}$	2,2045
Alumínio	mg $Al.L^{-1}$	0,69
Chumbo	mg $Pb.L^{-1}$	<LD
Cádmio	mg $Cd.L^{-1}$	0,019
Ferro	mg $Fe.L^{-1}$	0,26
Manganês	mg $Mn.L^{-1}$	0,006
Mercúrio	mg $Hg.L^{-1}$	<LD

5.2 – Ensaios de tratabilidade

5.2.1 – Diagramas de coagulação

Para a construção dos diagramas de coagulação, foram fixados os seguintes parâmetros de tratabilidade iniciais, segundo pesquisas de Plummer, Edzwald e Kelley (1995): gradiente de mistura rápida – Gmr = $700s^{-1}$, tempo de mistura rápida – Tmr = 15s, gradiente de mistura lenta – Gml = $50s^{-1}$, tempo de mistura lenta – Tml = 4min, tempo de flotação – Tf = 5min e taxa de recirculação –Rec = 5%.

Com esses parâmetros foram realizados diversos ensaios variando as dosagens de coagulante (cloreto de polialumínio – PAC, teor de Al_2O_3 de 17,56%) e alcalinizante

(hidróxido de sódio – NaOH). Tais ensaios obtiveram diferentes remoções de cor e turbidez na água clarificada, possibilitando, assim, a construção dos diagramas (Figuras 20 e 21).

Os melhores resultados (pontos ótimos) nos diagramas estão resumidos na Tabela 7.

Tabela 7: Melhores resultados nos diagramas de coagulação

Ponto indicados com setas nas Figuras 22 e 23	Concentração de cloreto de polialumínio [PAC] ($mg.L^{-1}$)	Concentração de íon alumínio [Al_3^+] ($mg.L^{-1}$)	Concentração de hidróxido de sódio [NaOH] ($mg.L^{-1}$)	Destaque
A	40	3,512	15	Melhor remoção de turbidez
B	25	2,195	0	Melhor remoção de turbidez sem alcalinizante
C	40	3,512	10	Melhor remoção de cor
D	27,5	2,4145	0	Melhor remoção de cor sem alcalinizante

O ponto selecionado foi o que apresentou maior eficiência sem necessidade de alcalinizante, por ser viável economicamente em sistemas em escala plena. Neste contexto, o ponto B foi definido como a dosagem base para os ensaios seguintes.

Giglio (2015) e Maciel (2014), embora tenham utilizado águas de estudo com características diferentes, também obtiveram os melhores resultados de remoção de turbidez com a dosagem de 25 mg/L de PAC, sem uso de alcalinizantes, em ensaios de tratabilidade com sedimentação.

A dosagem selecionada resultou em água clarificada com turbidez em torno de 4,0 uT e cor aparente ao redor de 15uH, o que, a princípio, não atenderam o padrão de potabilidade (BRASIL, 2011). Porém, ao realizar a filtração verificou-se valores de turbidez em torno de 0,1 uT e cor aparente abaixo do limite de detecção, segundo será discutido no item 5.2.3.

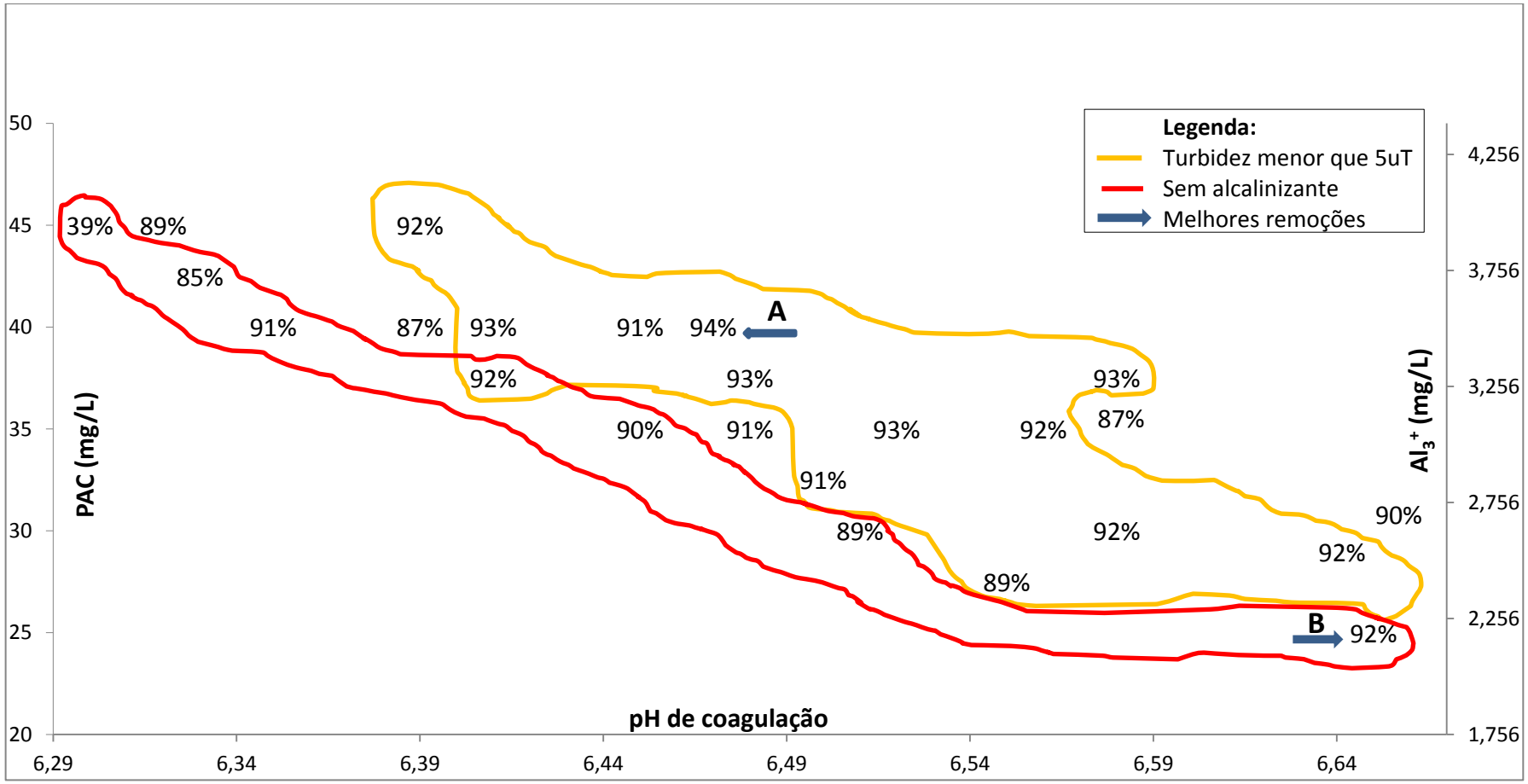


Figura 20 – Diagrama de coagulação para turbidez nas seguintes condições: dosagem de PAC entre 25 e 45 mg/L, Gmr = 700 s^{-1}, Tmr = 15s, Gml = 50s^{-1}, Tml = 4 min, Tf = 5min e Rec = 5%

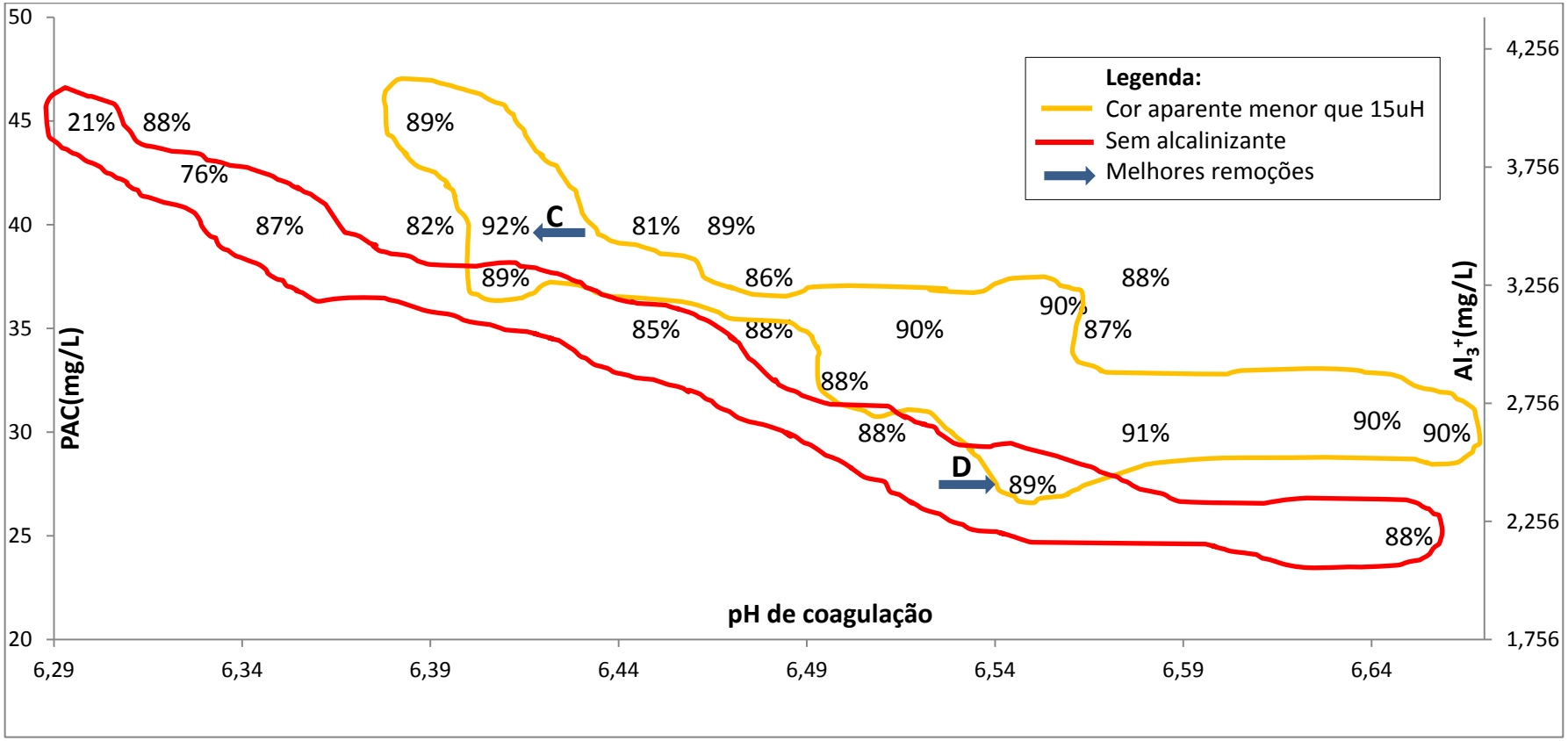


Figura 21 – Diagrama de coagulação para cor aparente nas seguintes condições: dosagem de PAC entre 25 e 45 mg/L, Gmr = 700 s^{-1}, Tmr = 15s, Gml = 50s^{-1}, Tml = 4 min,Tf = 5min e Rec = 5%

5.2.2 – Otimização dos parâmetros de tratabilidade

Com as condições iniciais de Gmr = 700s^{-1}, Tmr = 15s, Gml = 50s^{-1}, Tml = 4min, Tf = 5min e Rec = 5%, foram otimizados os parâmetros de acordo com as Figuras 22 a 27. As setas indicam os resultados com as melhores remoções.

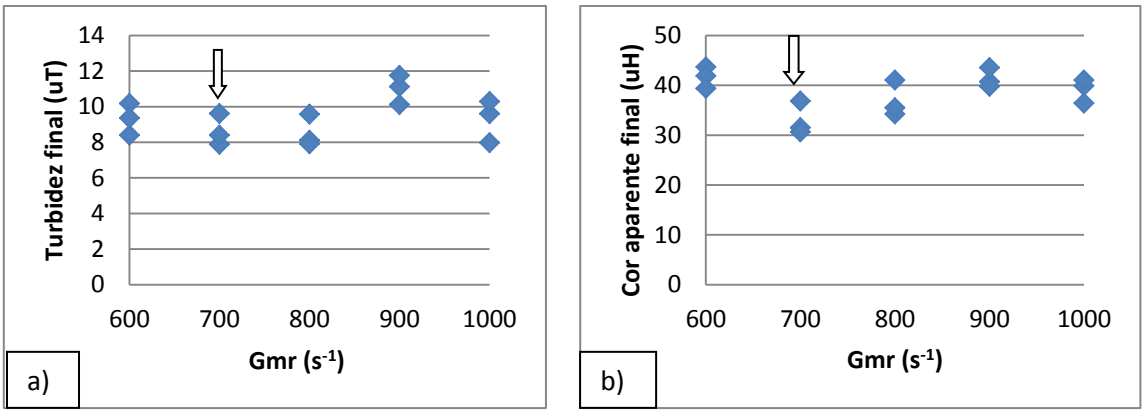


Figura 22 – Otimização do gradiente de mistura rápida em função das condições: Tmr = 15s, Gml = 50s^{-1}, Tml = 4min, Tf = 5min e Rec = 5% para a) remoção de turbidez e b) remoção de cor aparente.

O valor de 700s^{-1} para o Gmr foi definido por ter apresentado o melhor resultado.

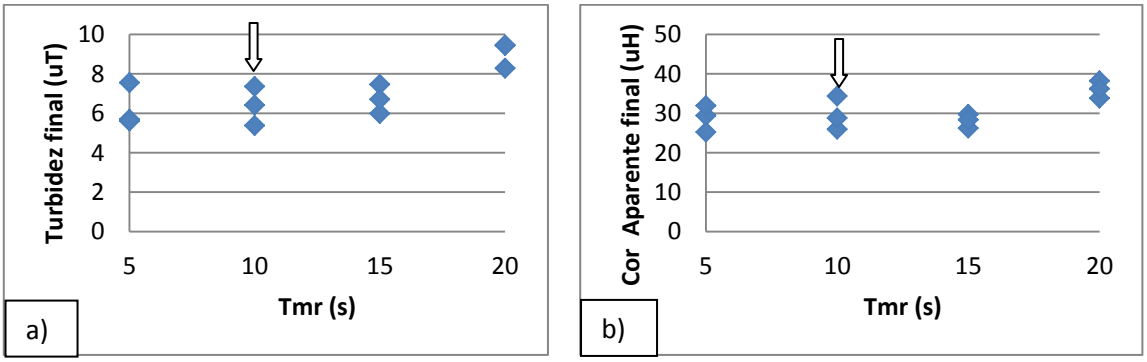


Figura 23 – Otimização do tempo de mistura rápida em função das condições: Gmr = 700s^{-1}, Gml = 50s^{-1}, Tml = 4min, Tf = 5min e Rec = 5% para a) remoção de turbidez e b) remoção de cor aparente.

A remoção dos parâmetros de interesse foi melhor na faixa próxima de 5 a 15s; assim padronizou-se o valor de 10s para Tmr.

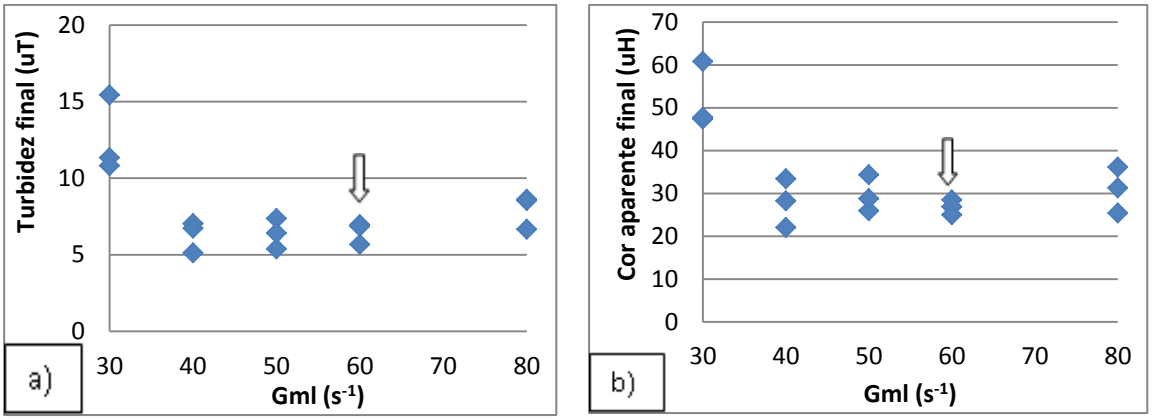


Figura 24 – Otimização do gradiente de mistura lenta em função das condições: Gmr = 700s^{-1}, Tmr = 10s, Tml = 4min, Tf = 5min e Rec = 5% para a) remoção de turbidez e b) remoção de cor aparente.

O valor de 40s^{-1} para Gml apresentou as melhores remoções, contudo, apenas para um dos três jarros do floteste. Assim, foi escolhido o valor de 60s^{-1} por apresentar remoções também baixas e com menores variações entre os jarros.

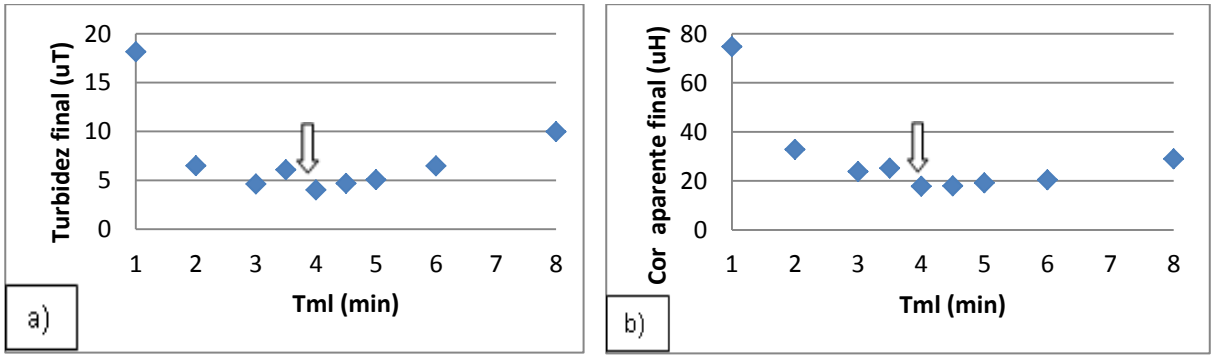


Figura 25 – Otimização do tempo de mistura lenta em função das condições: Gmr = 700s^{-1}, Tmr = 10s, Gml = 60s^{-1}, Tf = 5min e Rec = 5% para a) remoção de turbidez e b) remoção de cor aparente.

Os melhores resultados estiveram entre 3 e 5min, portanto, determinou-se o valor de 4min para Tml.

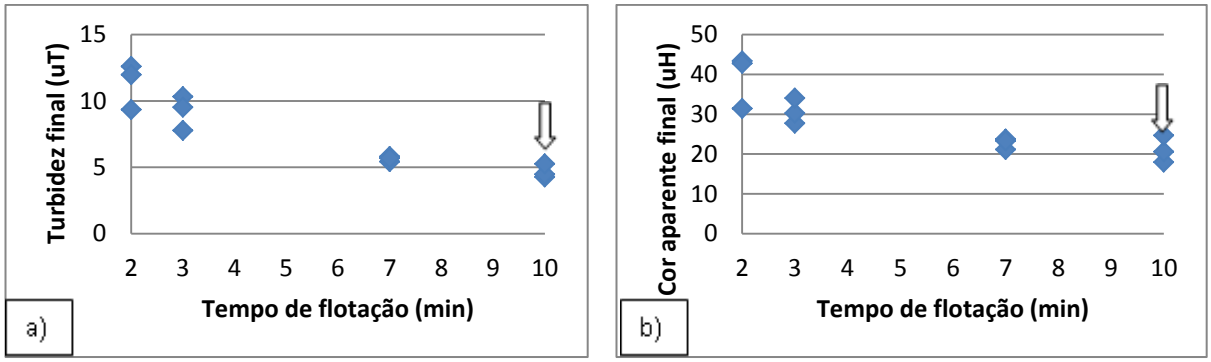


Figura 26 – Otimização do tempo de flotação em função das condições: Gmr = 700s^{-1}, Tmr = 10s, Gml = 60s^{-1}, Tml = 4min e Rec = 5% para a) remoção de turbidez e b) remoção de cor aparente.

Os gráficos mostram que, no floteste, quanto maior o Tf, melhores foram as remoções. Porém, nota-se uma aparente estabilização do desempenho em torno de 8min. Dessa forma, escolheu-se 10min como Tf, valor também recomendado por Edzwald e Haarhoff (2011).

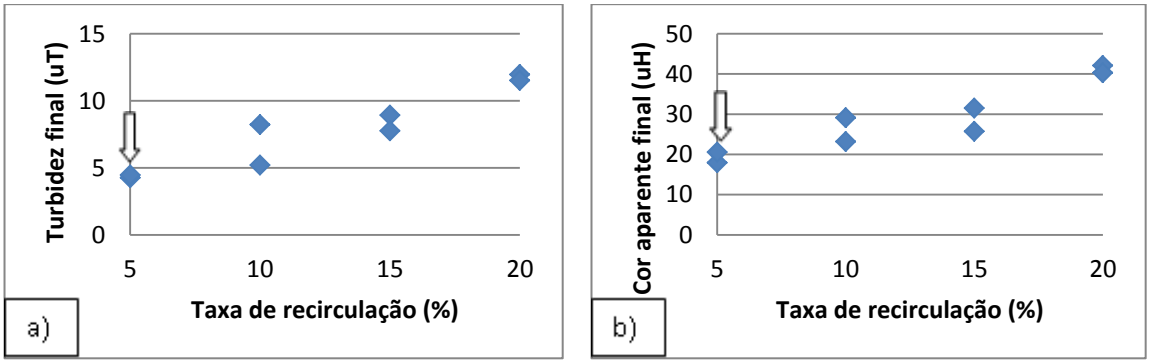


Figura 27 – Otimização da taxa de recirculação em função das condições: Gmr = 700s^{-1}, Tmr = 10s, Gml = 60s^{-1}, Tml = 4min e Tf = 10min para a) remoção de turbidez e b) remoção de cor aparente.

Os resultados mostram claramente que baixas taxas de recirculação possuem o melhor desempenho. Deste modo, determinou-se 5% por ser a menor taxa viável no aparelho.

Finalmente, a Tabela 8 resume os parâmetros de tratabilidade otimizados.

Tabela 8: Parâmetros de tratabilidade otimizados

Parâmetros	Sigla	Unidade	Valor
Concentração de caulinita na água de estudo	-	$mg.L^{-1}$	90
Concentração de ácido húmico na água de estudo	-	$mg.L^{-1}$	10
Dosagem de coagulante (PAC com 17,56% de Al_2O_3)	-	$mg.L^{-1}$	25
Gradiente de mistura rápida	Gmr	s^{-1}	700
Tempo de mistura rápida	Tmr	s	10
Gradiente de mistura lenta	Gml	s^{-1}	60
Tempo de mistura lenta	Tml	min	4
Tempo de flotação	Tf	min	10
Taxa de recirculação	Rec	%	5

Plummer, Edzwald e Kelley (1995) estudaram a remoção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento utilizando flotação em diferentes condições de tratabilidade. Os autores encontraram os melhores resultados com tempo de mistura lenta de 5min e taxa de recirculação na faixa de 5 a 10% – valores semelhantes aos da Tabela 8. Uma relação diretamente proporcional entre a remoção de turbidez e oocistos foi observada na pesquisa supracitada.

5.2.3 – Curvas de flotação

Como não é possível realizar a curva de flotação no equipamento da Nova Ética (Modelo 218/3) devido a limitada altura dos jarros, as curvas de flotação foram obtidas no flotateste de coluna do laboratório LATAR, utilizando os parâmetros otimizados. Os resultados estão na Figura 28.

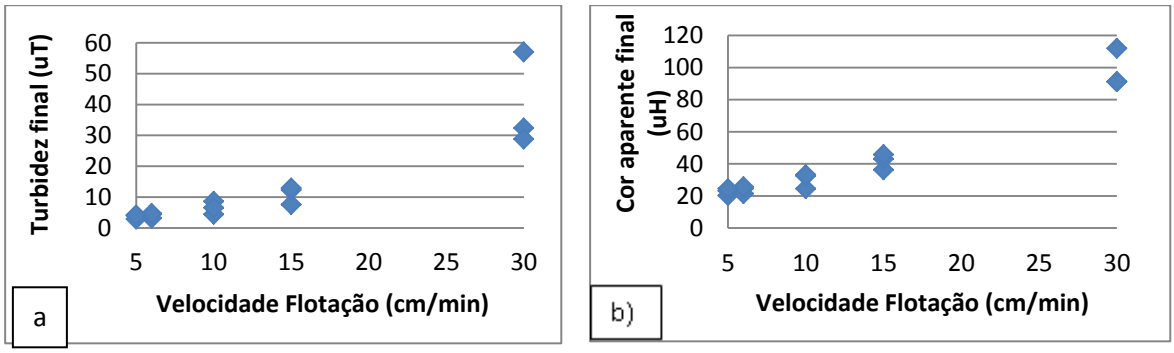


Figura 28 – Curvas de flotação para turbidez (a) e cor aparente (b)

Os gráficos mostram que as melhores remoções de turbidez e cor aparente se encontram nas menores velocidades de flotação. Tal resultado é semelhante às curvas de flotação realizadas por Reali, Moruzzi e Patrizzi (2003) na otimização de parâmetros para tratamento de água com alta turbidez. Assim, a velocidade de flotação de 5,0cm.min^{-1} foi selecionada.

Uma vez definidos a dosagem de coagulante e os parâmetros de tratabilidade, um ensaio final com filtração foi realizado com taxa de, aproximadamente, 100m³m^{-2}dia^{-1} (Tabela 9).

Tabela 9: Características da água de estudo tratada

Jarro	Características da amostra após 10min de filtração		Características da amostra após 20min de filtração	
	Cor Aparente (uH)	Turbidez (uT)	Cor Aparente (uH)	Turbidez (uT)
1	0	0,226	0	0,128
2	0	0,197	0	0,155
3	0	0,166	0	0,095

Segundo a Portaria nº 2914 (BRASIL, 2011), a água potável, tratada por tecnologias com coagulação química, deve apresentar até 0,5uT e 15uH para turbidez e cor aparente, respectivamente. Portanto, esse ensaio permitiu comprovar o atendimento ao padrão de potabilidade.

5.3 – Coleta e caracterização das fases líquida e sólida do tratamento em floteste

Ao finalizar os ensaios de tratabilidade, as características das águas clarificada e filtrada e dos resíduos (lodo e água de lavagem dos filtros) foram avaliadas e os resultados estão na Tabela 10.

Tabela 10: Características das águas clarificada e filtrada e dos resíduos gerados no floteste

Parâmetro	Unidade	Lodo flotado	Água clarificada	Água de lavagem dos filtros	Água filtrada
Turbidez	uT	459	3,64	3,56	0,2
Cor aparente	uH	395	16,8	11,9	0
pH	-	6,73	6,69	6,42	6,8
Potencial zeta	mV	-0,169	-0,611	0,454	-0,22
Condutividade	$\mu S.cm^{-1}$	41,95	56,67	15,472	53,25
Absorbância (254)	-	0,028	0,017	0,012	0,016
Alcalinidade	$mgCaCO_3.L^{-1}$	35,79	35,79	10,89	32,29
Sólidos totais	$g.L^{-1}$	0,71	NM	0,12	NM
Sólidos voláteis totais	$g.L^{-1}$	0,17	NM	0,09	NM
Sólidos fixos totais	$g.L^{-1}$	0,54	NM	0,03	NM
Sólidos suspensos totais	$g.L^{-1}$	0,48	NM	0,01	NM
Sólidos suspensos voláteis	$g.L^{-1}$	0,07	NM	0,01	NM
Sólidos suspensos fixos	$g.L^{-1}$	0,41	NM	0	NM
Sólidos sedimentáveis	%	1,8	NM	NM	NM
COT	$mg.L^{-1}$	11,454	NM	0,048	NM
DQO	$mg.L^{-1}$	105,84	NM	0	NM
Alumínio	$mg\ Al.L^{-1}$	0,83	0,83	1,17	0,21
Chumbo	$mg\ Pb.L^{-1}$	<LD	<LD	<LD	<LD
Cádmio	$mg\ Cd.L^{-1}$	0,003	0,003	0,031	0,005
Ferro	$mg\ Fe.L^{-1}$	0,063	0,063	0,104	0,062
Manganês	$mg\ Mn.L^{-1}$	0,006	0,006	0,014	0,019
Mercúrio	$mg\ Hg.L^{-1}$	< LD	< LD	< LD	< LD

Nota: NM: não medido; LD: limite de detecção

Ao comparar os parâmetros medidos, é possível observar os maiores valores no lodo flotado, principalmente em relação à cor, turbidez, sólidos, DQO e COT. Tal fato indica a separação das impurezas da água de estudo e conseguinte concentração das mesmas no resíduo.

A maioria das pesquisas sobre as características dos resíduos gerados no tratamento de água abordam apenas os resíduos da tecnologia de ciclo completo com decantação. Ao

respeito do lodo flotado, muitos autores citam unicamente que tal resíduo possui maior concentração de sólidos (ASCE, 1996; REALI, 1999; EDZWALD e HARRHOFF, 2011).

Ao comparar as características do lodo flotado com os resultados de Marwell[1] (2004, apud GUIMARÃES, 2007) sobre o resíduo gerado na instalação piloto de flotação da ETA-Brasília (DQO de 19,1mg.L^{-1}, pH de 5,4 e 2,6% de sólidos totais), nota-se que os resíduos são diferentes, apesar de ambos utilizarem o mesmo tipo de coagulante (PAC). Tal constatação ratifica que as características do lodo flotado dependem da qualidade da água bruta.

A água de lavagem dos filtros apresentou, no geral, maior concentração de metais em comparação às demais amostras. Apesar disso, nota-se a presença de metais no lodo flotado, assim como foram detectados também no resíduo flotado da instalação experimental do rio Pinheiros (CIRQUEIRA, 2009).

Em relação ao alumínio, houve uma maior concentração nos resíduos do que na água de estudo, fato que confirma a presença desse elemento no coagulante (PAC).

Também é possível observar a redução gradual de muitos parâmetros entre a água de estudo, a água clarificada e a água filtrada, advertindo a eficiência progressiva do tratamento. A água filtrada atendeu às exigências da Portaria nº 2914 (BRASIL, 2011).

5.4- Ensaios de qualidade do protocolo adotado para detecção de (oo)cistos

5.4.1- Floculação em Carbonato de Cálcio – FCCa sem IMS

Antes de aplicar o protocolo de FCCa sem IMS, era necessário realizar o ensaio de qualidade analítica do método, inoculando nas amostras valores conhecidos dos (oo)cistos; portanto, as suspensões de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. foram utilizadas para tal fim. As suspensões em questão foram contadas em triplicata e os resultados estão na Tabela 11.

[1] MARWELL, D.T.B. Estudo da Desidratação por Centrifugação do Lodo Produzido do Flotador da ETA Piloto Brasília. Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

Tabela 11: Contagem das suspensões de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium spp.*

Suspensões	Poço da lâmina	Alíquota (µL)	Contagem de (oo)cistos	Média e desvio padrão
Giardia spp.	1	10	610	732,3 ± 106
	2		798	
	3		789	
Cryptosporidium spp.	1	20	768	782 ± 108,7
	2		681	
	3		897	

Ao conhecer o número médio de organismos inoculados, o ensaio de qualidade analítica foi realizado e os resultados estão na Tabela 12.

Tabela 12: Resultados do controle de qualidade analítica do método de FCCa sem IMS utilizando as suspensões de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium spp.*

Protozoário	Amostra	1		2		3	
Giardia spp.	Poço da lâmina	1	2	1	2	1	2
	Contagem de organismos	21	27	29	22	13	17
	Soma dos poços	48		51		30	
	Média total ± Desvio Padrão	430 ± 114					
	Recuperação (%) ± CV(%)	58,7 ± 26,4					
Cryptosporidium spp.	Amostra	1		2		3	
	Poço da lâmina	1	2	1	2	1	2
	Contagem de organismos	22	16	41	38	26	31
	Soma dos poços	38		79		57	
	Média total ± Desvio Padrão	580 ± 205					
	Recuperação (%) ± CV(%)	74,2 ± 35,4					

Nota: volume final de cada amostra: 1mL; volume total de alíquotas dos poços: 100µL; Fator de multiplicação: 10.

O ensaio apresentou altas recuperações, porém, o teste com o branco detectou a presença de um oocisto, indicando que houve algum tipo de contaminação no ensaio. Portanto, foram definidas algumas modificações na execução dos testes visando evitar esse problema, tais como: troca das mangueiras utilizadas no sifonamento a cada ensaio; maior

distância entre as lâminas durante a montagem das mesmas para evitar contaminação por respingos e maior atenção durante a limpeza e desinfecção de vidrarias, ponteiras, etc.

O próximo ensaio de qualidade analítica foi realizado utilizando o *kit AccuSpike®* que, segundo informações do fabricante (Anexo C), possui, em cada frasco, média de 100,6 cistos de *Giardia* spp. com CV de 1,6 % e média de 99,9 oocistos de *Cryptosporidium* spp. com CV de 1,7%. Os resultados deste teste estão na Tabela 13.

Tabela 13: Ensaio inicial de qualidade analítica do método com *AccuSpike®*

Protozoário	Amostra	1		2		3	
Giardia spp.	Poço da lâmina	1	2	1	2	1	2
	Contagem de organismos	1	0	1	1	1	1
	Soma dos poços	1		2		2	
	Média total ± Desvio Padrão	17 ± 6					
	Recuperação (%) ± CV(%)	16,7 ± 34,6					
Cryptosporidium spp.	Amostra	1		2		3	
	Poço da lâmina	1	2	1	2	1	2
	Contagem de organismos	3	1	1	4	1	2
	Soma dos poços	4		5		3	
	Média total ± Desvio Padrão	40 ± 10					
	Recuperação (%) ± CV(%)	40 ± 25					

Nota: volume final de cada amostra: 1mL; volume total de alíquotas dos poços: 100µL; fator de multiplicação = 10

No ensaio não foram encontrados (oo)cistos na lâmina da amostra de branco, o que indica a inexistência de contaminação.

Ao comparar os testes realizados com suspensões e com *AccuSpike®*, observa-se que o ultimo obteve uma grande redução de recuperações para ambos os protozoários. Tal fato pode estar ligado à influência do número de organismos inoculados na recuperação, como foi observado por Giglio (2015) onde se verificou que não há proporcionalidade ao definir a concentração de (oo)cistos nos volumes da suspensão. Mesmo assim, as recuperações encontradas no ultimo ensaio são maiores do que as registradas por Cantusio Neto (2008) em ensaios, também, feitos com FCCa sem IMS e em água bruta inoculada artificialmente. O autor obteve recuperações médias de 14,3% ± 12,2% para cistos de *Giardia* spp. e 26,8% ± 44,8% para oocistos de *Cryptosporidium* spp.

Após concluir este ensaio, foram iniciados os testes de tratabilidade com protozoários, conforme item 5.5. Terminados esses testes, foi realizado mais um ensaio de qualidade analítica do método com *AccuSpike*® a fim de observar se as recuperações de (oo)cistos se mantinham estáveis.

Este último ensaio de qualidade também foi realizado com o objetivo de atender aos critérios de qualidade do Método 1623.1 da USEPA (2012), sendo assim, o ensaio foi realizado desta vez com 4 amostras junto com o branco. Igualmente foi acrescentado mais um poço na contagem das lâminas, de forma a reduzir o fator de multiplicação de 10 para 6,7. Os resultados estão na Tabela 14.

Tabela 14: Ensaio final de qualidade analítica do método de FCCa sem IMS e com AccuSpike®

Giardia spp.	Amostra	1			2			3			4		
	Poço da lâmina	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	Contagem de cistos	2	1	1	1	4	1	1	0	4	0	2	2
	Soma dos poços	4			6			5			4		
	Média total de cistos ± Desvio Padrão	31,7 ± 6,4											
	Recuperação de cistos (%) ± CV(%)	31,5 ± 20,2											
Cryptosporidium spp.	Amostra	1			2			3			4		
	Poço da lâmina	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	Contagem de oocistos	5	3	3	3	4	5	3	2	5	4	4	1
	Soma dos poços	11			12			10			9		
	Média total de oocistos ± Desvio Padrão	70 ± 8,6											
	Recuperação de oocistos (%) ± CV(%)	70,3 ± 12,3											

Nota: volume final de cada amostra: 1mL; volume total de alíquotas dos poços: 150µL; fator de multiplicação = 6,7

Assim como no ensaio de qualidade anterior, não foram encontrados (oo)cistos nos poços correspondentes à amostra sem inoculação (branco).

O ensaio indicou que ocorreu uma melhora na recuperação em relação ao teste anterior, devido ao aumento de mais um poço na leitura (reduzindo o fator de multiplicação) e

à experiência no manuseio dos instrumentos laboratoriais durante o desenvolvimento da pesquisa. Também foi possível atestar a qualidade da metodologia adotada ao comprovar que as recuperações e seus respectivos coeficientes de variação estão de acordo com as recomendações do Método 1623.1, conforme será discutido no item 5.4.3.

5.4.2- Floculação em Carbonato de Cálcio – FCCa com IMS

Novamente, antes de aplicar o protocolo de FCCa com IMS, era indispensável realizar o ensaio de qualidade analítica do método, inoculando nas amostras valores conhecidos dos (oo)cistos; portanto, as suspensões de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. foram utilizadas. Da mesma forma que o ensaio inicial sem IMS, os mesmos volumes de suspensões adicionados nas amostras foram aplicados nas lâminas de microscopia para contagem dos organismos inoculados. Os resultados estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Contagem das suspensões de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium spp.*

Suspensões	Poço da lâmina	Alíquota (µL)	Contagem de (oo)cistos	Média e desvio padrão
Giardia spp.	1	10	620	644,7 ± 31,4
	2		634	
	3		680	
Cryptosporidium spp.	1	20	226	302,7 ± 89,5
	2		281	
	3		401	

Ao conhecer o número médio de organismos inoculados, o ensaio de qualidade analítica foi realizado e os resultados estão na Tabela 16.

Tabela 16: Resultados do controle de qualidade analítica do método de FCCa com IMS utilizando as suspensões de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium spp.*

Protozoário	Amostra	1			2			3		
Giardia spp.	Dissociação	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª
	Contagem de cistos	47	271	54	15	142	116	19	209	165
	Soma 2 dissociações	318			157			228		
	Soma 3 dissociações	372			273			393		
	Média total de oocistos ± Desvio Padrão	2 dissociações					3 dissociações			
		234,3 ± 80,7					346 ± 64,1			
	Recuperação de cistos(%) ± CV(%)	36,3 ± 14,3					53,7 ± 12,6			
Cryptosporidium spp.	Amostra	1			2			3		
	Dissociação	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª
	Contagem de oocistos	27	61	32	17	69	14	84	35	20
	Soma 2 dissociações	88			86			119		
	Soma 3 dissociações	120			100			139		
	Média total de oocistos ± Desvio Padrão	2 dissociações					3 dissociações			
		97,7 ± 18,5					120 ± 19,5			
	Recuperação de oocistos(%) ± CV(%)	32,3 ± 15,7					39,5 ± 18,1			

Os resultados mostraram o aumento das recuperações com o acréscimo da terceira dissociação. Também não foram encontrados protozoários na amostra sem inoculação (branco).

Ao término desse ensaio, foram realizados os testes de tratabilidade com protozoários utilizando a FCCa com IMS (item 5.5). Ao concluir esses testes, foi realizado o ultimo ensaio de qualidade analítica utilizando o *kit Easy-Seed*® visando atender aos critérios de qualidade do Método 1623.1 (USEPA, 2012). Segundo informações do fabricante (Anexo D), o kit possui, em cada frasco, média de 99 cistos de *Giardia* spp. com desvio padrão de 1,5 e média de 99 oocistos de *Cryptosporidium* spp. com desvio padrão de 1,4. Os resultados estão na Tabela 17.

Tabela 17. Ensaio final de qualidade analítica do método de FCCa com IMS e com *Easy-Seed®*

Giardia lamblia	Amostra	1			2			3			4		
	Dissociações	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª
	Contagem de organismos	6	8	9	5	12	10	4	11	5	3	17	8
	Soma 2 dissociações	14			17			15			20		
	Soma 3 dissociações	23			27			20			28		
	Média total de cistos ± Desvio Padrão	2 dissociações						3 dissociações					
		16,5 ± 2,6						24,5 ± 3,7					
	Recuperação de cistos (%) ± CV(%)	16,7 ± 2,9						24,7 ± 4,1					
Cryptosporidium parvum	Amostra	1			2			3			4		
	Dissociações	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª
	Contagem de organismos	12	16	12	9	20	17	16	17	20	17	21	7
	Soma 2 dissociações	28			29			33			38		
	Soma 3 dissociações	40			46			53			45		
	Média total de oocistos ± Desvio Padrão	2 dissociações						3 dissociações					
		32 ± 4,5						46 ± 5,4					
	Recuperação de oocistos (%) ± CV(%)	32,3 ± 5						46,5 ± 6,1					

Nos ensaios, as amostras de branco testadas não apresentaram (oo)cistos de protozoários. Dessa forma se constatou a inexistência de contaminação nos testes realizados.

Ao comparar com os resultados do ensaio anterior, nota-se que houve redução da recuperação de *Giardia* spp., tal fato pode estar relacionado com a diferença de organismos inoculados entre os ensaios. Em relação à *Cryptosporidium* spp., houve praticamente a mesma recuperação para duas dissociações e um pequeno aumento para três dissociações.

Cantusio Neto (2008), em ensaios realizados com FCCa com IMS e em água bruta inoculada artificialmente, obteve recuperações médias de 58% ± 60,4% para cistos de *Giardia* spp. e 12,5% ± 6,6% para oocistos de *Cryptosporidium* spp. Ao comparar, tais resultados contrastam com os do presente trabalho, lembrando que as pesquisas foram realizadas com água de estudo, inóculos, insumos e laboratórios diferentes. Assim, pode-se assumir que as recuperações de protozoários variam devido a diversas características, aspecto também constatado por Digiorgio, Gonzales e Huitt (2002).

Giglio (2015), em ensaio de qualidade do método de FCCa em resíduo sedimentado com alta turbidez, utilizando IMS com duas dissociações, obteve recuperações de 42% ±15% para *Giardia* spp. e 68% ± 25% para *Cryptosporidium* spp. Neste contexto de diferentes matrizes, a FCCa com IMS, mesmo com duas dissociações, aparentemente resultou melhores eficiências em amostras turvas.

5.4.3 Comparação entre os métodos de FCCa com e sem IMS

A Tabela 18 mostra os resultados das recuperações de organismos segundo os métodos testados. Também apresenta os critérios de qualidade, estabelecidos pela USEPA (2012).

Tabela 18 – Recuperações de (oo)cistos entre os métodos de qualidade testados (FCCa com e sem IMS).

Protozoários	*Giardia* spp.		*Cryptosporidium* spp.	
Protocolos testados	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)
FCCa sem IMS[1]	31,5	20,2	70,3	12,3
FCCa com IMS[2]	16,7	2,9	32,3	5
FCCa com IMS[3]	24,7	4,1	46,5	6,1
Critérios USEPA[4]	8 - 100	≤ 97	32 - 100	≤ 46

Nota: 1- ensaio com AccuSpike® ; 2- ensaio com Easy-Seed® e duas dissociações; 3- ensaio com EasySeed® e três dissociações; 4- critérios de qualidade segundo USEPA (2012); CV: Coeficiente de variação (desvio padrão relativo)

Ao analisar os dados, verifica-se que todos os métodos testados (FCCa com e sem IMS) atenderam aos critérios de aceitação do Método 1623.1 (USEPA, 2012), para ambos os protozoários testados. Assim como os resultados de Giglio (2015) e Feng et al. (2011) que registraram recuperações que também atendem os critérios.

O métodos de FCCa sem IMS apresentou melhor recuperação, tanto para cistos quanto para oocistos. Maciel (2014), utilizando protocolos (filtração em membranas com e sem IMS) e matriz (água com elevada turbidez) diferentes à presente pesquisa observou melhores recuperações quando a etapa de purificação por IMS não era utilizada.

Para saber se as diferenças entre os métodos testados são estatisticamente significativas, foram realizados testes de hipóteses (teste t) com as considerações apresentadas na Tabela 2 (item 4.7).

Como cada ensaio foi realizado com 4 amostras, tem-se que o grau de liberdade dos testes, para ambos os protozoários é igual a 6 (4 + 4 – 2 = 6). Considerando 95% de nível de confiança dos testes, a tabela T *Student* fornece o valor de Z = 2,447. Assim, a região crítica observada é de -2,447 a 2,447 e a Tabela 19 apresenta os resultados da aplicação das equações da Tabela 2 para os testes de hipóteses.

Tabela 19: Dados dos testes de hipóteses segundo as considerações da Tabela 2

Testes	Métodos	Protozoários	X_1	X_2	S_1^2	S_2^2	S_p^2	T
1	Sem IMS[1] e com IMS[2]	*Giardia* spp.	32	17	40,7	7,0	23,87	3,802
		Cryptosporidium spp.	70	32	74,8	20,7	47,74	6,798
2	Sem IMS[1] e com IMS[3]	*Giardia* spp.	32	25	40,7	13,7	27,20	1,683
		Cryptosporidium spp.	70	46	74,8	28,7	51,74	4,146

Nota: 1- ensaio com AccuSpike® ; 2- ensaio com Easy-Seed® e duas dissociações; 3- ensaio com Easy-Seed® e três dissociações.

No primeiro teste, o valor calculado das hipóteses (T) é maior que o limite da região crítica, para ambos os protozoários. Dessa forma, assume-se a hipótese 2. No segundo teste, a hipótese 1 foi confirmada somente para *Giardia* spp.

De acordo com os resultados observados pelos testes de hipóteses, o método analítico de FCCa sem IMS possui recuperação significativamente superior do que o método com IMS e com duas dissociações ácidas, para ambos os protozoários testados. Com a inclusão de uma terceira dissociação, o método sem IMS continua sendo estatisticamente diferente apenas para *Cryptosporidium* spp.

Embora a fase de purificação por separação imunomagnética (IMS) permite uma melhor visualização dos (oo)cistos, reduzindo as sujidades do poço, a aplicação do método, com diversas etapas de transporte de amostras entre tubos, pode ocasionar perdas de organismos. Ao excluir essa etapa (IMS), o número de procedimentos delicados se reduz e,

provavelmente, as chances de melhores recuperações aumentam. Essa é uma possível explicação para as melhores recuperações serem do método sem IMS.

Para comparar economicamente os protocolos testados (FCCa com e sem IMS), unicamente para o teste de qualidade analítica do método, calculou-se o custo médio das análises, segundo as considerações do item 4.7. A Tabela 20 apresenta a média e o desvio padrão dos valores orçados.

Tabela 20: Valores orçados dos materiais utilizados, para uma única amostra, em 1 de abril de 2016

Produto:	*Merifluor®*	*Dynadeads®*	*Easyseed®*
Preços unitários orçados (R$) – valor correspondente a uma única amostra	107,10	228,46	511,80
	112,75	525,77	429,39
	161,80	833,13	439,50
	141,19	247,17	437,33
	181,48	247,20	489,51
	137,20		
	132,33		
Média (R$):	139,12	416,35	461,51
Desvio Padrão (R$)	26,09	263,73	36,79

Nota: Valores atualizados para 1 de abril de 2016 segundo índice IGP – M (FGV) e considerando uma única aplicação do produto.

De acordo com os dados econômicos apresentados, entre os materiais utilizados o kit *Merifluor®* é o que possui menor custo médio por aplicação e os protozoários quantificados do *Easyseed®* possuem o maior custo. Com relação à variedade de custos, o kit *Dynadeads®* possui maior discrepância entre os orçamentos como pode ser visto pelo alto desvio padrão.

Uma vez conhecendo o custo unitário de cada produto, foi possível estimar o custo médio de cada ensaio de qualidade, para efeito de comparação. Tal cálculo foi realizado considerando que no ensaio de FCCa com IMS e 3 dissociações foram processadas 4 amostras sendo, então, necessárias 4 unidades do kit *Dynadeads®*, 12 do kit *Merifluor®* e 4 do *Easyseed®*. Para o ensaio de FCCa com IMS e 2 dissociações foram consideradas 4 unidades do kit *Dynadeads®*, 8 do kit *Merifluor®* e 4 do *Easyseed®*. Finalmente, no caso do ensaio de FCCa sem IMS, 4 amostras foram avaliadas com 3 alíquotas cada, portanto, 12 unidades do kit *Merifluor®* e 4 do *Easyseed®* foram utilizadas (Tabela 21).

Tabela 21: Custo médio do teste de qualidade analítica do método de FCCa com e sem IMS, em 1 de abril de 2016, com dados atualizados utilizando o índice IGP-M (FGV)

Método	Custo médio de cada teste de qualidade (R$)
FCCa sem IMS[1]	3.515,48 ± 460,24
FCCa com IMS e 2 dissociações[2]	4.624,40 ± 1.410,80
FCCa com IMS e 3 dissociações[3]	5.180,88 ± 1.515,16

Nota: 1- Considerando 4 unidades de Easyseed® e 4 do kit Merifluor®; 2 - Considerando 4 unidades de Easyseed®, 8 do kit Merifluor® e 4 do kit Dynadeads®; 3- Considerando 4 unidades de Easyseed®, 12 do kit Merifluor® e 4 do kit Dynadeads®.

A Tabela 21 mostra que o protocolo de FCCa com IMS tem custo de cerca de 24% maior do que o custo do método sem IMS, quando comparado com duas dissociações ácidas e 32% maior quando ponderado com três dissociações. Maciel (2014) comparou custos dos ensaios de sua pesquisa com e sem IMS e também observou que a não utilização da separação imunomagnética torna as análises mais econômicas.

Ao comparar os resultados das análises estatísticas das recuperações e dos custos envolvidos entre os métodos estudados, é possível ponderar que o método de FCCa sem IMS é o melhor por ser mais econômico e com melhor recuperação do que o método de FCCa com IMS.

5.5- Ensaios de tratabilidade com protozoários

5.5.1- Fase 1 – Coagulação, floculação e flotação

Um primeiro ensaio foi realizado referente à Fase 1 utilizando o método de FCCa sem IMS. A Tabela 22 apresenta a contagem do inóculo e a Tabela 23 os organismos detectados na água clarificada e no resíduo flotado no floteste.

Tabela 22: Contagem das suspensões para o primeiro ensaio da Fase 1

Suspensões	Poço da lâmina	Alíquota (µL)	Contagem de (oo)cistos em cada poço	Média e desvio padrão
Giardia spp.	1	5	337	385 ± 68
	2		433	
Cryptosporidium spp.	1	15	453	528 ± 105
	2		602	

Tabela 23: Contagem dos (oo)cistos no primeiro ensaio da Fase 1

Matriz	Água clarificada[1]				Lodo flotado[2]			
Protozoários	Poços	(oo)cistos em cada poço	Soma dos 3 poços	Total de (oo)cistos (Equação 2)	Poços	(oo)cistos em cada poço	Soma dos 3 poços	Total de (oo)cistos (Equação 2)
Giardia spp.	1	0	3	20	1	2	11	147
	2	1			2	6		
	3	2			3	3		
C. spp.	1	1	2	13	1	9	35	467
	2	0			2	12		
	3	1			3	14		

Notas: 1- volume final da amostra: 1,0mL; volume total de alíquotas dos poços: 150µL; FM = 6,7;
2- volume final da amostra: 2,0mL; volume total de alíquotas dos poços: 150µL; FM = 13,3

A maior proporção de (oo)cistos estava no lodo flotado, indicando a eficiência do tratamento. Também foi possível observar as diferenças entre as matrizes utilizadas (água clarificada e lodo flotado). Nota-se que o volume de material aderido no fundo do tubo (*pellet*) é maior no lodo, segundo Figura 29.

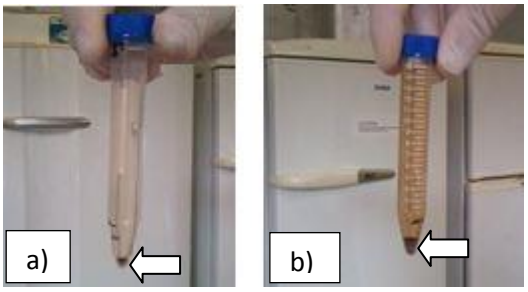


Figura 29 – *Pellet* das amostras de água clarificada (a) e do lodo flotado (b), após centrifugação

Devido às diferenças de volume de *pellet* nas amostras, a princípio foi estabelecida a aspiração do sobrenadante até a marcação de 2mL para a amostra de lodo flotado e 1mL para a de água clarificada, visando reduzir os riscos de perdas de organismos. Contudo, após verificar que o volume de *pellet* do lodo era menor que 0,5mL foi decidido reduzir o volume final concentrado do lodo flotado em 1mL para os próximos ensaios. Dessa forma, foi possível manter o mesmo fator de multiplicação para ambas as amostras, padronizando as análises.

A alta concentração de impurezas presente no lodo flotado resultou no aumento da cor da amostra lida no microscópio, como se observa na Figura 30.

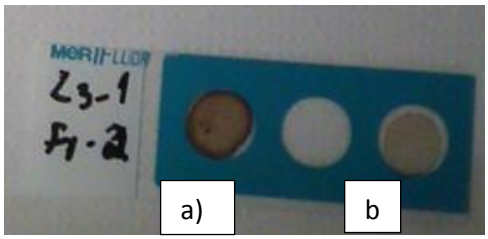


Figura 30 - Lâmina com alíquotas de lodo (a) e água clarificada (b)

A Fase 1 foi repetida em triplicada, assim, uma nova contagem da suspensão foi realizada (Tabela 24) e os resultados do ensaio, utilizando o método de FCCa sem IMS, estão na Tabela 25.

Tabela 24: Contagem das suspensões, ensaio em triplicata da Fase 1, utilizando o método de FCCa sem IMS

Suspensões	Poço da lâmina	Alíquota (µL)	Contagem de (oo)cistos em cada poço	Média e desvio padrão
Giardia spp.	1	10	1223	1055 ± 189
	2		1092	
	3		850	
Cryptosporidium spp.	1	25	1147	1076 ± 83
	2		984	
	3		1086	

Tabela 25: Contagem dos (oo)cistos presentes na água clarificada e no lodo flotado, ensaio em triplicata da Fase 1, utilizando o método de FCCa sem IMS

Protozoários	Amostra	Poços da lâmina	(oo)cistos na lâmina	Soma das lâminas	Média e desvio padrão
Amostra: Água Clarificada					
Giardia spp.	1	1	0	5	53 ± 18
		2	2		
		3	3		
	2	1	6	10	
		2	1		
		3	3		
	3	1	2	9	
		2	3		
		3	4		
C. spp.	1	1	5	11	91 ± 17
		2	2		
		3	4		
	2	1	7	16	
		2	7		
		3	2		
	3	1	4	14	
		2	6		
		3	4		
Amostra: Lodo Flotado					
Giardia spp.	1	1	20	68	649 ± 171
		2	13		
		3	35		
	2	1	39	115	
		2	31		
		3	45		
	3	1	38	109	
		2	42		
		3	29		
C. spp.	1	1	36	137	962 ± 58
		2	48		
		3	53		
	2	1	50	154	
		2	43		
		3	61		
	3	1	51	142	
		2	47		
		3	44		

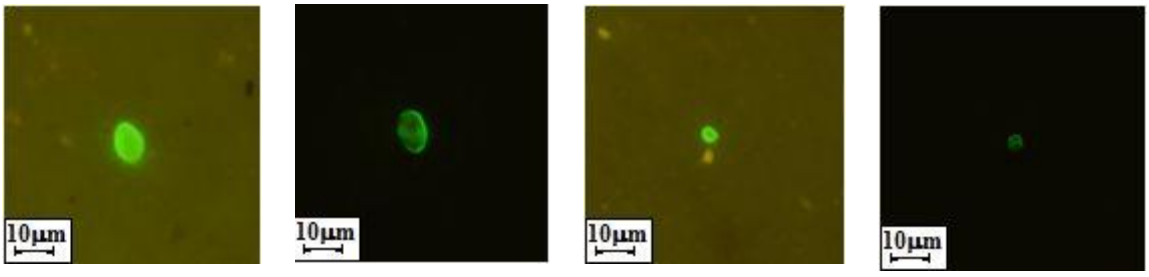
Notas: volume final de cada amostra: 1,0 mL; volume total de alíquotas dos poços: 150µL; Fator de multiplicação (FM) = 6,7

Para efeito de comparação entre os métodos testados (FCCa com e sem IMS), o ensaio da Fase 1 foi repetido, em triplicata, utilizando a purificação das amostras com IMS. A contagem das suspensões está na Tabela 26 e os resultados na Tabela 27.

Tabela 26: Contagem das suspensões, ensaio em triplicata da Fase 1, utilizando FCCa com IMS.

Suspensões	Poço da lâmina	Alíquota (µL)	Contagem de (oo)cistos em cada lâmina	Média e desvio padrão
Giardia spp.	1	10	1383	1465 ± 76
	2		1533	
	3		1479	
Cryptosporidium spp.	1	40	1561	1370 ± 171
	2		1316	
	3		1232	

Em relação à visualização dos (oo)cistos, a utilização da separação imunomagnética reduz as sujidades da amostra e facilita a identificação dos organismos, como é possível observar nas amostras de lodo flotado da Figura 31 .



Giardia spp. sem IMS | *Giardia* spp. com IMS | *Cryptosporidium* spp. sem IMS | *Cryptosporidium* spp. com IMS

Figura 31 – Visualização, fluorescência, de (oo)cistos em amostra de lodo flotado (400x)

Tabela 27: Contagem dos (oo)cistos presentes na água clarificada e no lodo flotado, ensaio em triplicata da fase 1, utilizando FCCa com IMS

Protozoários	Amostra	Dissociações ácidas	(oo)cistos contados nas lâminas	Soma das lâminas	Média e desvio padrão	
					Com 2 dissociações ácidas	Com 3 dissociações ácidas
Amostra: Água Clarificada						
Giardia spp.	1	1ª	12	32	24 ± 3	38 ± 7
		2ª	11			
		3ª	9			
	2	1ª	12	46		
		2ª	15			
		3ª	19			
	3	1ª	9	37		
		2ª	13			
		3ª	15			
C. spp.	1	1ª	64	152	57 ± 27	88 ± 58
		2ª	18			
		3ª	70			
	2	1ª	48	73		
		2ª	13			
		3ª	12			
	3	1ª	12	40		
		2ª	16			
		3ª	12			
Amostra: Lodo Flotado						
Giardia spp.	1	1ª	82	467	271 ± 31	450 ± 32
		2ª	216			
		3ª	169			
	2	1ª	87	471		
		2ª	190			
		3ª	194			
	3	1ª	50	413		
		2ª	187			
		3ª	176			
C. spp.	1	1ª	495	977	1129 ± 270	1254 ± 269
		2ª	353			
		3ª	129			
	2	1ª	907	1271		
		2ª	245			
		3ª	119			
	3	1ª	1002	1514		
		2ª	384			
		3ª	128			

Para discutir os resultados da Fase 1, a Tabela 28 apresenta a distribuição dos protozoários segundo a metodologia adotada.

Tabela 28: Distribuição dos protozoários na Fase 1, em função do método adotado (com ou sem IMS)

Protozoários:	*Giardia* spp.			*Cryptosporidium* spp.		
Método utilizado	FCCa sem IMS	FCCa com IMS e 2 dissociações	FCCa com IMS e 3 dissociações	FCCa sem IMS	FCCa com IMS e 2 dissociações	FCCa com IMS e 3 dissociações
A	1055 ± 189	1465 ± 76	1465 ± 76	1076 ± 83	1370 ± 171	1370 ± 171
B	53 ± 18	24 ± 3	38 ± 7	91 ± 17	57 ± 27	88 ± 58
C	649 ± 171	271 ± 31	450 ± 32	962 ± 58	1129 ± 270	1254 ± 269
Perdas	353 ± 377	1170 ± 110	976 ± 115	22 ± 158	184 ± 468	27 ± 497
% B	5,1 ± 2,6	1,6 ± 0,3	2,6 ± 0,6	8,5 ± 2,2	4,2 ± 2,5	6,4 ± 5
%C	61,5 ± 27	18,5 ± 3,1	30,7 ± 3,8	89,5 ± 12,3	82,4 ± 30	91,6 ± 31,1
%Perdas	33,4 ± 42	79,9 ± 11,7	66,6 ± 11,3	2,1 ± 14,9	13,4 ± 35,8	2 ± 36,6
Eficiência (A-B)/A:	0,95± 0,37	0,98 ± 0,1	0,97 ± 0,11	0,92 ± 0,16	0,96 ± 0,26	0,94 ± 0,28
Remoção em Log_{10}	1,296	1,786	1,582	1,072	1,381	1,19

Notas: A = quantidade de (oo)cistos inoculados na água de estudo; B = quantidade de (oo)cistos na água clarificada; C = quantidade de (oo)cistos retidos no lodo flotado; A – B – C = Perdas de (oo)cistos inerentes ao protocolo testado (FCCa com ou sem IMS).

Ao analisar os dados, em relação à remoção de *Cryptosporidium spp*., é possível comprovar a separação dos organismos por flotação, visto que cerca de 90% dos oocistos inoculados foram retidos no lodo flotado, em ambos os ensaios (FCCa com e sem IMS). Também as perdas de organismos inerentes aos métodos de detecção foram em torno de 2%.

Em relação à remoção de *Giardia* spp. observa-se uma discrepância de resultados entre os métodos testados, possivelmente pelas perdas no ensaio de FCCa com IMS (em torno de 67% com 3 dissociações e 80% com duas dissociações) quando comparadas ao protocolo de FCCa sem IMS (33,4%). Mesmo assim, em ambos os testes (FCCa com ou sem IMS) é possível notar a eficiência do tratamento, pois houve maior proporção de cistos retidos no lodo flotado. Os resultados evidenciam o risco associado à inadequada disposição desses resíduos no ambiente.

Ao comparar os (oo)cistos detectados na água clarificada, nota-se menores valores de cistos do que oocistos. Dessa forma, considerando o desempenho do tratamento, os ensaios mostram que o processo de flotação por ar dissolvido (FAD) possui eficiência de remoção de *Giardia* spp. e de *Cryptosporidium* spp., sendo maior para o primeiro protozoário.

O método de FCCa com IMS e duas dissociações ácidas detectou a maior remoção (1,786 log para *Giardia* spp. e 1,381 log para *Cryptosporidium* spp.) e o método de FCCa sem IMS registrou a menor remoção (1,296 log para *Giardia* spp. e 1,072 log para *Cryptosporidium spp*.). Tal diferença de resultados entre os métodos pode ser explicada pelo maior número de perdas de organismos no método de FCCa com IMS e duas dissociações, visto que tais perdas acabam sendo contabilizadas como organismos removidos no cálculo da eficiência. Já o método de FCCa sem IMS, por ter melhor recuperação (como visto no item 5.4), detecta mais protozoários na água clarificada e, consequentemente, reduz a eficiência de remoção.

Na literatura, Plummer, Edzwald e Kelley (1995) obtiveram eficiência de 2 log na remoção de oocistos de *Cryptosporidium parvum*, em teste de coagulação, floculação e flotação em escala de bancada (floteste), utilizando cloreto férrico como coagulante, água de abastecimento como matriz, centrifugação e flutuação em sacarose como método de detecção e inoculação de 3 a 4.10^5oocistos.L^{-1}.

Em amostras de esgoto, Santos (2015) obteve remoção de 2,5 a 2,7 log de *Giardia* spp., em teste de coagulação, floculação e flotação em escala de bancada (flotateste), utilizando PAC como coagulante, filtração em membranas seguido de IMS como método de detecção e entrada com média de $1,64.10^3$cistos.L^{-1}

Os resultados obtidos e a comparação com a literatura mostram que a clarificação por flotação, primeira barreira de retenção no tratamento do ciclo completo, pode remover protozoários, mesmo em diferentes matrizes e protocolos utilizados.

5.5.2- Fase 2 – Eficiência da filtração

Um primeiro ensaio foi realizado na Fase 2 utilizando o método de FCCa sem IMS. A Tabela 29 apresenta a contagem das suspensões e a Tabela 30 mostra a contagem dos organismos detectados na água filtrada e na água de lavagem dos filtros.

Os resultados mostraram a maior proporção de organismos na água de lavagem dos filtros do que na água filtrada, indicando a eficiência da filtração e, evidentemente, risco microbiológico no resíduo gerado.

Tabela 29: Contagem das suspensões para o ensaio inicial da Fase 2

Suspensões	Poço da lâmina	Alíquota (µL)	Contagem de (oo)cistos em cada lâmina	Média e desvio padrão
Giardia spp.	1	5	818	796 ± 31,1
	2		774	
Cryptosporidium spp.	1	10	240	221 ± 26,9
	2		202	

Tabela 30: Contagem dos (oo)cistos presentes na água filtrada e na água de lavagem dos filtros, ensaio inicial da Fase 2, utilizando o método de FCCa sem IMS

Matriz	Água filtrada[1]				Água de lavagem do filtro[2]			
Protozoários	Poços	(oo)cistos em cada poço	Soma dos 3 poços	Total de (oo)cistos (Equação 2)	Poços	(oo)cistos em cada poço	Soma dos 3 poços	Total de (oo)cistos (Equação 2)
Giardia spp.	1	2	8	80	1	10	18	360
	2	6			2	8		
C. spp.	1	3	5	50	1	3	8	160
	2	2			2	5		

Notas: 1-volume final da amostra: 1,0mL; volume total de alíquotas dos poços: 100µL; (FM) = 10
2- volume final da amostra: 2,0mL; volume total de alíquotas dos poços: 100µL; FM = 20

Assim como realizado no primeiro ensaio da Fase 1, o volume final concentrado do resíduo foi de 2mL. Após verificar que o *pellet* era menor que 0,5mL, foi decidido reduzir para 1mL o volume concentrado da amostra de água de lavagem a partir dos próximos ensaios da Fase 2.

Também foi possível observar as diferenças entre as matrizes utilizadas, como se nota através da cor das alíquotas na lâmina de microscopia (Figura 32).

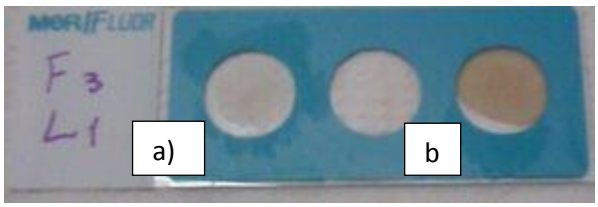


Figura 32 – Lâmina com alíquotas de água filtrada (a) e água de lavagem dos filtros (b)

O ensaio foi repetido, em triplicada, com uma nova contagem das suspensões (Tabela 31) e os resultados estão na Tabela 32.

Tabela 31: Contagem das suspensões, ensaio em triplicata da Fase 2, utilizando o método de FCCa sem IMS

Suspensões	Poço da lâmina	Alíquota (µL)	Contagem de (oo)cistos na lâmina	Média e desvio padrão
Giardia spp.	1	5	889	869 ± 133
	2		727	
	3		991	
Cryptosporidium spp.	1	20	430	547 ± 122
	2		674	
	3		537	

Tabela 32: Contagem dos (oo)cistos presentes na água filtrada e na água de lavagem dos filtros, ensaio em triplicata da Fase 2, utilizando o método de FCCa sem IMS (continua)

Protozoários	Amostra	Poços da lâmina	(oo)cistos contados na lâmina	Soma das lâminas	Média e desvio padrão
Matriz: Água filtrada					
Giardia spp.	1	1	1	10	76 ± 15
		2	4		
		3	5		
	2	1	2	14	
		2	6		
		3	6		
	3	1	3	10	
		2	2		
		3	5		
Cryptosporidium spp.	1	1	1	11	84 ± 14
		2	4		
		3	6		
	2	1	1	12	
		2	6		
		3	5		
	3	1	7	15	
		2	5		
		3	3		

Tabela 32: Contagem dos (oo)cistos presentes na água filtrada e na água de lavagem dos filtros, ensaio em triplicata da Fase 2, utilizando o método de FCCa sem IMS (Continuação):

Protozoários	Amostra	Poços da lâmina	(oo)cistos contados na lâmina	Soma das lâminas	Média e desvio padrão
Matriz: Água de lavagem dos filtros					
Giardia spp.	1	1	29	76	553 ± 42
		2	22		
		3	25		
	2	1	28	88	
		2	21		
		3	39		
	3	1	21	85	
		2	21		
		3	43		
Cryptosporidium spp.	1	1	30	82	456 ± 84
		2	24		
		3	28		
	2	1	22	66	
		2	19		
		3	25		
	3	1	15	57	
		2	20		
		3	22		
Notas: volume final de cada amostra: 1,0 mL; volume total de alíquotas dos poços: 150µL; FM = 6,7					

O ensaio da Fase 2 foi realizado novamente em triplicata utilizando, desta vez, a purificação das amostras com IMS. A contagem das suspensões está na Tabela 33 e os resultados na Tabela 34.

Tabela 33: Contagem das suspensões, ensaio em triplicata da Fase 2, FCCa com IMS

Suspensão	Poço da lâmina	Alíquota (µL)	Contagem de (oo)cistos na lâmina	Média e desvio padrão
Giardia spp.	1	5	480	452 ± 44
	2		474	
	3		401	
Cryptosporidium spp.	1	50	512	646 ± 117
	2		696	
	3		730	

Tabela 34 Contagem dos (oo)cistos presentes na água filtrada e na água de lavagem dos filtros, ensaio em triplicata da Fase 2, utilizando o método de FCCa com IMS

Protozoários	Amostra	Dissociações ácidas	(oo)cistos contados nas lâminas	Soma das lâminas	Média e desvio padrão	
					Com 2 dissociações ácidas	Com 3 dissociações ácidas
Matriz: Água filtrada						
Giardia spp.	1	1ª	2	49	17 ± 7	33 ± 16
		2ª	23			
		3ª	24			
	2	1ª	4	34		
		2ª	12			
		3ª	18			
	3	1ª	2	17		
		2ª	9			
		3ª	6			
C. spp.	1	1ª	37	58	75 ± 43	79 ± 47
		2ª	17			
		3ª	4			
	2	1ª	29	47		
		2ª	17			
		3ª	1			
	3	1ª	114	133		
		2ª	11			
		3ª	8			
Matriz: Água de lavagem dos filtros						
Giardia spp.	1	1ª	27	141	59 ± 13	133 ± 13
		2ª	45			
		3ª	69			
	2	1ª	22	140		
		2ª	37			
		3ª	81			
	3	1ª	19	118		
		2ª	27			
		3ª	72			
C. spp.	1	1ª	193	431	378 ± 44	476 ± 42
		2ª	141			
		3ª	97			
	2	1ª	183	483		
		2ª	195			
		3ª	105			
	3	1ª	247	515		
		2ª	175			
		3ª	93			

Para discutir os resultados, a Tabela 35 apresenta a distribuição dos protozoários segundo a metodologia adotada.

Tabela 35: Distribuição dos protozoários, no tratamento, na Fase 2

Protozoários:	*Giardia* spp.			*Cryptosporidium* spp.		
Método utilizado	FCCa sem IMS	FCCa com IMS e 2 dissociações	FCCa com IMS e 3 dissociações	FCCa sem IMS	FCCa com IMS e 2 dissociações	FCCa com IMS e 3 dissociações
D	869 ± 133	452 ± 44	452 ± 44	547 ± 122	646 ± 117	646 ± 117
E	76 ± 15	17 ± 7	33 ± 16	84 ± 14	75 ± 43	79 ± 47
F	553 ± 42	59 ± 13	133 ± 13	456 ± 84	378 ± 44	476 ± 42
Perdas	240 ± 190	375 ± 64	285 ± 73	7 ± 221	193 ± 205	90 ± 206
%E	8,7 ± 3,1	3,8 ± 1,9	7,4 ± 4,3	15,4 ± 6	11,6 ± 8,8	12,3 ± 9,5
%F	63,7 ± 15	13,1 ± 4,2	29,4 ± 5,7	83 ± 34,1	29,4 ± 5,7	73,7 ± 19,9
%Perdas	27,6 ± 26	83,1 ± 22,3	63,2 ± 22	1 ± 40,6	63,2 ± 22,3	14 ± 34,5
Eficiência (D-E)/D:	0,91 ± 0,31	0,96 ± 0,21	0,93 ± 0,22	0,85 ± 0,44	0,88 ± 0,41	0,88 ± 0,41
Remoção em Log_{10}	1,061	1,416	1,132	0,811	0,935	0,911

Notas: D = quantidade de (oo)cistos inoculados na água clarificada; E = quantidade de (oo)cistos na água filtrada; F = quantidade de (oo)cistos retidos na filtração (presentes na água de lavagem); D – E – F = Perdas de (oo)cistos inerentes ao protocolo testado (FCCa com ou sem IMS).

Ao analisar os dados, observa-se que foram registrados maiores proporções de *Cryptosporidium* spp. (11,6 a 15,4%) do que *Giardia* spp. (3,8 a 8,7%) na água filtrada, em ambos os métodos de detecção utilizados.

Em relação aos (oo)cistos retidos na água de lavagem, percebe-se uma grande variação de resultados entre os métodos utilizados, sendo menores as proporções registradas no método de FCCa com IMS e duas dissociações para ambos os protozoários. Mesmo assim, em relação à retenção de oocistos, há uma proximidade entre os registros dos métodos de FCCa sem IMS e com IMS e três dissociações, indicando que mais de 70% de *Cryptosporidium* spp. inoculados foram retidos na filtração.

Sobre as perdas de organismos, a quantificação com o método de FCCa com IMS e duas dissociações registrou perdas de mais de 60%, para ambos os protozoários. Já o método sem IMS registrou menores perdas, chegando a 1% para *Cryptosporidium* spp. Entre os protozoários testados, ambos os métodos demonstraram maiores perdas de *Giardia* spp.

O cálculo da eficiência de remoção do sistema mostrou maiores valores para *Giardia* spp., com log de 1,061 a 1,416. A remoção de *Cryptosporidium* spp.foi de 0,811 a 0,935 log.

Na literatura, Marques (2006) realizou experimento piloto de filtração direta descendente para água de abastecimento, utilizando filtro de areia, sulfato de alumínio como coagulante e FCCa como método de detecção. Na água de lavagem foram detectados 42% dos organismos inoculados e a eficiência de remoção foi de 2,52 log para *Giardia* spp. e 2,3log para *Cryptosporidium* spp.

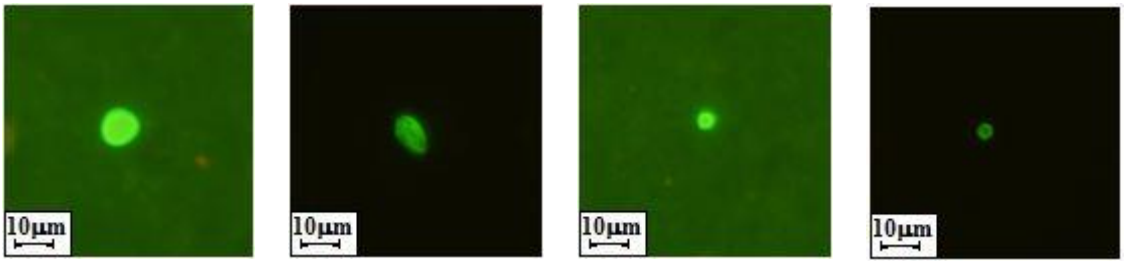
Swertfeger et al. (1999), em experimento com filtração direta em escala piloto, em Cincinnati, nos Estados Unidos, utilizando sulfato férrico como coagulante, filtros de areia e antracito e métodos de filtração em membranas e citometria de fluxo para detecção de organismos, obteve remoções de 2,7 a 4,7 log de *Giardia muris* e de 2,7 a 3,9 log de *Cryptosporidium parvum*.

Ladeia, Heller e Vieira (2005) realizaram ensaios em instalação piloto com filtração rápida, utilizando a FCCa para detecção. Oocistos de *Cryptosporidium parvum* foram inoculados à água de estudo na concentração de 1 oocisto.L^{-1}. Tal pesquisa não detectou a presença de oocistos na água filtrada, indicando que talvez houve remoção completa do parasito ou que quiçá o método de detecção não possuía sensibilidade suficiente para uma concentração tão baixa de oocistos.

A alta quantidade de protozoários inoculados na água clarificada (de 452 a 869 cistos.L^{-1} e de 547 a 646 oocistos.L^{-1}) pode ter influenciado no maior número de protozoários na água filtrada e, consequentemente, baixa remoção. Portanto, é possível afirmar que, na filtração, a concentração de organismos no afluente influencia diretamente a eficiência de remoção dos (oo)cistos.

Ao comparar os resultados da Fase 2 com a literatura, observa-se que, apesar das diferentes condições analisadas entre os trabalhos, há maiores remoções de cistos do que oocistos na filtração. Essa menor remoção de *Cryptosporidium* spp. pode estar relacionada com a capacidade dos oocistos de se comprimirem e, consequentemente, atravessarem os poros filtrantes, como foi observado por Li, Goodrich e Owens (1995).

Sobre a visualização dos (oo)cistos no resíduo, assim como na Fase 1, a utilização da separação imunomagnética reduz as sujidades da amostra e permite facilitar a identificação dos organismos, como é possível observar nas amostras de água de lavagem da Figura 33.



Giardia spp. sem IMS | *Giardia* spp. com IMS | *Cryptosporidium* spp. sem IMS | *Cryptosporidium* spp. com IMS

Figura 33 – Visualização, fluorescência, de (oo)cistos em amostra de água de lavagem (400x)

A Fase 2 mostrou que, apenas o desempenho da filtração, não foi capaz de remover todos os organismos presentes no afluente, quando os (oo)cistos estão em altas concentrações. Tal fato indica a necessidade dos processos e operações de tratamento anteriores à filtração aliados à desinfecção posterior, a fim de gerar água potável.

5.5.3- Fase 3 – União das fases 1 e 2 representando o tratamento por ciclo completo

A Fase 3 foi primeiramente realizada em triplicada, utilizando o método de FCCa sem IMS, a contagem das suspensões está na Tabela 36 e os resultados na Tabela 37.

Tabela 36: Contagem das suspensões, ensaio em triplicata da Fase 3, utilizando FCCa sem IMS

Suspensões	Poço da lâmina	Alíquota (µL)	Contagem de (oo)cistos na lâmina	Média e desvio padrão
Giardia spp.	1	10	1719	1621 ± 102
	2		1630	
	3		1515	
Cryptosporidium spp.	1	50	1405	1578 ± 209
	2		1810	
	3		1518	

Tabela 37: Contagem dos (oo)cistos presentes na água filtrada, na água de lavagem dos filtros e no lodo flotado, ensaio em triplicata da Fase 3, utilizando FCCa sem IMS (continua)

Protozoários	Amostra	Poços da lâmina	(oo)cistos contados na lâmina	Soma das lâminas	Média e desvio padrão
Matriz: água filtrada					
Giardia spp.	1	1	0	0	7 ± 7
		2	0		
		3	0		
	2	1	1	2	
		2	1		
		3	0		
	3	1	0	1	
		2	1		
		3	0		
Cryptosporidium spp.	1	1	1	1	11 ± 8
		2	0		
		3	0		
	2	1	0	3	
		2	1		
		3	2		
	3	1	0	0	
		2	1		
		3	0		
Matriz: água de lavagem dos filtros					
Giardia spp.	1	1	6	10	64 ± 17
		2	1		
		3	3		
	2	1	2	12	
		2	6		
		3	4		
	3	1	3	7	
		2	3		
		3	1		
Cryptosporidium spp.	1	1	7	16	104 ± 30
		2	5		
		3	4		
	2	1	5	20	
		2	10		
		3	5		
	3	1	5	11	
		2	4		
		3	2		

Tabela 37 Contagem dos (oo)cistos presentes na água filtrada, na água de lavagem dos filtros e no lodo flotado, ensaio em triplicata da Fase 3, utilizando FCCa sem IMS(Continuação)

Protozoários	Amostra	Poços da lâmina	(oo)cistos contados na lâmina	Soma das lâminas	Média e desvio padrão
Matriz: lodo flotado					
Giardia spp.	1	1	42	119	811 ± 37
		2	38		
		3	39		
	2	1	47	118	
		2	40		
		3	31		
	3	1	40	128	
		2	51		
		3	37		
Cryptosporidium spp.	1	1	93	260	1311 ± 411
		2	80		
		3	87		
	2	1	60	137	
		2	42		
		3	35		
	3	1	61	193	
		2	72		
		3	60		

Notas: volume final de cada amostra: 1,0mL; volume total de alíquotas dos poços: 150µL; fator de multiplicação (FM) = 6,7

O ultimo ensaio em triplicata da Fase 3 foi realizado utilizando o protocolo de FCCa com IMS. A contagem das suspensões está na Tabela 38 e os resultados na Tabela 39.

Tabela 38: Contagem das suspensões, ensaio em triplicata da Fase 3, utilizando o protocolo de FCCa com IMS

Suspensões	Poço da lâmina	Alíquota (µL)	Contagem de (oo)cistos na lâmina	Média e desvio padrão
Giardia spp.	1	5	434	476 ± 39
	2		510	
	3		483	
Cryptosporidium spp.	1	30	1750	1743 ± 58
	2		1682	
	3		1797	

Tabela 39 Contagem dos (oo)cistos presentes na água filtrada, na água de lavagem dos filtros e no lodo flotado, ensaio em triplicata da Fase 3, utilizando FCCa com IMS (continua)

Protozoários	Amostra	Dissociações ácidas	(oo)cistos contados	Soma	Média e desvio padrão	
					Com 2 dissociações	Com 3 dissociações
Matriz: água filtrada						
Giardia spp.	1	1ª	0	0	1 ± 1	1 ± 1
		2ª	0			
		3ª	0			
	2	1ª	0	1		
		2ª	0			
		3ª	1			
	3	1ª	1	2		
		2ª	1			
		3ª	0			
Cryptosporidium spp.	1	1ª	0	8	2 ± 2	6 ± 2
		2ª	2			
		3ª	6			
	2	1ª	0	6		
		2ª	1			
		3ª	5			
	3	1ª	3	4		
		2ª	1			
		3ª	0			
Matriz: água de lavagem dos filtros						
Giardia spp.	1	1ª	1	5	6 ± 4	9 ± 4
		2ª	2			
		3ª	2			
	2	1ª	0	9		
		2ª	4			
		3ª	5			
	3	1ª	1	2		
		2ª	1			
		3ª	0			
Cryptosporidium spp.	1	1ª	55	101	86 ± 14	98 ± 9
		2ª	28			
		3ª	18			
	2	1ª	82	104		
		2ª	20			
		3ª	2			
	3	1ª	42	88		
		2ª	32			
		3ª	14			

Tabela 39 Contagem dos (oo)cistos presentes na água filtrada, na água de lavagem dos filtros e no lodo flotado, ensaio em triplicata da Fase 3, utilizando FCCa com IMS (Continuação)

Protozoários	Amostra	Dissociações ácidas	(oo)cistos contados	Soma	Média e desvio padrão	
					Com 2 dissociações	Com 3 dissociações
Matriz: lodo flotado						
Giardia spp.	1	1ª	4	166	44 ± 17	149 ± 33
		2ª	48			
		3ª	114			
	2	1ª	16	170		
		2ª	40			
		3ª	114			
	3	1ª	8	111		
		2ª	16			
		3ª	87			
Cryptosporidium spp.	1	1ª	1170	1689	1340 ± 457	1422 ± 486
		2ª	360			
		3ª	159			
	2	1ª	1529	1715		
		2ª	142			
		3ª	44			
	3	1ª	719	861		
		2ª	100			
		3ª	42			

Para a discussão dos resultados, a Tabela 40 compara os resultados dos ensaios da Fase 3. Nota-se que a distribuição de *Cryptosporidium* spp. nos resíduos, em ambos os métodos de detecção, foi de cerca de 80% no lodo flotado e 5% na água de lavagem.

Em relação à distribuição de *Giardia* spp., observa-se divergência de proporções entre os métodos e grande porcentagem de perdas de organismos, principalmente no método de FCCa com IMS e duas dissociações que obteve perdas de cerca de 90% de cistos. Mesmo assim, ambos os métodos registraram maiores deposições de cistos no lodo flotado do que na água de lavagem. Indicando, assim, que a maioria dos organismos foi removida pela flotação.

Tabela 40: Distribuição dos protozoários ao longo do tratamento na Fase 3

Protozoários	*Giardia spp.*			*Cryptosporidium* spp.		
Método utilizado:	FCCa sem IMS	FCCa com IMS e 2 dissociações	FCCa com IMS e 3 dissociações	FCCa sem IMS	FCCa com IMS e 2 dissociações	FCCa com IMS e 3 dissociações
A	1621 ± 102	476 ± 39	476 ± 39	1578 ± 209	1743 ± 58	1743 ± 58
C	811 ± 37	44 ± 17	149 ± 33	1311 ± 411	1340 ± 457	1422 ± 486
E	7 ± 7	1 ± 1	1 ± 1	11 ± 8	2 ± 2	6 ± 2
F	64 ± 17	6 ± 4	9 ± 4	104 ± 30	86 ± 14	98 ± 9
Perdas	739 ± 162	425 ± 61	317 ± 76	151 ± 657	314 ± 530	218 ± 554
% C	50 ± 5,4	9,3 ± 4,4	31,3 ± 9,5	83,1 ± 37	76,9 ± 28,8	81,6 ± 30,6
%E	0,4 ± 0,4	0,1 ± 0,3	0,2 ± 0,2	0,7 ± 0,6	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1
%F	4 ± 1,3	1,2 ± 0,9	1,9 ± 1	6,6 ± 2,8	5 ± 1	5,6 ± 0,7
%Perdas	45,6 ± 12,9	89,4 ± 20	66,6 ± 21,5	9,6 ± 42,9	18 ± 31	12,5 ± 32,2
Eficiência (A – E)/A	0,996 ± 0,13	0,999 ± 0,16	0,998 ± 0,16	0,99 ± 0,27	0,999 ± 0,07	0,997 ± 0,07
Remoção em Log_{10}	2,386	2,853	2,677	2,152	2,873	2,463

Notas: A = quantidade de (oo)cistos inoculados na água de estudo; C = quantidade de (oo)cistos retidos no lodo flotado; E = quantidade de (oo)cistos na água filtrada;
F = quantidade de (oo)cistos retidos na filtração (presentes na água de lavagem);
A - C - E - F = Perdas de (oo)cistos inerentes ao protocolos testado (FCCa com e sem IMS)

Sobre os métodos de detecção, é possível observar certa semelhança entre as distribuições de organismos entre o método de FCCa sem IMS e o de FCCa com IMS e três dissociações nas proporções de *Cryptosporidium* spp. nos resíduos. O mesmo não aconteceu para as distribuições de *Giardia* spp., tal fato pode estar ligado com o grande número de perdas de cistos e também pela diferença na quantidade de organismos inoculados entre os ensaios.

A existência de (oo)cistos na água de lavagem dos filtros reforça a importância dos estudos sobre a recirculação desse resíduo no sistema de tratamento, tendo em vista o risco de acumulação de organismos, como foi explicado no item 3.5.

Os ensaios de tratabilidade da Fase 3 obtiveram eficiências de remoção de 2,4 a 2,85 log de *Giardia* spp. e de 2,15 a 2,87 log de *Cryptosporidium* spp.

Na literatura, Edzwald et al (2000), em experimento de flotação seguido de filtração, em escala piloto, avaliando água de reservatório com baixa turbidez, sulfato de alumínio e polímero catiônico como coagulantes e o método ICR (*Information Collection Rule*) para

detecção de organismos, obtiveram remoções em torno de 2,8 log para *Giardia* spp. e 2,5 log para *Cryptosporidium* spp. Tais resultados, juntamente com os dados desta pesquisa, comprovam a eficiência de remoção de protozoários utilizando o tratamento de ciclo completo com flotação.

Apesar da eficiência citada, ainda foram detectados (oo)cistos na água filtrada. A Portaria nº 2914 (BRASIL, 2011) estabelece, quando detectados mais de 3 oocistos.L^{-1} nos pontos de captação de água de abastecimento, a eficiência no tratamento com turbidez final de no mínimo 0,3uT, a fim de assegurar a remoção de protozoários. A pesquisa mostrou que mesmo atendendo a esse critério, com a eficiência no tratamento de turbidez (Tabela 9), não houve garantia de remoção completa dos patógenos. Tal fato indica a necessidade da correta desinfecção e, também, a conservação dos mananciais visando reduzir o possível risco microbiológico presente na água de consumo.

5.5.4 - Comparação entre as Fases 1, 2 e 3

Para comparar os resultados das Fases 1,2 e 3, a Tabela 41 reuni as eficiências de remoção de (oo)cistos calculadas, em log_{10}. Considerando como entradas as médias das quantidades de organismos inoculados nos ensaios e como saídas as médias detectadas de (oo)cistos da água clarificada (Fase 1) e na água filtrada (Fases 2 e 3).

Tabela 41: Eficiências dos ensaios de tratabilidade para remoção de (oo)cistos em Log_{10}

Protozoário	Protocolo testado	Eficiência de remoção em Log_{10}		
		Fase 1	Fase 2	Fase 3
Giardia spp.	FCCa sem IMS	1,296	1,061	2,386
	FCCa com IMS e 2 dissociações	1,786	1,416	2,853
	FCCa com IMS e 3 dissociações	1,582	1,132	2,677
Cryptosporidium spp.	FCCa sem IMS	1,072	0,811	2,152
	FCCa com IMS e 2 dissociações	1,381	0,935	2,873
	FCCa com IMS e 3 dissociações	1,19	0,911	2,463

Ao comparar as Fases 1 e 2, observa-se que houve maior remoção de (oo)cistos na Fase 1 em todos os ensaios. Dessa forma, supõe-se que a separação por flotação (Fase 1) pode remover ligeiramente mais protozoários do que a separação por filtração (Fase 2).

A Fase 3 apresentou melhores eficiências de remoção, como era de se esperar. Tendo em vista que tais ensaios continham flotação e filtração.

De acordo com as eficiências calculadas houve maior remoção de cistos de *Giardia spp*. do que oocistos de *Cryptosporidium* spp. em quase todas as fases dentro de cada método de detecção (FCCa com ou sem IMS). Uma possível explicação para isso pode ser a hidrofobicidade dos organismos: Dai et al. (2004) investigaram a hidrofobicidade e as cargas superficiais na adesão de (oo)cistos em superfícies sólidas e demonstraram que *Giardia lamblia* é mais hidrofóbica do que *Cryptosporidium parvum*. Partículas hidrofóbicas possuem maior afinidade com a flotação e a filtração do que as partículas hidrofílicas, conforme descrito nos itens 3.2 e 3.3.

Para comparar e presença de protozoários nos resíduos totais gerados (lodo flotado mais a água de lavagem), foram calculadas as proporções da média de (oo)cistos detectados nos resíduos em relação à média de organismos inoculados em cada ensaio. Os resultados estão na Tabela 42.

Tabela 42: (oo)cistos retidos nos resíduos dos ensaios de tratabilidade, em log_{10}

Protozoário	Método de detecção	(oo)cistos retidos nos resíduos em Log $_{10}$.		
		Fase 1[1]	Fase 2[2]	Fase 3[3]
Giardia spp.	FCCa sem IMS	0,415	0,439	0,337
	FCCa com IMS e 2 dissociações	0,089	0,061	0,048
	FCCa com IMS e 3 dissociações	0,159	0,151	0,175
Cryptosporidium spp.	FCCa sem IMS	0,975	0,779	0,986
	FCCa com IMS e 2 dissociações	0,755	0,382	0,74
	FCCa com IMS e 3 dissociações	1,072	0,58	0,893

Notas: 1- (oo)cistos detectados no lodo flotado; 2- (oo)cistos detectados na água de lavagem; 3 - soma dos (oo)cistos detectados no lodo flotado e na água de lavagem

Para *Giardia* spp., a Fase 2 utilizando FCCa sem IMS obteve maior retenção de cistos nos resíduos (0,439 log) comparando às demais retenções. Da mesma forma, a Fase 3 utilizando FCCa com IMS e duas dissociações obteve o menor valor de retenção (0,048 log). Em relação ao *Cryptosporidium* spp., a Fase 1 utilizando FCCa com IMS e 3 dissociações ácidas obteve a maior retenção (1,072 log) e a menor foi na Fase 2 utilizando FCCa com IMS e duas dissociações (0,382 log).

Keegan et al. (2008) mediram a deposição de oocistos de *Cryptostoridium* spp. no resíduo em ensaios de tratabilidade em escala de bancada utilizando como matriz de água de abastecimento, sulfato de alumínio como coagulante, clarificação por FAD e concentração dos organismos envolvendo acidificação, centrifugação e ajuste do pH e IMS. Tal pesquisa resultou na retenção de mais de 1,3 log de oocistos.

Ao observar os dados é possível perceber que houve maior proporção de oocistos nos resíduos do que de cistos em todos os ensaios. Tal resultado contrasta com os valores da Tabela 41 visto que, os organismos com maiores eficiências de remoção, teoricamente, deveriam também ter as maiores retenções nos resíduos. A Tabela 42 mostra que essa afirmação nem sempre é verdadeira.

Algumas possíveis explicações para isso são: I- o fato das recuperações de detecção de *Cryptosporidium* spp. serem maiores que as de *Giardia* spp., conforme demonstrado no item 5.4.3; II- as diferenças na quantidades de (oo)cistos inoculados em cada ensaio e III- as perdas de organismos inerentes aos métodos de detecção.

A proporção de (oo)cistos nos resíduos detectados pelo método de FCCa sem IMS foi maior do que a com IMS, em quase todas as fases. Para confirmar se essas diferenças são estatisticamente significativas, testes de hipóteses (t) foram feitos comparando as proporções, adotando as considerações da Tabela 3.

A Tabela 43 apresenta os resultados das aplicações dos testes de hipóteses, comparando o método de FCCa sem IMS com o método de FCCa com IMS com 2 e 3 dissociações ácidas.

Ao considerar nível de confiança (α) de 95%, a tabela *t-student* para proporções fornece o valor de I = 1,96. Assim, a região crítica é de -1,96 a 1,96.

Tabela 43: Resultados dos cálculos para os testes de hipóteses segundo as considerações da Tabela 3

Protozoários	Ensaios	P2	Comparando com 2 dissociações		Comparando com 3 dissociações	
			P1	Z	P1	Z
Giardia spp.	Fase 1	0,62 ± 0,27	0,18 ± 0,03	-23,8 ± 4,1	0,31 ± 0,04	-16 ± 8,6
	Fase 2	0,64 ± 0,15	0,13 ± 0,04	-22,2 ± -2,2	0,29 ± 0,06	-12,7 ± 3,3
	Fase 3	0,54 ± 0,07	0,11 ± 0,05	-23,2 ± -4,0	0,33 ± 0,10	-8,4 ± 4,3
Cryptosporidium spp.	Fase 1	0,89 ± 0,12	0,82 ± 0,30	-5 ± 25,8	0,92 ± 0,31	1,8 ± 38,2
	Fase 2	0,83 ± 0,34	0,59 ± 0,17	-9,9 ± 12,1	0,74 ± 0,20	-4,1 ± 18,9
	Fase 3	0,9 ± 0,40	0,82 ± 0,30	-6,5 ± 48,1	0,87 ± 0,31	-2,2 ± 60,2

Na comparação entre os métodos de FCCa sem IMS e com IMS e 3 dissociações ácidas, observa-se que apenas o valor de Z da Fase 1 para oocistos pertence à região crítica. Porém, ao considerar o desvio padrão de Z, nota-se que também pertencem à região crítica os valores calculados para os demais testes para *Cryptosporidium* spp. Assim, assume-se a hipótese 1, eu seja, os métodos não são significativamente diferentes para a detecção de oocistos nos resíduos.

Analogamente, comparando os métodos de FCCa sem IMS e com IMS e duas dissociações, considerando o desvio padrão de Z, observa-se que todos os testes para oocistos pertencem à região crítica. Assumindo-se também a hipótese 1.

Em relação às comparações com *Giardia* spp., todos os testes de hipóteses, comparando com duas e com 3 dissociações, obtiveram valores de Z distantes da região crítica, mesmo considerando o desvio padrão. Assim, assume-se a hipótese 2, ou seja, o método de FCCa sem IMS é significativamente diferente do método de FCCa com IMS, na avaliação de cistos nos resíduos.

Essa diferença significativa entre os métodos pode ser justificada pelo grande número de perdas de cistos de *Giardia spp*. no método com IMS, em torno de 60% nas três fases estudadas, conforme discutido anteriormente.

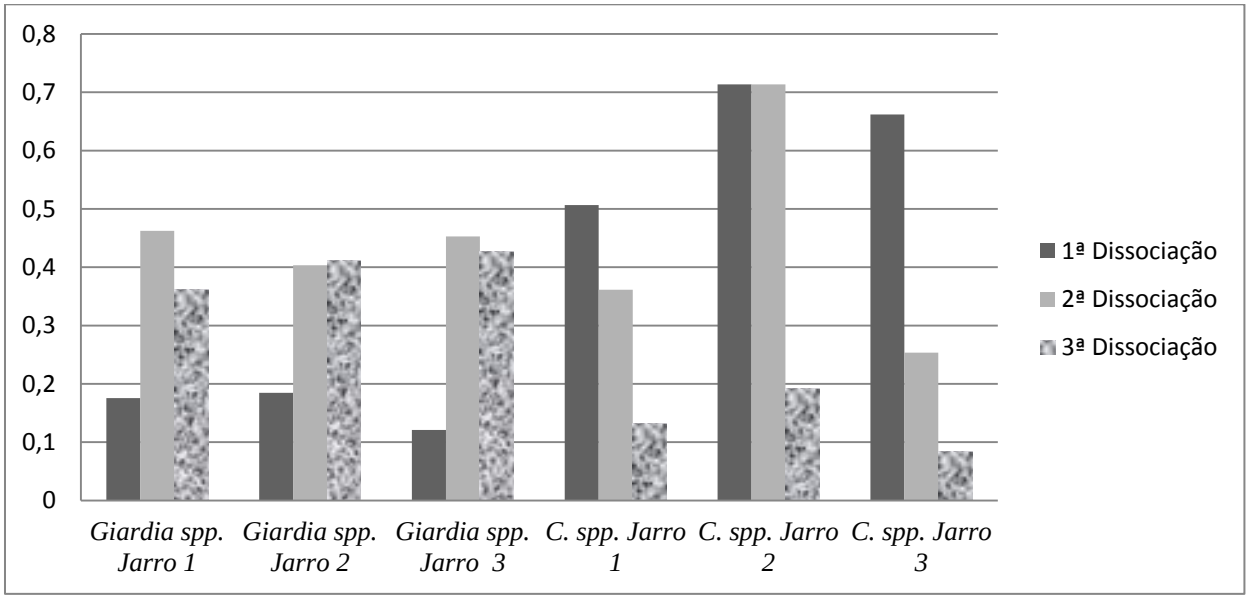
Os testes de hipóteses realizados permitiram constatar que o tratamento de ciclo completo com flotação é capaz de reter 82% ou 0,745 log dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. em seus resíduos. Em relação à retenção de cistos de *Giardia spp*., o tratamento retém 31% ou 0,161 log (se considerar os ensaios de FCCa com IMS) ou cerca de 60% ou 0,398 log (se considerar os ensaios de FCCa sem IMS).

5.6 - Influência da terceira dissociação ácida nos ensaios com IMS

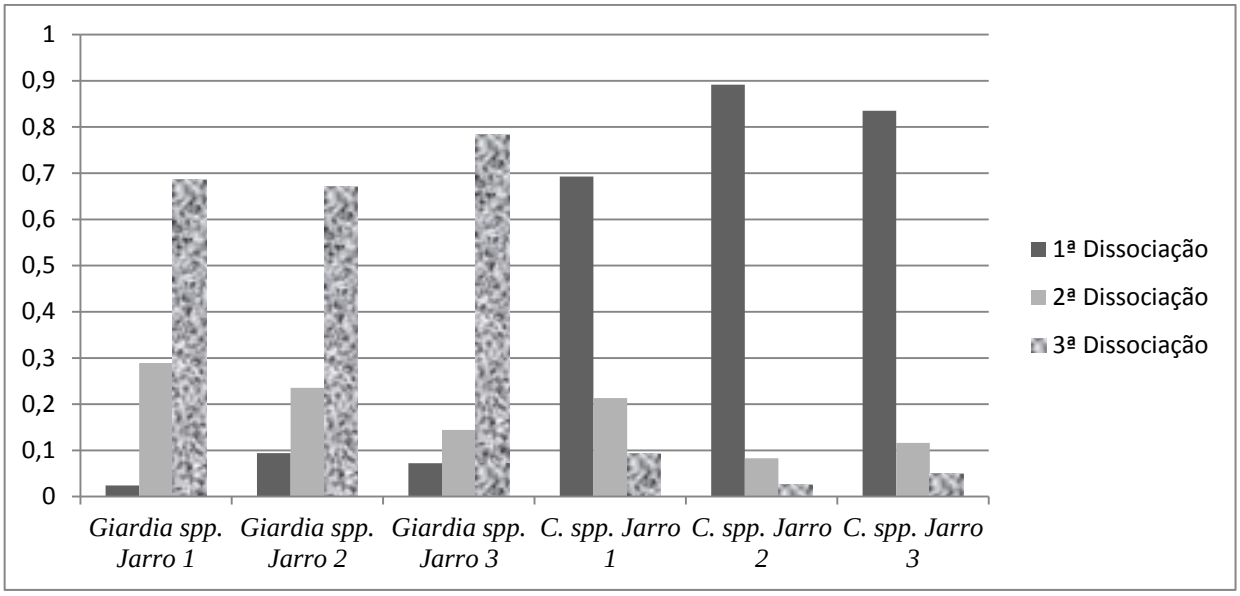
Giglio (2015), em sua pesquisa com métodos de detecção de (oo)cistos em resíduos de tratamento de água, recomenda avaliar o desempenho da inclusão da terceira dissociação ácida no protocolo testado. Assim, a influência dessa dissociação foi avaliada e será discutida a seguir.

Primeiramente foi verificada a porcentagem de recuperação dos (oo)cistos nas dissociações ácidas, isto considerando o número de (oo)cistos visualizados em cada dissociação (parcial) dividido pela soma dos organismos visualizados nas três dissociações (total) realizadas para cada amostra. A contribuição de cada dissociação foi calculada em todas as Fases testadas que utilizaram o protocolo de FCCa com IMS. As Figuras 34 a 36 apresentam os resultados obtidos.

No lodo flotado, a Figura 34 indica que a terceira dissociação contribuiu com cerca de 40% na recuperação de cistos no lodo da Fase 1 e com cerca de 70% na Fase 3. Em relação a oocistos, o incremento dessa dissociação pouco contribuiu, tendo maior porcentagem a primeira dissociação.

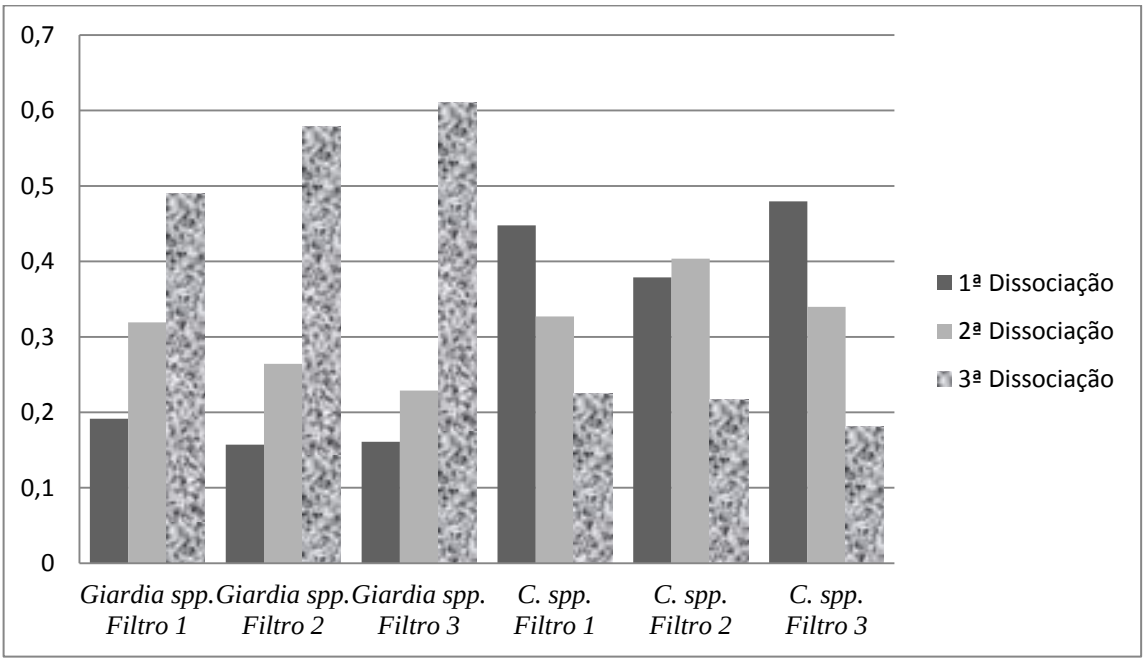


a) Porcentagem de recuperação de cada dissociação (parcial) em relação ao total obtido nas três dissociações (matriz: lodo flotado da Fase 1)

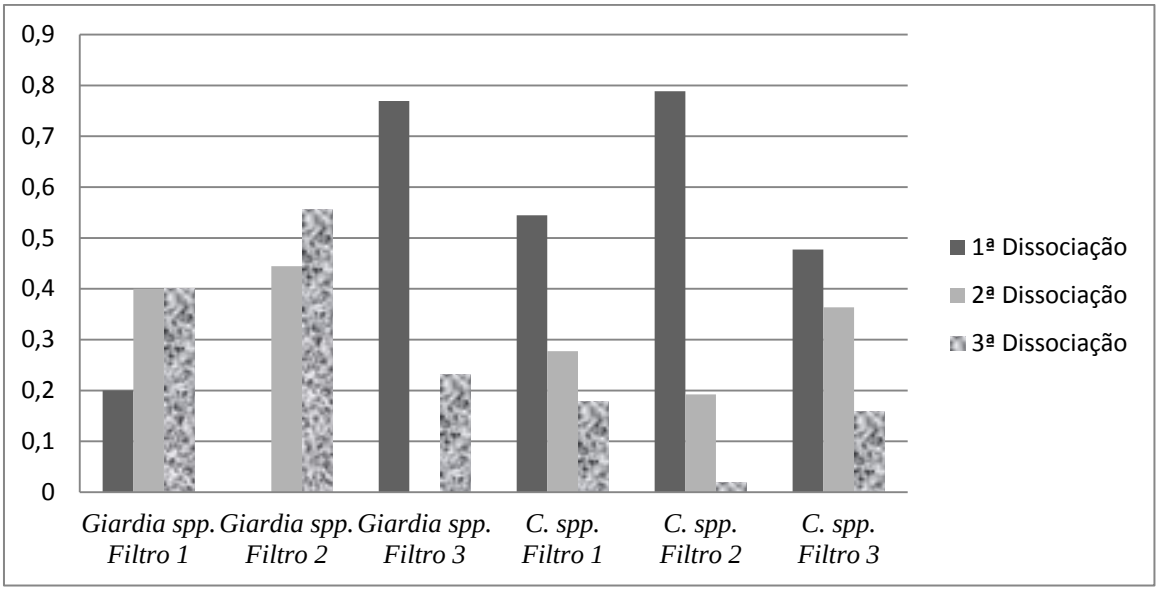


b) Porcentagem de recuperação de cada dissociação (parcial) em relação ao total obtido nas três dissociações (matriz: lodo flotado da Fase 3)

Figura 34 – Influência do número de dissociações ácidas na recuperação dos (oo)cistos no lodo flotado



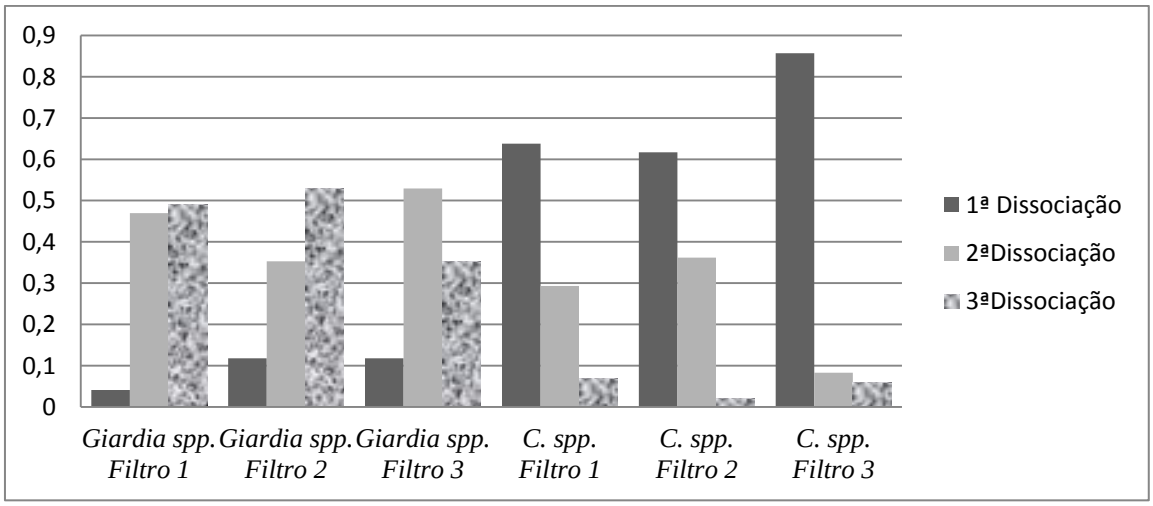
a) Porcentagem de recuperação de cada dissociação (parcial) em relação ao total obtido nas três dissociações (matriz: água de lavagem dos filtros da Fase 2)



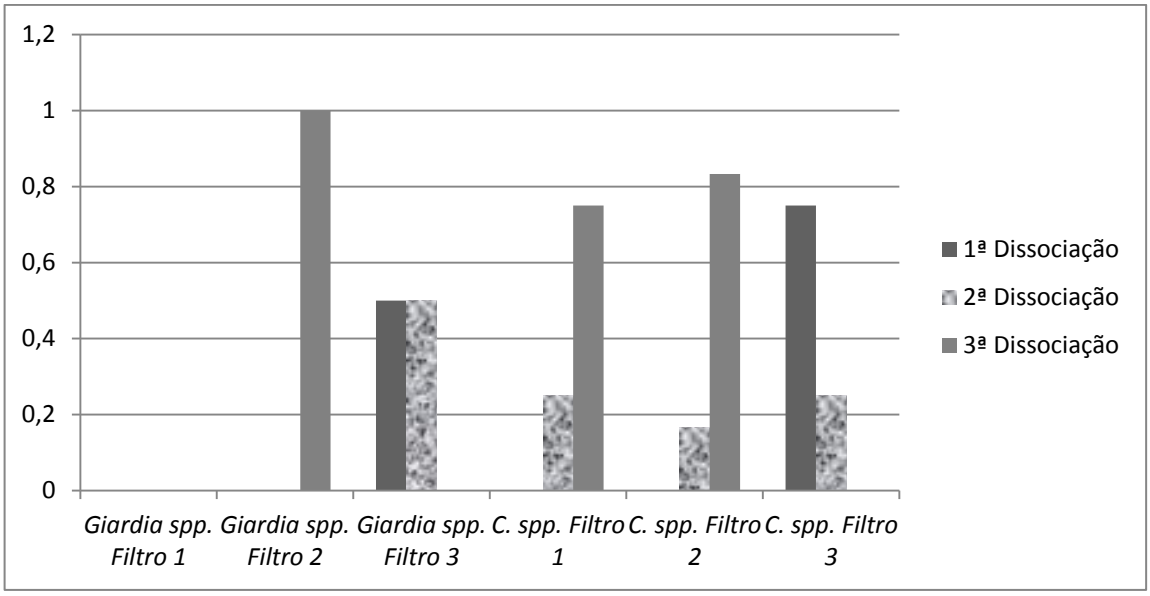
b) Porcentagem de recuperação de cada dissociação (parcial) em relação ao total obtido nas três dissociações (matriz: água de lavagem dos filtros da Fase 3)

Figura 35 – Influência do número de dissociações ácidas na recuperação dos (oo)cistos na água de lavagem dos filtros

Em relação à água de lavagem dos filtros (Figura 35), observa-se que a terceira dissociação contribuiu, na Fase 2, com cerca de 50% e 20% na recuperação de *Giardia spp*. e *Cryptosporidium* spp., respectivamente. Essa porcentagem diminuiu para a Fase 3 porque o número de (oo)cistos presentes na água clarificada era menor.



a) Porcentagem de recuperação de cada dissociação (parcial) em relação ao total obtido nas três dissociações (matriz: água filtrada da Fase 2)



b) Porcentagem de recuperação de cada dissociação (parcial) em relação ao total obtido nas três dissociações (matriz: água filtrada da Fase 3)

Figura 36 – Influência do número de dissociações ácidas na recuperação dos (oo)cistos na água filtrada

Na Figura 36, verifica-se que a relevância da terceira dissociação na Fase 2, a qual trabalhou com um maior número de (oo)cistos na água clarificada. A recuperação de *Giardia* spp. atingiu 50% na terceira dissociação ácida, porém, esse desempenho foi menor para *Cryptosporidium* spp., com aproximadamente 10%. Na Fase 3, com um menor número de (oo)cistos na água clarificada, o desempenho da terceira dissociação variou entre as amostras, assim como o das demais dissociações.

Chang et al. (2007), ao realizarem ajustes no procedimento de IMS, a fim de otimizar as recuperações, avaliaram a influência da terceira dissociação ácida com 0,1N de HCl na recuperação de *Cryptosporidium parvum* em água deionizada. Os autores observaram que a partir da terceira dissociação, o número acumulado de oocistos se mantinha estável, conforme Figura 37.

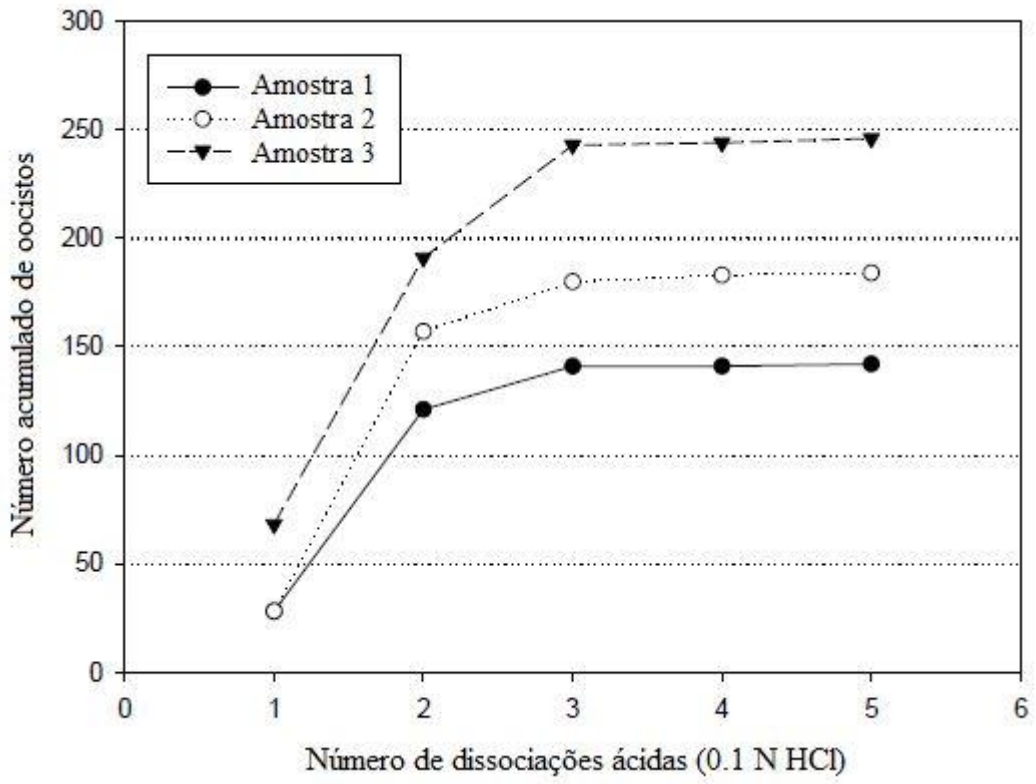


Figura 37 – Efeito do número de dissociações ácidas sobre o número acumulado de oocisto em água deionizada (CHANG et al., 2007)

Tais dados, juntamente aos da presente pesquisa, comprovam que a introdução da terceira dissociação ácida na IMS melhora as recuperações de organismos, tornando os resultados mais confiáveis. Porém, a inclusão de tal dissociação também aumenta o custo do ensaio, conforme discutido no item 5.7.

Nesse sentido, é preciso observar se as diferenças entre os resultados com duas e com 3 dissociações são realmente significativas. Assim, com os dados dos ensaios de tratabilidade utilizando o método de FCCa com IMS foram realizados testes de hipóteses (t), utilizando abordagem paramétrica entre as variáveis, para verificar se as recuperações com apenas duas dissociações são ou não significativamente diferentes do que as análises com três dissociações ácidas. As considerações dos testes foram apresentadas na Tabela 4 (item 4.7).

Para realizar os testes de hipóteses foram escolhidos os dados de detecção de (oo)cistos das seguintes matrizes: Lodo flotado (obtidos por 3 amostras da Fase 1 e 3 amostras da Fase 3), água de lavagem (obtidos por 3 amostras da Fase 2 e 3 amostras da Fase 3) e água filtrada (obtidos por 3 amostras da Fase 2 e 3 amostras da Fase 3). Assim, para cada matriz escolhida havia no total 6 números de (oo)cistos detectados (n), ambos com valores que variam entre duas e 3 dissociações. Com isso, o grau de liberdade de cada teste vale 5 (n-

1) e para um nível de confiança de 95%, a tabela *t-student* fornece o tamanho da cauda de 2,571. Tal valor assume como a região crítica dos testes (unicaudal: 0 - 2,571). A Tabela 44 apresenta os cálculos para os testes de hipóteses com as considerações adotadas.

Tabela 44: Resultados do teste de hipóteses visando comparar as recuperações com duas e três dissociações ácidas, segundo as considerações da Tabela 43

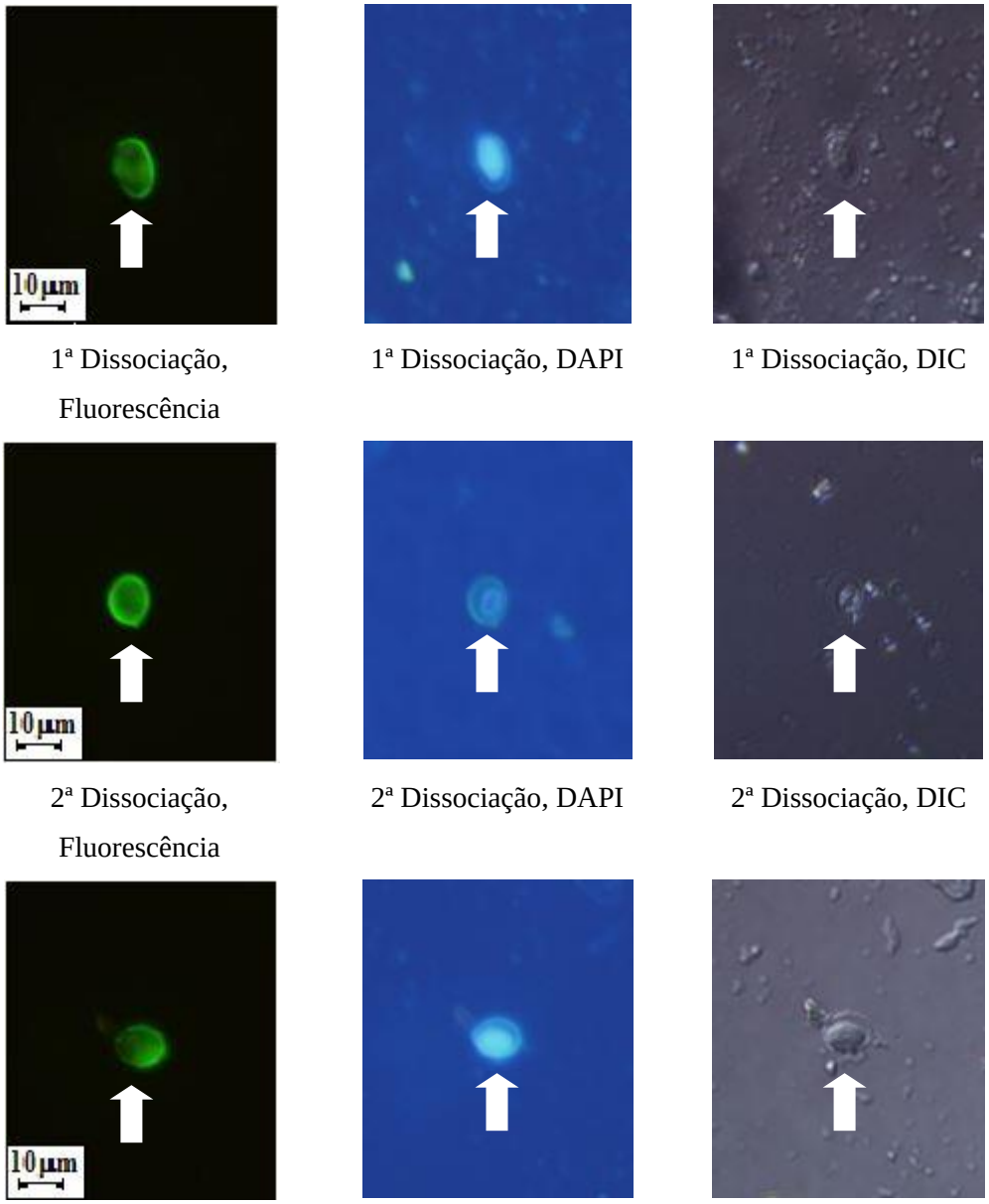
Protozoário	Matriz	D	S_D	t
Giardia spp.	Lodo flotado	142,3	42,9	8,136
	Água de lavagem dos filtros	38,7	38,9	2,434
	Água filtrada	8,2	10,4	1,931
Cryptosporidium spp.	Lodo flotado	103,5	48,8	5,198
	Água de lavagem dos filtros	54,8	48,1	2,793
	Água filtrada	4,0	3,0	3,230

Dessa forma, a região crítica do teste, que assume a hipótese 1, contêm apenas as análises de *Giardia* spp. na água de lavagem dos filtros e na água filtrada. As demais análises estão fora da região crítica, assumindo-as a hipótese 2.

De acordo com o teste de hipóteses, para as análises no lodo flotado a terceira dissociação faz diferença significativa em ambos os protozoários testados. Para as águas filtrada e de lavagem dos filtros, o teste identificou que e diferença de dissociações é significativa para oocistos de *Cryptosporidium* spp. Assim, é possível afirmar que a inclusão da terceira dissociação ácida no método de FCCa com IMS pode resultar em recuperações estatisticamente maiores do que com apenas duas dissociações.

Isto se reflete durante a obtenção de dados, visto que, em todos os ensaios de tratabilidade realizados (Fases 1, 2 e 3), as detecções de (oo)cistos feitas por FCCa com IMS e duas dissociações apresentaram maiores eficiências de remoção dos tratamentos (Tabela 41). Ao acrescentar a terceira dissociação, reduziu-se as eficiências de remoções, deixando-as com valores mais próximos aos das detecções com FCCa sem IMS. Tal fato mostra que a diferença das dissociações pode influenciar nos resultados obtidos.

No que diz respeito à influência da terceira dissociação ácida na visualização dos organismos, as Figuras 38 a 43 apresentam as imagens detectadas durante os ensaios realizados.



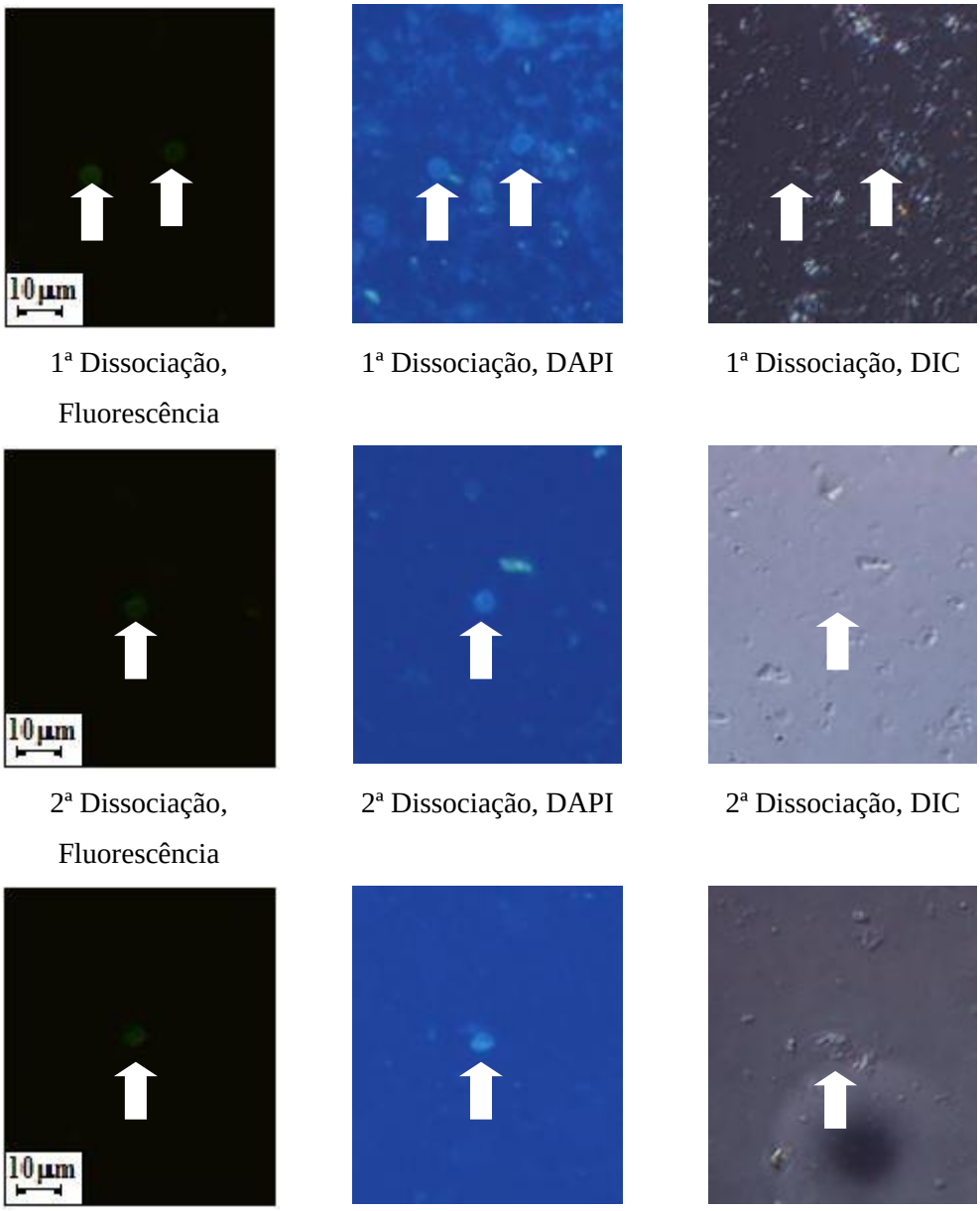
1ª Dissociação, Fluorescência | 1ª Dissociação, DAPI | 1ª Dissociação, DIC

2ª Dissociação, Fluorescência | 2ª Dissociação, DAPI | 2ª Dissociação, DIC

3ª Dissociação, Fluorescência | 3ª Dissociação, DAPI | 3ª Dissociação, DIC

Figura 38 – Visualização de cistos de *Giardia* spp. em matriz lodo flotado (>400x)

Nas visualizações de *Giardia* spp. no lodo flotado, observa-se uma pequena mudança no formato dos cistos ao longo das dissociações (Figura 38).



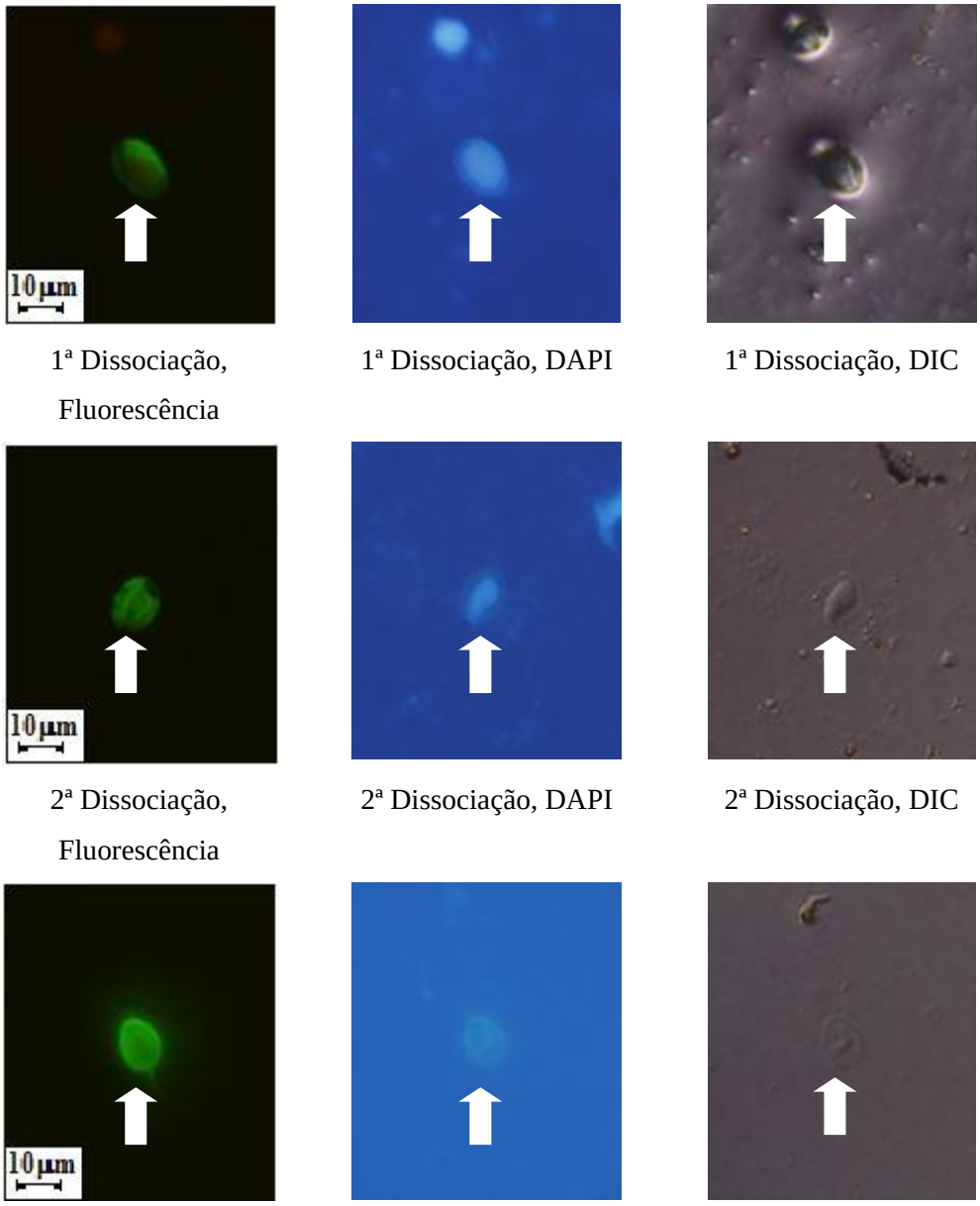
1ª Dissociação, Fluorescência | 1ª Dissociação, DAPI | 1ª Dissociação, DIC

2ª Dissociação, Fluorescência | 2ª Dissociação, DAPI | 2ª Dissociação, DIC

3ª Dissociação, Fluorescência | 3ª Dissociação, DAPI | 3ª Dissociação, DIC

Figura 39 – Visualização de cistos de *Cryptosporidium* spp. em matriz lodo flotado (>400x)

Em relação à visualização de oocistos no lodo flotado (Figura 39), nota-se dificuldades de visualização devido à pequena dimensão dos organismos e às maiores sujidades da matriz utilizada. Neste contexto, não é possível evidenciar a influência das dissociações nos oocistos.



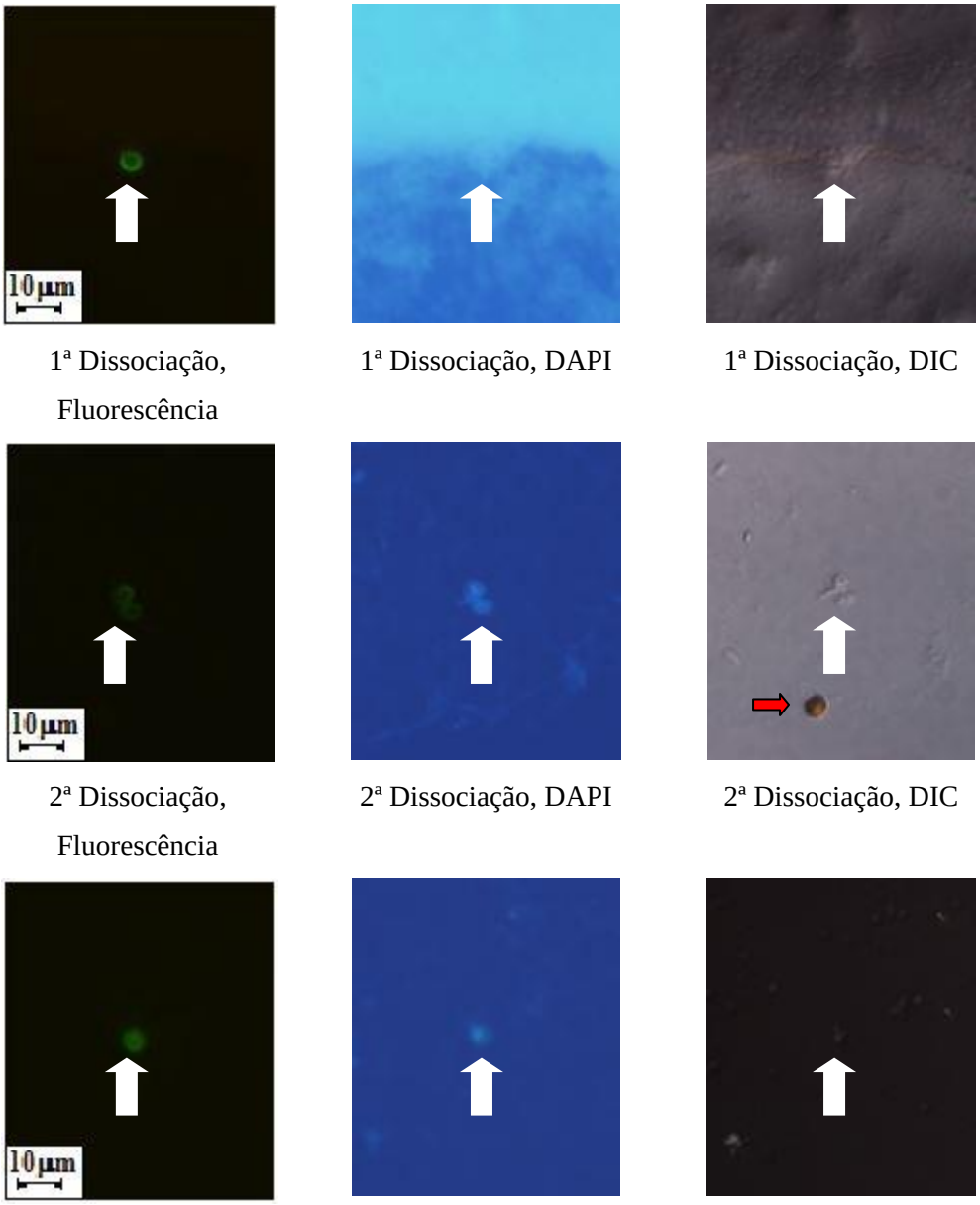
1ª Dissociação, Fluorescência | 1ª Dissociação, DAPI | 1ª Dissociação, DIC

2ª Dissociação, Fluorescência | 2ª Dissociação, DAPI | 2ª Dissociação, DIC

3ª Dissociação, Fluorescência | 3ª Dissociação, DAPI | 3ª Dissociação, DIC

Figura 40 – Visualização de cistos de *Giardia* spp. em matriz água de lavagem dos filtros (>400x)

Na Figura 40, o interior dos cistos foi mais visível nas primeiras dissociações na visualização em DAPI e DIC, fato que não aconteceu na terceira dissociação.



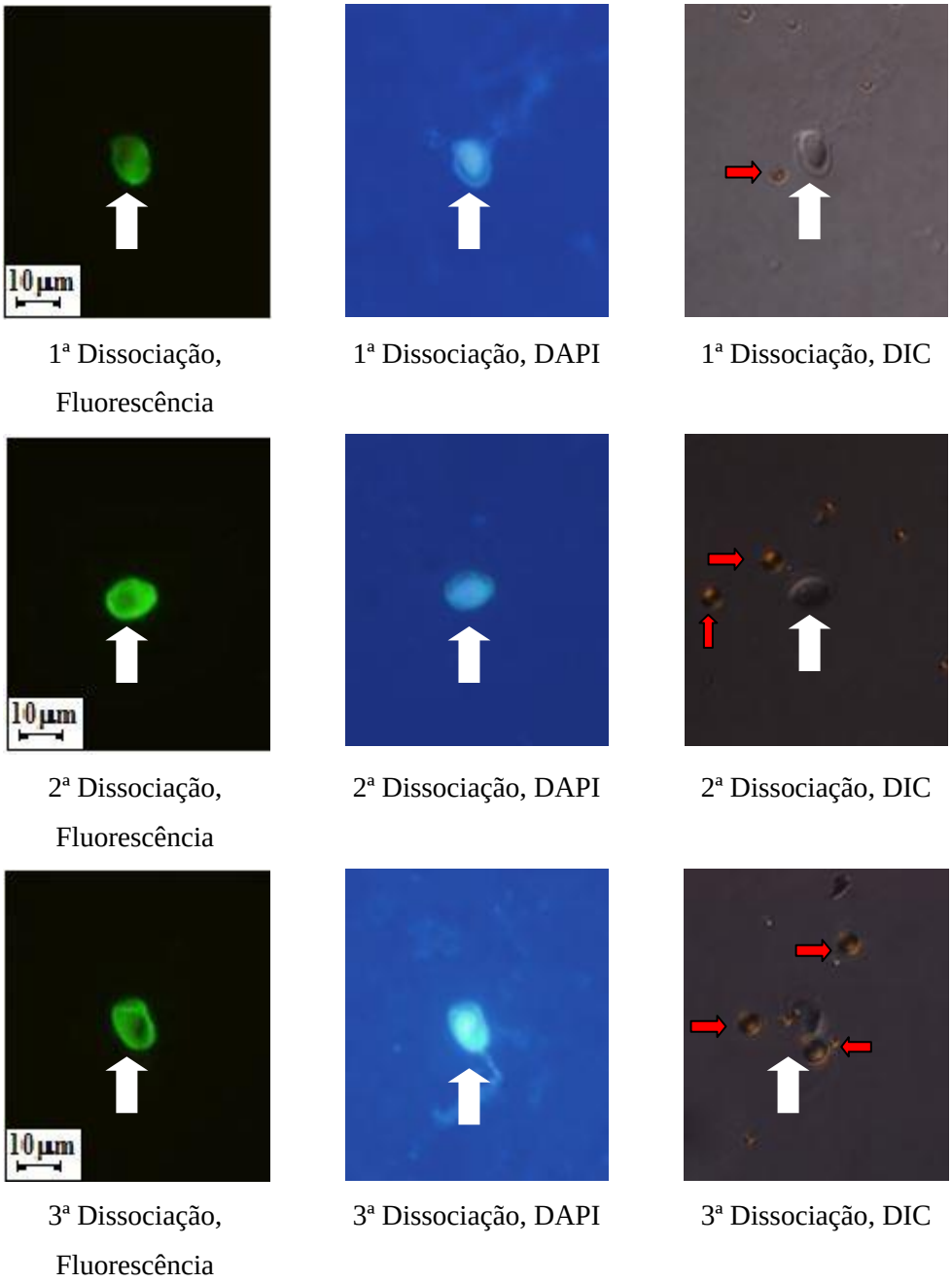
1ª Dissociação, Fluorescência | 1ª Dissociação, DAPI | 1ª Dissociação, DIC

2ª Dissociação, Fluorescência | 2ª Dissociação, DAPI | 2ª Dissociação, DIC

3ª Dissociação, Fluorescência | 3ª Dissociação, DAPI | 3ª Dissociação, DIC

Figura 41 – Visualização de cistos de *Cryptosporidium* spp. em matriz água de lavagem dos filtros (>400x)

Na água de lavagem dos filtros, há dificuldade de visualização de oocistos e não é possível destacar diferenças entre os organismos ao longo das dissociações. Nota-se a presença de um *bead* (microesfera magnética utilizada para IMS) próximo aos protozoários na visualização em DIC da segunda dissociação.



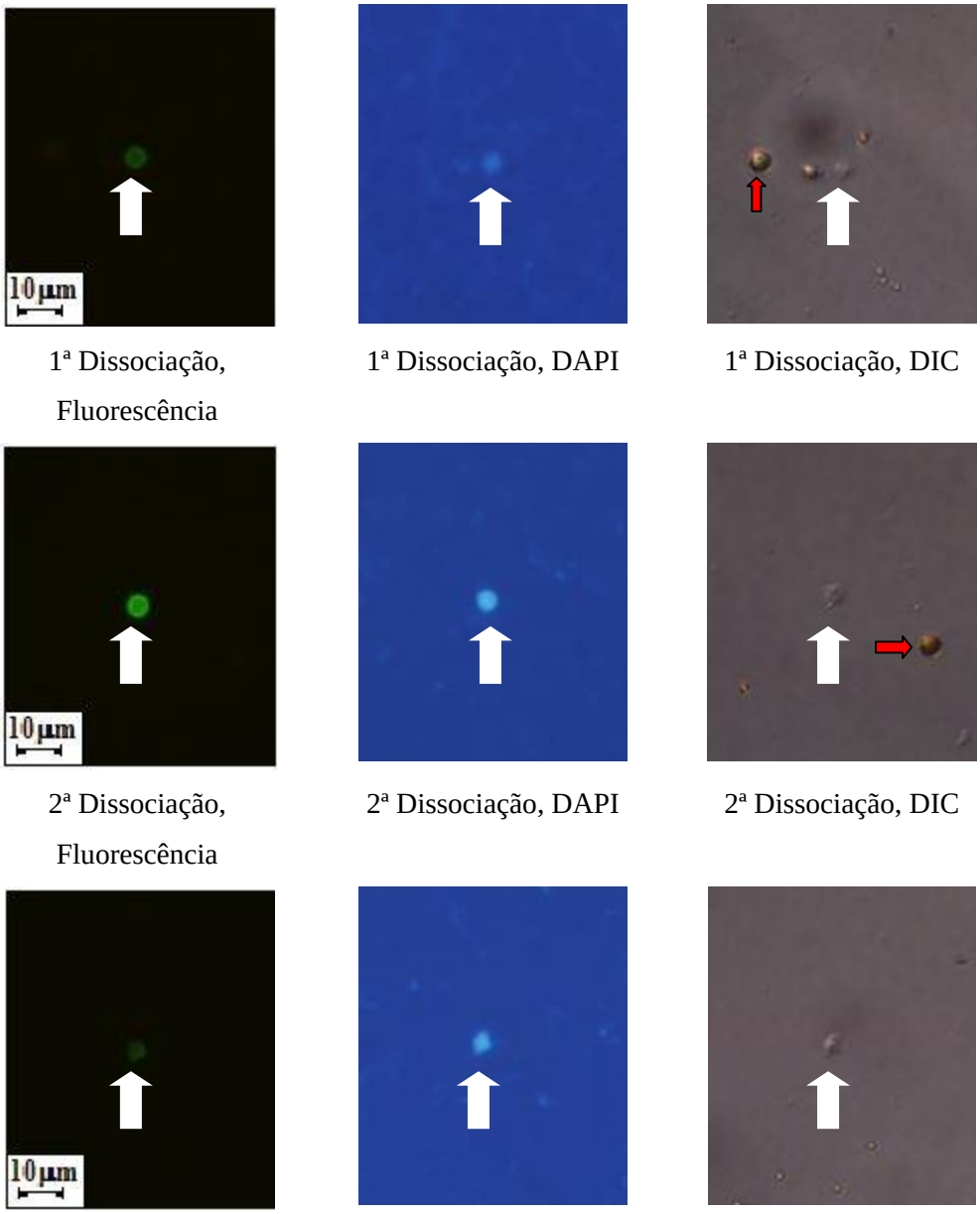
1ª Dissociação, Fluorescência | 1ª Dissociação, DAPI | 1ª Dissociação, DIC

2ª Dissociação, Fluorescência | 2ª Dissociação, DAPI | 2ª Dissociação, DIC

3ª Dissociação, Fluorescência | 3ª Dissociação, DAPI | 3ª Dissociação, DIC

Figura 42 – Visualização de cistos de *Giardia* spp. em matriz água filtrada (>400x)

Nas imagens de *Giardia* spp. na água filtrada, nota-se a presença de *beads* em todas as dissociações, com destaque para a terceira dissociação, onde as microesferas parecem estar aderidas ao cisto.



1ª Dissociação, Fluorescência | 1ª Dissociação, DAPI | 1ª Dissociação, DIC

2ª Dissociação, Fluorescência | 2ª Dissociação, DAPI | 2ª Dissociação, DIC

3ª Dissociação, Fluorescência | 3ª Dissociação, DAPI | 3ª Dissociação, DIC

Figura 43 – Visualização de cistos de *Cryptosporidium* spp. em matriz água filtrada (>400x)

Na Figura 43, as visualizações com DAPI e em DIC mostram uma pequena diferença no formato do oocisto entre a segunda e terceira dissociação. Também é possível observar a presença de *beads* nas visualizações em DIC.

As imagens observadas sugerem a forte interação entre os *beads* com os organismos, mesmo após as dissociações. Tal fenômeno também foi observado por Maciel e Sabogal Paz (2016) e Rochelle et al. (1999), para cistos e oocistos respectivamente.

As aparentes mudanças morfológicas dos organismos ao longo das dissociações podem estar ligadas ao tempo de contato do ácido (HCL 0,1N) visando desagregar as

microesferas magnéticas dos organismos, sendo a terceira dissociação a que gera maior tempo de exposição ao ácido em questão. Assim, é possível que tal fato altere os ensaios posteriores de viabilidade ou infectividade animal nas amostras.

Rochelle et al. (1999) afirmam que é essencial que os métodos usados para recuperar protozoários não tenham efeitos deletérios sobre a viabilidade ou infectividade dos organismos. Pois tais ensaios são importantes para que os serviços públicos de água tenham ferramentas para avaliar os riscos à saúde pública e a eficiência da desinfecção. Segundo os autores, a IMS processada com duas dissociações ácidas não alterou a viabilidade dos oocistos de *Cryptosporidum parvum.*

Nesse sentido, é preciso ensaios específicos sobre viabilidade e infectividade para confirmar se a inclusão da terceira dissociação ácida é capaz de afetar os ensaios posteriores (viabilidade e infectividade animal).

5.7 – Custo dos ensaios de FCCa com e sem IMS em amostras ambientais

Este item apresenta o custo médio unitário para a reprodução dos ensaios de FCCa realizados na pesquisa, comparando com e sem a etapa de purificação e, no caso com IMS, ponderando com e sem a utilização da terceira dissociação ácida.

Para analisar apenas uma vez a amostra de uma matriz qualquer, considerando apenas os reagentes do kit *Merifluor*® e *Dynadeads*®, são necessárias 3 aplicações de *Merifluor*® para o método de FCCa sem IMS. E para o método de FCCa com IMS é necessário uma aplicação dos produtos de *Dynadeads*® e duas ou três de *Merifluor*® segundo o número de dissociações ácidas.

Os custos unitários de cada aplicação desses reagentes foram apresentados no item 5.4.3 (Tabela 20). Tomando esses valores como referência, foi calculado o custo de cada ensaio para uma amostra qualquer, atualizado para Abril de 2016 no índice *IGP-M (FGV)* . Os resultados estão na Tabela 45.

Tabela 45: Custo médio de uma aplicação do método de FCCa com e sem IMS, em 1 de abril de 2016, com dados atualizados pelo índice IGP-M (FGV)

Método	Reagente	Valor médio unitário (R$)	Numero de aplicações	Custo por reagente (R$)	Custo total (R$)
FCCa sem IMS	*Merifluor®*	139,12 ± 26,09	3	417,36 ± 78,27	417,36 ± 78,27
	Dynadeads®	416,35 ± 263,73	0	0	
FCCa com IMS e 2 dissociações	*Merifluor®*	139,12 ± 26,09	2	278,24 ± 52,18	694,59 ± 315,91
	Dynadeads®	416,35 ± 263,73	1	416,35 ± 263,73	
FCCa com IMS e 3 dissociações	*Merifluor®*	139,12 ± 26,09	3	417,36 ± 78,27	833,71 ± 342,00
	Dynadeads®	416,35 ± 263,73	1	416,35 ± 263,73	

A Tabela 45 mostra que uma aplicação do método de FCCa com IMS tem custo aproximadamente 40% maior do que o custo do método sem IMS, quando comparado com duas dissociações ácidas e 50% maior quando ponderado com três dissociações.

Especificamente no método de FCCa com IMS, a aplicação com 3 dissociações ácidas tem aumento nos custos em 17% quando comparado com o uso de 2 dissociações.

Na análise de custos da pesquisa de Maciel e Sabogal Paz (2016), os ensaios unitários com IMS obtiveram aumento de 4% comparados com os ensaios sem IMS. Em tal análise os autores consideram 5 aplicações do kit *Merifluor®* no ensaio sem IMS.

Assim, considera-se que os ensaios unitários sem IMS, para uma amostra qualquer, são mais econômicos que os testes com IMS.

6- CONCLUSÕES

A água de estudo preparada e os ensaios de tratabilidade em escala de bancada permitiram verificar o funcionamento do tratamento de ciclo completo com flotação, consequentemente, os seguintes parâmetros de projeto foram obtidos: Dosagem de PAC = 25mg.L^{-1}; Gmr = 700s^{-1}; Tmr = 10s; Gml = 60s^{-1}; Tml = 4min; Tf = 10min; Rec = 5% e Velocidade de flotação de 5cm.min^{-1}.

Os subprodutos gerados pelos ensaios de tratabilidade: lodo flotado e água de lavagem dos filtros, apresentaram características que os assemelham aos resíduos de ETA. Também os parâmetros das águas clarificada e filtrada revelaram a purificação progressiva do tratamento, tendo a água filtrada atendendo aos padrões de potabilidade.

Nos ensaios de qualidade dos métodos testados para a quantificação de protozoários, o método de floculação em carbonato de cálcio sem a separação imunomagnética se sobressaiu alcançando recuperações de 31,5% para *Giárdia* spp. e 70,3% para *Cryptosporidium* spp., ambas maiores do que as obtidas pelo método de FCCa com IMS (16,7% para *Giárdia* spp. e 32,3% para *Cryptosporidium* spp. quando duas dissociações e 24,7% para *Giárdia* spp. e 46,5% para *Cryptosporidium* spp. quando três dissociações).

Em relação aos ensaios de tratabilidade com protozoários, na Fase 1, a coagulação, floculação e flotação removeram média de 1,55 log de cistos de *Giardia* spp., retendo 0,22 log nos resíduos e 1,21 log de oocistos de *Cryptosporidium* spp. com 0,93 log nos resíduos.

Na Fase 2, a filtração, com taxa próxima de 100$m^3m^{-2}dia^{-1}$, removeu média de 1,2 log de cistos de *Giardia* spp., retendo cerca de 0,22 log nos resíduos e 0,89 log oocistos de *Cryptosporidium* spp. com 0,58 log nos resíduos.

A Fase 3, simulando o ciclo completo com flotação (coagulação, floculação, flotação e filtração), foi capaz de remover média de 2,64 log cistos de *Giardia* spp., retendo cerca de 0,19 log nos resíduos e a 2,5 log de oocistos de *Cryptosporidium* spp., com 0,87 log nos resíduos.

A adição da terceira dissociação ácida no método de FCCa com IMS foi indispensável, visto que a sua não utilização acarretou em diferenças estatisticamente significativas dos resultados e aumento das perdas de organismos. Contudo, ensaios específicos dessa dissociação extra na viabilidade e infectividade animal são necessários.

Em relação aos custos dos ensaios unitário de FCCa para uma amostra ambiental, a aplicação do método sem IMS é a mais econômica. Visto que, ao utilizar IMS os custos

aumentam em 40% quando duas dissociações ácidas são utilizadas e em 50% quando com três dissociações.

Assim, conclui-se que, para a quantificação de protozoários, o método de FCCa sem IMS pode ser indicado para análise das águas e resíduos do tratamento de ciclo completo com flotação. Tal método é mais econômico e, nos ensaios em laboratório, obteve melhor desempenho de recuperação de organismos do que a sua utilização com IMS.

Mesmo atendendo aos padrões de potabilidade, a simulação do tratamento de ciclo completo com flotação não removeu completamente os protozoários patogênicos. Dessa forma, ressalta-se a necessidade de preservação dos mananciais, do tratamento dos esgotos e da desinfecção da água filtrada visando reduzir o risco microbiológico presente na água de consumo.

7- RECOMENDAÇÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

Avaliar o protocolo de FCCa com e sem IMS em amostras de mananciais e ETA reais.

Realizar ensaios de flotação sem a utilização de coagulante, para avaliar apenas o processo físico de arraste dos (oo)cistos pelas microbolhas;

Incluir na legislação a avaliação da qualidade microbiológica da água de lavagem dos filtros quando a recirculação é prevista na ETA.

Pesquisar e selecionar outros métodos de detecção de (oo)cistos de protozoários visando a realidade econômica, técnica e operacional dos municípios brasileiros.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, R.D. The *Giardia lambria* genome. International Journal for Parasitology, v.30,n.4, 2000.

AMERICAN SOCIETY OF CIVIL ENGINEERS – ASCE; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION – AWWA. Technology Transfer Handbook: Management of Water Treatment Plant Residual, New York, 1996.

AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION – AWWA. *Calidad y Tratamiento del Agua. Manual de Suministros de Agua Comunitaria*. 5º ed. Mc Graw Hill, 2002.

APHA; AWWA; WEF. Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington. 22° Ed. EUA. 2012.

ASSAVACILAVASUKUL, P. et al. Effect of pathogen concentrations on removal of *Cryptosporidium* and Giardia by conventional drinking water treatment. Water Research. v. 42, n.10, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. Norma Brasileira 10004: Resíduos Sólidos – Classificação, 2004. Disponível em: << http://www.ccs.ufrj.br/images/biosseguranca/CLASSIFICACAO_DE_RESIDUOS_SOLIDOS_NBR_10004_ABNT.pdf >> (acesso em 26/10/2015).

BETANCOURT, W. Q.; ROSE, J.B. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. Veterinary Parasitology.126, 2004.

BEVILACQUA, P. D.; AZEVEDO, S. M. F. O.;CERQUEIRA, D. A. Tratamento de Água e Remoção de Protozoários. In: Remoção de microrganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano. Belo Horizonte/MG. 2009.

BIDONE, F.; SILVA, A.P.; MARQUES, D.M.In: Lodos produzidos nas estações de tratamento de água (ETA): desidratação em leitos de secagem e codisposição em aterros sanitários. In: ANDREOLI, C.V., coord. Aproveitamento do Lodo Gerado em Estações de Tratamento de Água e Esgotos Sanitários, Inclusive com a Utilização de Técnicas Consorciadas com Resíduos Sólidos Urbanos. Curitiba: PROSAB, 2001.

BRASIL. Lei Federal N.º 12.305 de 02 de Agosto de 2010. Institui a Politica Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Doenças Infecciosas e Parasitárias – Guia de Bolso- 8ª ed. BRASÍLIA , 2010b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914, de 12 de Dezembro de 2011. Publicada no D.O.U. Nº 239, Seção 1, página 39 de 14/12/2011. Brasília. 2011.

BUKHARI, Z.; McCUIN, R.M.; FRICKER, C.R.; CLANCY, J.L. Immunomagnetic Separation of *Cryptosporidium parvum* from Source Water Samples of Various Turbidities. Applied and Environmental Microbiology. v.64, n.11, 1998.

CACCIÒ, S.M.; SPRONG, H. Epidemiology of *Giardiasis* in Humans *in* LUJÀN, H.D.; SVARD,S. *editors Giardia*: A model Organism. Springer, 2011.

CANTUSIO NETO, R. Estudo dos métodos: floculação em carbonato de cálcio e adaptação das técnicas de filtração em membrana e separação imunomagnética para a detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras hídricas. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

CANTUSIO NETO, R.; DOS SANTOS, L.U.; SATO, M.I.; FRANCO, R.M. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in surface water supply of Campinas, Southeast Brazil. Water Science and Technology, v.62, n.1, 2010.

CARDOSO, L.S.; BERINO, E.; DEUS, A.B.S.; DE LUCA, S.J. *Cryptosporidium* e *Giardia* em águas e efluentes: estado da arte. In: Congreso Interamericano de Ingenieria Sanitaria y Ambiental, Cancún. Anais, Cancún: Aidis, 2002.

CHAKRABORTY, R.; HAZEN, T.C.; JOYNER, D.C.; KUSEL, K.; SINGER, M.R.; SITTE,J.; TOROK, T. Use of immunomagnetic separation for the detection of *Desulfovibrio vulgaris* from environmental samples. Journal of Microbiological Methods. 86, 2011.

CHANG, C.Y.; HUANG, C.; PAN, J.R.; WU, B.J. Modification of immunomagnetic separation procedures for analysis of *cryptosporidium* at spiked oocysts and turbid sample conditions. J. Environ. Eng. Manage. v.17,n.5, 2007.

CHO, E.J. et al. A Waterborne Outbreak and Detection of *Cryptosporidium* Oocysts in Drinking Water of an Older High-Rise Apartment Complex in Seoul. Korean Journal of Parasitology , v. 51, n. 4, 2013.

CIRQUEIRA, L.N. Estudo da Composição do Lodo de Flotação. Universidade Federal do ABC, 2009.

COOK, N.; PATON, C.A.; WILKINSON, N.; NICHOLS, R.A.B.; BARKER, K.; SMITH, H.V. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 1: Development and optimization of methods. International Journal of Food Microbiology, 109, 2006.

CORNWELL, D.A.; BISHOP, M.M.; GOULD, G.R.; VANDERMEYDEN, C. Handbook of Practice – Water Treatment Plant Waste Management. American Water Works Association, Denver, 1987.

CORNWELL, D.A.; LEER, R. G. Waste strem recycling: Its effect on water quality. Journal AWWA, 1994.

COUTO,H. J. B.; MELO, M. V.; MASSARANI,G. Treatment of Milk Industry Effluent by Dissolved Air Flotation. Brasilian Journal of Chemical Engineering. V.21, n° 01, pp.83-91, 2004.

DAI, X.; BOLL, J.; HAYES, M.E.; ASTON, D.E. Adhesion of Cryptosporidium parvum and Giardia lamblia to solid surfaces: the role of surface change and hydrofobicity. Colloids and surfaces B: Biointerfaces , v.34, 2004.

DALY, E.R.; ROY, S.J.; BLANEY, D.D.; MANNING, J.S.; HILL,V.R.; XIAO, L.; STULL, J.W. Outbreak of Giardiasis associated with a community drinking-water source. Epidemiology and Infection, v. 138, n. 4, 2010.

DI BERNARDO, A. S.; AMIRTHARAJAH, A.; DI BERNARDO, L. Comparação da eficiência de remoção de partículas na filtração direta ascendente e descendente. XXVIII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. Cancun, 2002.

DI BERNARDO, L; DANTAS, A.D.B. Métodos e Técnicas de Tratamento de Água. Ed. RIMA. 2ª Edição, 2005.

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A.D.B.; VOLTAN, P.E.N. Tratamento de Água e dos Resíduos gerados em Estações de Tratamento de Água. Editora LdiBe, 2011.

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A.D.B.; VOLTAN, P.E.N. Métodos e Técnicas de Tratamento e Disposição dos Resíduos Gerados em Estações de Tratamento de Água. Editora LDiBe, 2012.

DI BERNARDO, L.; SCALIZE, P. S.; SUZA FILHO, A. G. Água de Lavagem de Filtros Rápidos. In: REALI, M.A.P. (Coord.). Noções gerais de tratamento e disposição final de lodos de estações de tratamento de água. Rio de Janeiro: Projeto PROSAB; ABES, 1999.

DIGIORGIO,C.L; GONZALEZ, D.A; HUITT, C.C. *Cryptosporidium* and *Giardia* recoveries in natural waters by using environmental protection agency Method 1623. Applied and Environmental Microbiology, v. 68, n. 12, 2002.

DUGAN, N.R. et al. Controlling *Cryptosporidium* oocysts using conventional filtration. Journal of American Water Works Association. v. 93, 2001.

EDZWALD, J; HAARHOFF, J. (2011). Dissolved air flotation for water clarification. McGraw-Hill, New York. USA.

EDZWALD, K. J.; TOBIASON, J.E.; PARENTO, L.M.; KELLEY, M.B.; KAMINSKI, G.S.; DUNN, H.J.; GALLANT,P.B. Giardia and Cryptosporidium removals by clarification and filtration under challenge conditions. American Water Works Association, v. 92, n.12, 2000.

EDZWALD, K. J.; TOBIASON, J.E. Fate and removal Cryptosporidium in a dissolved air flotation water plant with and without recycle of waste filter backwash water. II World Water Congress. IWA, Berlin, 2001.

FAYER, R. *Cryptosporidium*: A water-borne zoonotic parasite. Veterinary Parasitology, v. 126, n. 1-2, 2004.

FENG, Y.; ZHAO, X.; CHEN, J.; JIN, W.; ZHOU, X.; LI, N. ; WANG, l.; XIAO, L. Occurrence, Source, and Human Infection Potential of Cryptosporidium and Giardia spp. In Source and Tap Water in Shanghai, China. Appl Environ Microbiol, 2011.

FERREIRA FILHO, S.S.; WAELKENS, B. E. Minimização da produção de lodo no tratamento de águas de abastecimento mediante uso do cloreto de polialumínio e sua disposição em estações de tratamento de esgotos. Engenharia Sanitária e Ambiental. V. 14. N. 3, 2009.

FONTAINE, M.; GUILLOT, E. An immunomagnetic separation–real-time PCR method for quantification of *Cryptosporidium parvum* in water samples. Journal of Microbiological Methods. 54, 2003.

FRANCO, R.M.B.; HACHICH, E.M.; SATO, M.I.Z.; NAVEIRA, R.M.L.; SILVA, E.C.; CAMPOS, M.M.C.; NETO, R.C.; CERQUEIRA, D.A.; BRANCO, N.; LEAL, D.A.G. Avaliação da performance de metodologias de detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água destinada ao consumo humano, para o atendimento às demandas da Vigilância em Saúde Ambiental no Brasil. Epidemiol. Serv.Saúde, Brasília, 2012.

FRANCO, R. M. B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. Revista Panamericana de Infectologia, v.4, 2007.

FREGONESI, B.M.; SAMPAIO, C.F.; RAGAZZI, M.F.; TONANI, K.A.A; SEGURA-MUNOZ, S.I. *Cryptosporidium* e *Giardia*: desafios em águas de abastecimento público. O Mundo da Saúde, São Paulo, 2012.

FREITAS, A.G.; BASTOS, R.K.X.; BEVILACQUA, P.D.; PÁDUA, V.L.; PIMENTA, J.F.P.; ANDRADE, R.C. Recirculação da água de lavagem de filtros e perigos associados a protozoários. Engenharia Sanitária e Ambiental. v.15, n.1, 2010.

GIGLIO, G.L. Avaliação de Diversos Métodos de Detecção de Cistos de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium parvum* Presentes no Resíduo Gerado Após o Tratamento de Água de Abastecimento com Turdidez Elevada. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

GUIMARÃES, G.C. Estudo do adensamento e desidratação dos resíduos gerados na ETA-Brasília. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

HAHN, H.H. Wastewater Treatment. In: The Scientific Basis of Flotation. Cambridge. Ed. K. Ives, 1982.

HALI, T.; PRESSDEE, J.; GREGORY,R.; MURRAY,K. *Cryptosporidium* Removal During Water Treatment Using Dissolved-Air Flotation. Paper prepared for the proceedings of the Join Specialized Conference(IAWQ, IWSA, & AWWA) on Flotation Processes in Water and Sludge Treatment, Orlando, Fla, Apr. 26-28, 1994.

HELMI, K.; SKRABER, S.; LEBLANC, L.; HOFFMANN, L. CAUCHIE, H.M. Comparison of three methods to concentrate *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts from surface and drinking waters. Water Science & Technology – WST. v.62,n.1, 2010.

HIJNEN,W.A.M.; BEERENDONK, E.F.; MEDEMA,G.J. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. Water Research, v.40, n.1, 2006.

HSU,B.M.; YEH,H.H. Removal of *Giardia* and *Criptosporidium* in drinking water treatment: a pilot - scale study. Water Research 37, 2003.

INOUE, M.; RAI, S.K.; ODA, T.; KIMURA, K.; NAKANISHI, M.; HOTTA, H.; UGA, S. A new filter-eluting solution that facilitates improved recovery of Cryptosporidium oocysts from water. Journal of Microbiological Methods. 55,2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA – IBGE. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2008. Rio de Janeiro. Brasil, 2010.

KARANIS, P.; KOURENTI, C. Waterborne transmission of protozoan parasites: a review of world-wide outbreaks. Fourth International *Giardia* Conference and First Combined *Giardia-Cryptosporidium* Meeting. Amsterdam, The Netherlands, 2004.

KAWAMURA, S. Integrated design and operation of water treatment facilities. John Wiley & Sons, Inc. New York, 2000.

KEEGAN, A; DAMINATO, D.; SAINT, C.P.; MONIS, P. T. Effect of water treatment processes on Cryptosporidium infectivity. Water Research V.42, 2008.

KOHLI, A.; BUSHEN, O.Y.; PINKERTON, R.C.; HOUPT, E.; NEWMAN, R.D.; SEARS, C.L.; LIMA, A.A.M.; GUERRANT, R.L. Giardia duodenalis assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. Transactions of the Tropical Medicine and Hygiene. v. 102, n.7, 2008.

KUHN, R.C.; ROCK, C.M.; OSHIMA, K.H. Effects of pH and Magnetic Material on Immunomagnetic Separation of *Cryptosporidium* Oocysts from Concentrated Water Samples. Applied and Environmental Microbiology. v.68, n.4, 2002.

LADEIA, M.M.; Heller, L.; VIEIRA, M.B.C.M. Avaliação da eficiência da filtração rápida descendente na remoção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em instalação piloto. 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. ABES, 2005.

LEITCH,G.J.; HE, Q. Cryptosporidiosis-an overview. Journal of Biomedical Research, v.25, n.1, 2011.

LIM, Y.A.L.; WAN HAFIZ, W.I.; NISSAPATORN, V. Reduction of *Cryptosporidium* and *Giardia* by sewage treatment processes. Tropical Biomedicine. 24, 2007.

LINDQUIST, A.H.D.; DUFOUR, A.P.; WYMER, L.J.; SCHAEFER III, F.W. Criteria for evaluation of proposed protozoan detection methods. Journal of Microbiological Methods. 37, 1999.

LI, S.Y.; GOODRICH, J.A.; OWENS, J.H. Potential *Cryptosporidium* surrogates and evaluation of compressible oocysts. Environmental Protection Agency. Cincinnaty, 1995.

MACIEL, P.M.F. Remoção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em Águas de Abastecimento com Turbidez Elevada Utilizando Cloreto de Polialumínio: Estudo em Escala de Bancada e Desafios Analíticos. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

MACIEL, P.M.F.; SABOGAL-PAZ, L.P. Removal of Giardia spp. And Cryptosporidium spp. From water supply with high turbidity: analytical challenges and perspectives. Journal of Water and Health. Vol. 14, 2016.

MACKENZIE, W.R. et al. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water-supply. New Englang Journal of Medicine, v. 331, n. 3,1994.

MANSER, M.; GRANLUND, M.; EDWARDS, H.; SAEZ, A.; PETERSEN, E.; EVENGARD, B.; CHIODINI, P. Detection of Cryptosporidium and Giardia in clinical laboratories in Europe – a comparative study. Clinical Microbiology and Infection., v.20, n. 1, 2014.

MARQUES, A. D. Avaliação da filtração direta na remoção de criptosporídio e giárdia em água para abastecimento. Dissertação (Mestrado).Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2006.

McELROY, W.; CABELLO, E.; PILLAI, S.D. Efficacy of an immuno-magnetic separation system for recovering *Cryptosporidium* oocysts from soils. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology. 9, 2001.

MORCH, K. et al. Severity of *Giardia* infection associate with postinfectious fadigue and abdominal symptoms two years after. BMC Infectious Diseases, v. 9, 2009.

MWH. In CRITTENDEN, J.C.; TRUSSELL, R.R.; HAND, D.W.; HOWE, D.W.; TCHOBANOGLOUS, G. Water Treatment Design: Principles and Design. Ed. 3, John Wiley & Sons, 2005.

NEVES, D.P.; MELO, A.L. LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. Parasitologia Humana. Ed 11. Atheneu. São Paulo, 2004.

NISHI, L.; VIEIRA a, A.M.S.; VIEIRA, M.F.; SILVA, G.F.; BERGAMASCO, R. Application of hybrid process of coagulation/flocculation and membrane filtration for the removal of protozoan parasites from water. 20th International Congress of Chemical and Process Engineering CHISA, Prague, 2012.

OKHUSEN,P.C.; CHAPPELL, C.L.; CRABB,J.H.; STERLING,C.R.; DUPONT,H.L. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. The Journal of Infectious Diseases, v. 180, n.4, 1999.

OSAKI, S.C.; SOCCOL, V.T.; COSTA, A.O.; SILVA,M.B.O.; PEREIRA, J.T.; PROCÓPIO, A.E. Polymerase chain reaction and nested-PCR approaches for detecting *Cryptosporidium* in water catchments of water treatment plants in Curitiba, state of Paraná, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. v. 46,n.3,Uberaba, 2013.

PAVANELLI, G. Eficiência de diferentes tipos de coagulantes na coagulação, floculação e sedimentação de água com cor ou turbidez elevada. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

PINTO, D.O. Aplicabilidade do Método 1623 e do Método de Filtração em Membranas para detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras hídricas considerando diferentes faixas de turbidez, e estudo da etapa de purificação por Separação Imunomagnética. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

PLUMMER, J.D.; EDZWALD, J.K.; KELLEY, M.B :Removing Cryptosporidium by dissolved-air flotation. Jour. AWWA, 1995.

PLUTZER, J.; ONGERTH,J.; KARANIS,P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. International Journal of Hygiene and Environmental Health, v.213, n.5, 2010.

REALI, M.A.P. Concepção e Avaliação de um Sistema Compacto para Tratamento de Águas de Abastecimento Utilizando o Processo de Flotação por Ar Dissolvido e Filtração com Taxa Declinante. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Carlos, 1991.

REALI, M.A.P. Principais características quantitativas e qualitativas do lodo de ETA. In: REALI, M.A.P. (Coord.). Noções gerais de tratamento e disposição final de lodos de estações de tratamento de água. Rio de Janeiro: Projeto PROSAB; ABES, 1999.

REALI, M.A.P; MORUZZI, R.B.; PATRIZZI, L.J. Flotação por ar dissolvido aplicada na clarificação de águas que apresentam picos de turbidez. 22º Congresso de Engenharia Sanitária e Ambiental. ABES, 2003.

ROCHELLE,P.A.; LEON, R.; JOHNSON, A.; STEWART, M.H.; WOLFE, R.L. Evaluation of Immunomagnetic Separation for Recovery of Infectious *Cryptosporidium parvum* Oocysts from Environmental Samples. Applied and Environmental Microbiology. v. 65, n. 2, 1999.

RYAN,U. XIAO, L. Taxonomy and Molecular Taxonomy in: CACCIO, S. M.; WIDMER, G. (editors). *Cryptosporidium*: Parasite and Disease. Springer, 2014.

SABOGAL-PAZ, L.P. Modelo Conceitual de Seleção de Tecnologias de Tratamento de Água para Abastecimento de Comunidades de Pequeno Porte. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

SANTOS, P.R. Ocorrência e remoção de protozoários patogênicos Giardia spp. e Cryptosporidium spp. em sistemas de tratamento de esgoto sanitário. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

SCHUSTER, C.J. et al. Infectious disease outbreaks related to drinking water in Canada. Canadian Journal of Public Health, v. 96, 2005.

SMITH, H.V.; GRIMASON, A.M. *giardia* and *Cryptosporidium* in water and wastewater in: MARA, D; HORAN, N. The Handbook ofWater and Wastewater Microbiology, 2003.

SMOLLEN, M.; KAFAAR, A. Electroosmotically Enhanced Sludge Dewatering: Pilot-Plant Study. Water Science Technology – IAWQ. v.30, n.8, 1994.

SOUSA,S.R.; OLIVEIRA, K.F.; SOUZA, C.S.; KILLIKIAN, B.V.; LALUCE, C. Yeasted flotation viewed as the result of the interplay of supernatant composition and cell-wall hydrophobicity. Colloid and Surfaces B: Biointerfaces. Amsterdam: Elsevier B.V., v.29, 2003.

SOUZA FILHO, A.G. Caracterização e clarificação por sedimentação da água de lavagem de filtros rápidos de estações de tratamento de água que utiliza cloreto férrico como coagulante primário. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.

SWERTFEGER, J.; METZ, D.H.; DEMARCO, J.; BRAGHETTA, A.; JACANGELO, J.G. Effect of filter media on cyst and oocyst removal. Journal AWWA. v.91, n.9, 1999.

USEPA.Environmental Protection Agency. Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. Office of Water. E.U.A., 2012.

VALADE, M.T.; BECKER, W.C.; EDZWALD, J.K. Treatment Selection Guidelines for Particle and NOM Removal, Journal of Wather Supply: Research and Technology – Aqua, 2009.

VENDITTI, R.A. A simple flotation deinking experiment for the recycling of paper. Journal of Chemical Education, v.81, n.5, 2004.

VESEY G.; SLADE J.S.; BYRNE M.; SHEPHERD K.; FRICKER C. R. A new method for the concentration of Cryptosporidium oocysts from water . J. Appl. Bacteriol, 1993.

WIDMER, G. et al. Structural and biochemical alterations in Giardia lambria cysts exposed to ozone. The Journal of Parasitology, v. 88, n. 6, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines for Drinking Water Quality. Cryptosporidium. EHC Cryptosporidium draft 2. 02 January, 2006.

XAGORARAKI, I.; HERRINGTON, G.W. Zeta potential dissolved organic carbon, and removal of Cryptosporidium oocysts by coagulation and sedimentation. Journal of Environmental Engineering – ASCE, v. 130, n. 12, 2004.

XIAO,L.; FAYER,R. Molecular characterisation of species and genotypes of Cryptosporidium and Giardia and assessment of zoonotic transmission. International Journal for Parasitology, v. 38, n. 11, 2008.

YOON, S.Y.; DENG, Y.L. Flocculation and reflocculation of clay suspension by different polymer systems under turbulent conditions. Journal Colloid and Interface Science, 2004.

ZARLENGA, D.S.; TROUT, J.M. Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites. Veterinary Parasitology. 126, 2004.

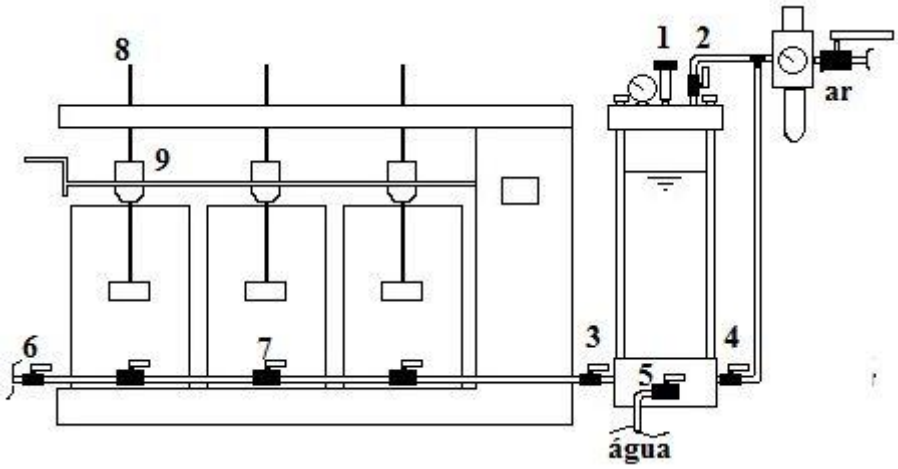
ZHANG, T.; XIE, X.; HU, H.; SONG, Y.; WU, Q.; ZONG, Z. Improvement of detection method of *Cryptosporidium* and *Giardia* in reclaimed water. Front. Environ. Sci. Engin. China, 2008.

ZILBERMAN, A.; ZIMMELS, Y.; STAROSVETSKY, J.; ZUCKERMAN, U.; ARMON, R. A Two-Phase Separation Method for Recovery of *Cryptosporidium* Oocysts from Soil Samples.Water Air Soil Pollut, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Protocolo do ensaio de tratabilidade realizado

A Figura A1 apresenta o esquema do equipamento utilizado.



1- Válvula de alívio
2- Válvula mantenedora de ar
3- Válvula de água saturada
4- Válvula de saturação
5- Válvula de água
6- Válvula de dreno
7- Válvula de entrada do jarro
8- Pás giratórias
9- Copos para dosagens químicas

Figura A1 – Esquema do floteste

O protocolo seguido nos ensaios é descrito a seguir:

1- Abrir a válvula de alívio (1) e fechar todas as outras;
2- Abrir a água (5) e encher até a marcação (cerca de 8cm abaixo da tampa);
3- Fechar a válvula de alívio (1);
4- Abrir o registro de ar, regular o manômetro a 5bar;
5- Abrir cuidadosamente a válvula de saturação (4);

6- Abrir cuidadosamente a válvula de alívio (1) até saírem bolhas e o manômetro marcar 5bar;

7- Esperar 10 minutos para saturação;

8- Fechar a válvula de alívio (1);

9- Fechar a válvula de saturação (4);

10- Abrir a válvula mantenedora de ar (2);

11- Colocar cerca de 500mL da água de estudo em cada jarro;

12- Remover as bolhas no fundo inclinando os jarros;

13- Completar os jarros com a água de estudo até a marcação;

14- Posicionar os jarros no floteste e baixar as pás;

15- Colocar as conexões de água saturada;

16- Fechar as válvulas de dreno (6) e de entradas dos jarros (7);

17- Abrir a válvula de água saturada (3);

18- Abrir e fechar a válvula de dreno rapidamente para descartar o ar presente na tubulação lançando um jato de água saturada;

19- Adicionar 5mL de PAC (10g/L) nos copos (9);

20- Programar o floteste com os seguintes parâmetros (número de segmentos: 3; rotação inicial - sp0: 200rpm; tempo inicial – T1: 30s; rotação 1 - sp1: 350rpm; tempo 2 – T2: 10s; rotação 2 - sp2: 350rpm; tempo 3 - T3: 5s ; rotação 3 - sp3: 66rpm);

21- Deixar um frasco com água destilada e cronômetro próximo, iniciar a programação do ensaio;

22- Dosar PAC quando a rotação das pás atingir 350rpm baixando a haste e fazer 3 lavagens rápidas com água destilada;

23- Ligar o cronômetro quando a rotação reduzir para 66 rpm;

24- Esperar 4 min para a floculação;

25- Desligar o floteste, subir as pás e imediatamente abrir as válvulas de entrada dos jarros (7) e fechar quando o nível subir até a marcação de 5% de recirculação;

26- Esperar 10 minutos e

27- Realizar a coleta de água clarificada e lodo.

APÊNDICE B – Protocolo de Floculação em carbonato de cálcio

Para cada água/resíduo estudado, foram utilizados os volumes de reagentes de acordo com a Tabela 1B:

Tabela 1B: Volume de reagentes, em mL, utilizados para cada água/resíduo no método de FCC

Amostra	Dosagem de NaOH 5M (mL)	Dosagem de Cloreto de cálcio 1M (mL)	Dosagem de Bicarbonato de sódio 1M (mL)	Dosagem de Ácido sulfâmico 10% (mL)
Água de estudo (1L)	1,5	10	10	20
Água clarificada (1L)	1,8	10	10	20
Lodo flotado (1,3L)	2,3	13	13	26
Água de lavagem (0,3L)	0,5	3	3	6
Água filtrada (1L)	2,2	10	10	20

A seguir, os passos dos procedimentos realizados:

1- A amostra é inoculada e armazenada em béquer previamente higienizado e umedecido com *Tween 80* a 0,1%, posteriormente a amostra é homogeneizada em agitador magnético;
2- Ainda sob agitação, adicionar cloreto de cálcio 1M observando dosagem específica (Tabela 1B);
3- Analogamente, adicionar bicarbonato de sódio 1M;
4- Esperar 10 minutos sob agitação;
5- Adicionar hidróxido de sódio 5M;
6- Agitar por 5 minutos;
7- Desligar o agitador e esperar no mínimo 4 horas;
8- Utilizando uma mangueira de borracha previamente higienizada e umedecida com *Tween 80* a 0,1%, aspirar por sifonamento (aspirando inicialmente com uma seringa) o sobrenadante da amostra e descartá-lo;
9- Homogeneizar a amostra em agitador magnético;
10- Adicionar ácido sulfâmico 10%;
11- Agitar por 5 minutos;
12- Transferir o conteúdo para os tubos de centrífuga, previamente higienizados e umedecidos com *Tween 80* a 0,1%;

13- Fazer sucessivos enxagues com *Tween 80* a 0,1% e também transferir o conteúdo para os tubos de centrifuga;

14- Centrifugar a 1500G por 20 min;

15- Remover o sobrenadante dos tubos;

16- Transferir todos os *pellets* para um tubo único, fazendo enxagues com *Tween 80* a 0,1%;

17- Centrifugar a 1500G por 20 min;

18- Remover o sobrenadante até a marcação de 5mL do tubo;

19- Agitar o *pellet* em vórtex e com pipeta Pasteur;

20- Adicionar PBS até completar o tubo;

21- Centrifugar a 1500G por 20 min e

22- Remover o sobrenadante até 5mL para ensaios com IMS ou até 1mL para ensaios sem IMS.

APÊNDICE C – Protocolo de Purificação com IMS

Estando a amostra concentrada em 5mL e todos os materiais, vidrarias e demais utensílios higienizados e enxaguados com *Tween 80 a 0,1%,* os seguintes passos foram seguidos:

1- Transferir a amostra para o tubo de lado plano (TLP) e fazer 3 enxagues de 1,0mL de água Milli-Q;
2- Adicionar ao TLP 1,0mL de Solução tampão SL-A 10X;
3- Adicionar ao TLP 1,0mL de Solução tampão SL-B;
4- Agitar cuidadosamente em vortex os Dynabeads *Anti-Giardia* e adicionar 100µL ao TLP;
5- Agitar cuidadosamente em vortex os Dynabeads *Anti-Cryptosporidium* e adicionar 100µL ao TLP;
6- Fixar o(s) tubo(s) no mixer rotatório e agitar por 1 hora a 18rpm;
7- Preparar a solução diluída de tampão, utilizando uma parte de SL-A 10X para 9 partes de água Milli-Q, preparar 1,5mL dessa solução para cada TLP;
8- Após a agitação, acoplar o TLP no concentrador de partículas magnéticas 1 (MPC-1), realizar movimentos manuais de ângulo de 90º inclinando a extremidade da tampa do tubo para cima e para baixo por 2 min;
9- Descartar o conteúdo do tubo sem removê-lo do MPC-1 e estando com o lado plano voltado para cima;
10- Homogeneizar cuidadosamente a amostra no tubo e transferi-la para o microtubo de 1,5mL utilizando 3 enxagues de 0,4mL da solução tampão preparada e pipeta *Pasteur* de vidro de 230 nm;
11- Acoplar o microtubo no concentrador de partículas magnéticas 2 (MPC-2) e fazer movimentos manuais em ângulo de 180º por 1 minuto;
12- Descartar o material do microtubo utilizando a pipeta de vidro cuidadosamente para não tocar a ponta da pipeta no material aderido na parede do microtubo;
13- Remover o microtubo do MPC-2, adicionar 50µL de ácido clorídrico 0,1N procurando pingar no material aderido;
14- Homogeneizar a amostra em vórtex por aproximadamente 1,0 min e aguardar em repouso por 10 min;

15- Adicionar 5µL de hidróxido de sódio 1N na lâmina procurando espalhar por todo o poço;

16- Após decorrido o repouso, agitar novamente em vórtex e recolocar o microtubo no MPC-2;

17- Mover manualmente por cerca de 10s;

18- Remover o material não aderido na parede do microtubo e adicioná-lo no poço da lâmina sobre a base;

19- Repetir os passos 13 a 18 duas vezes, formando assim as segunda e terceira dissociações ácidas e

20- Esperar as amostras secarem e montar as lâminas para microscopia.

APÊNDICE D – Procedimentos utilizados para montagem das lâminas

Estando com os reagentes do *kit Merifluor®* em temperatura ambiente e com a amostra adicionada na lâmina e seca:

1- Adicionar 10µL de metanol no poço e esperar secar;

2- Preparar câmara escura encobrindo papel alumínio em placa de *Petri*;

3- Na ausência de luz, pingar uma gota do reagente de detecção (frasco de tampa azul), seguida de uma gota do contra corante (frasco de tampa verde);

4- Tampar a lâmina dentro da placa e aguardar 30 min;

5- Preparar a solução de lavagem (frasco branco de tampão 20X) diluindo com água Milli-Q na proporção de 1x20, preparar cerca de 300µL para cada poço;

6- Após o tempo de espera, retirar a lâmina da placa, incliná-la cerca de 30º e realizar 3 lavagens com 50µL da solução preparada;

7- Recolocar a lâmina na placa e pingar 3 gotas de DAPI (*Fluoroshield*™);

8- Tampar novamente a placa e aguardar 10 min;

9- Após o tempo de espera, retirar a lâmina da placa, incliná-la cerca de 30º e realizar 3 lavagens com 50µL da solução preparada;

10- Pingar uma gota do meio de montagem (frasco de tampa cinza) e em seguida colocar a lamínula com cuidado para evitar a formação de bolhas;

11- Nas bordas da lamínula aplicar selante (*CoverSlip®*) e

12- Armazenar a lâmina preparada na câmera escura e em refrigeração até a leitura dos poços.

ANEXOS

ANEXO A – Informações técnicas do PAC utilizado

LAUDO TECNICO DE ANALISE NR. 76.756-1

Produto: POLICLORETO DE ALUMINIO

Fabricação: 25/06/2014 Validade: 12 meses Identificação (Lote): A-59509

ENSAIO REALIZADO	RESULTADO	ME	ESPECIFICAÇÃO
Aspecto	OK	ME-052	Líquido amarelo a castanho
Densidade (g/ml)	1,375	ME Form	=FAIXA(1,3000;1,5000)
Teor de Al2O3 (%)	17,56	ME Form	=FAIXA(14,00;20,00)

OBSERVAÇÕES

Cliente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Informações Adicionais:

Obs 1: Este laudo técnico foi emitido eletronicamente, e é válido sem assinatura.
2: Este laudo técnico perde seu valor, por quaisquer alterações nele feitas.
3: O produto possui validade especificada, se mantido sob condições ideais.

Josiane

Responsável
Eng. Josiane da Silva
CRQ 133 01 919

ANEXO B – Informações sobre as suspensões de protozoários utilizadas

Product Specification and Analysis Report
Cryptosporidium parvum

Product: Suspension of Oocysts of Cryptosporidium parvum, Iowa isolate, for use in research.

Source of the oocysts: Experimentally infected calves.

Species/genus identification method(s): Direct immunofluorescence microscopy with genus-specific monoclonal antibodies; also phase microscopy.

Lot #: 10-15	Date shed: 5/8/15
Total number of oocysts provided: 1×10^6	Date purified: 5/10/15

Total volume:

✓ 4 mL O 8 mL O other:

Storage solution:

✓ PBS with penicillin, streptomycin, gentamicin, Amphotericin B, 0.01% Tween 20

O 5% Formalin/PBS & 0.01% Tween 20

O other:

Purification method(s): Oocysts are purified from feces by sucrose and Percoll density gradient centrifugation, after initial extraction of feces with diethyl ether.

Quantitation Method: Neubauer hemacytometer counting, using red blood cell method.

Storage Conditions: 4 to 6 degrees Celcius (i.e. refrigerator temperature)

Expiration date: The shelf life of live C. parvum oocysts is guaranteed up to 2 months after the date of shipment; however, viability and useful life of oocysts for research may continue for a much longer period provided oocysts are stored at refrigerator (4-8 deg. C) temperatures in the presence of antibiotics, including Amphotericin B as fungicide (0.25 ug per ml). Formalinized oocysts are guaranteed for 6 months after date of receipt.

The organisms enclosed in this package are infectious to humans and animals by oral ingestion. The safe handling and disposal of the contents of this package are the responsibility of the recipient.

ANEXO C – Informações sobre o kit AccuSpyke®

AccuSpike-IR Product Specification and Analysis Report

Product: 1.5 mL polypropylene vial containing 100 each, counted by flow-cytometry cell sorting, of *Giardia lamblia, H3 isolate, cysts and Cryptosporidium parvum, Iowa isolate, oocysts suspended in* 0.75 mL of a de-ionized water/0.01% Tween 20 solution. AccuSpike-IR is designed for percent recovery determination with matrix (environmental) and reagent water samples by US EPA Methods 1622 and 1623.

Species/genus identification method: Direct immunofluorescence microscopy with genus-specific monoclonal antibodies; also phase microscopy.

Purification method: Cysts and oocysts are purified from feces by sucrose and Percoll density gradient centrifugation.

Quantitation method: Cells enumerated using flow cytometry.

Storage Conditions: 4 C. DO NOT FREEZE.

Inactivation/Sterilization: Gamma irradiation.

Lot# 85
Preparation: 9/16/2014
Expiration: 12/09/2014 for *Giardia* & *Cryptosporidium* analysis
Expiration: 01/06/2015 for *Cryptosporidium* analysis ONLY

Calibration Data

Test:	**Spike Preparation**	**Spike Preparation**
Organism:	*Cryptosporidium*	*Giardia*
Source of Organism:	Experimentally infected mice.	Experimentally infected gerbils.
Organism strain:	CpAZ	H3
Stock suspension lot number:	91114-63	140911
Date cells collected by source:	9/11/14	9/11/14
Date of initial calibration:	9/15/14	9/15/14
Age of cells (in days):	4	4
Storage media:	De-ionized Water/0.01% Tween 20	De-ionized Water/0.01% Tween 20
Storage temperature:	4 C	4 C
Viability (PI) before Irradiation	99.8%	99.8%
Mean of the counts:	99.90	100.60
Standard deviation of the counts:	1.70	1.60
Relative standard deviation:	1.70	1.60

Notes from Sorting Facility:
(1) Mean, standard deviation and relative standard deviation are calculated from a minimum of 12 calibration verification samples per set of 10 standards.
(2) Parasites are evaluated for general quality and intactness under DIC microscopy prior to use.

ANEXO D – Informações sobre o kit Easyseed™

EasySeed™

Certificate of Analysis

Batch Number: B 547

General

Safety:	This product is non-hazardous.
Storage:	2-8°C. Do not freeze.
Catalogue Number:	ESCG100
Preparation Date:	10 September 2015
Expiration Date:	8 January 2016
Volume:	1.274 ml +/- 21 ul
Suspension media:	Buffered saline solution.
Sterilisation method:	Gamma irradiation.

Counts
(Method Ref: ESCG-001)

	Mean	St.Dev.
***Cryptosporidium* count:**	**99**	**1.4**
***Giardia* count:**	**99**	**1.5**

DAPI staining:

***Cryptosporidium* % +ve**	**100**	**%**
***Giardia* % +ve**	**100**	**%**

Stock specifics

Organism:	*Cryptosporidium parvum*
Strain:	Iowa
Source:	Bovine
Shed date:	22 August 2015
Purification method:	Discontinuous sucrose and cesium chloride centrifugation gradients.

Organism:	*Giardia lamblia*
Strain:	H3
Source:	Gerbil
Shed date:	27 August 2015
Purification method:	Sucrose and Percoll density gradient centrifugation

ANEXO E – Orçamentos dos reagentes utilizados para análises de protozoários

Lab-Research do Brasil Com. de Produtos P/ Pesquisa Ltda.
CNPJ: 07.912.701/0001-46
Av. Itaberaba , 2052 – Sala 11 – Freguesia do Ó
São Paulo – SP CEP – 02739000
Fone: 11-3991-9033 11-3854-8865 - Fax 3976-7157
E-mail: labresearch@labresearch.com.br

DATA	COTAÇÃO Nº	VALIDADE	PAGAMENTO	PEDIDO Nº	ENTREGA	REPRESENTANTE
05/10/2015	2286-15	----	Á VISTA	------	45 a 60 dias	Samanta Costa

FORMAS DE PAGAMENTOS : Banco Bradesco: Ag. 1756-6 C/C 31.998-8 – **Banco do Brasil** Ag. 6844-6 C/C 1453-2
Banco Santander: Ag. 3372 C/C 130051500 ou **CARTÃO DE CREDITO**

Registro na Anvisa Nº 25351.566930/2014-58

Devido a instabilidade econômica atual, principalmente no que tange ao valor do dólar nossas propostas estão valida para compra imediata.

DADOS DO CLIENTE	LOCAL DE ENTREGA
Lyda Patricia Sabogal Paz Profª. Drª. do Departamento de Hidráulica e Saneamento Escola de Engenharia de São Carlos Universidade de São Paulo, Brasil. Tel: (55) (16) 33739548 Fax: (55) (16) 33739550	

Item	Qt	Embalagem	Código	Descrição	Preço Unit (R$)	Valor Total (R$)
01	2	50 Determinations	250050	MERIFLUOR® Cryptosporidium/Giardia Marca: MERIDIAN	4.987,00	9.974,00
					VALOR DOS PRODUTOS (R$)	9.974,00
					FRETE (R$)	0,00
					VALOR TOTAL DA PROPOSTA (R$)	9.974,00

DIAGNÓSTICA

São Paulo, 05 de Outubro de 2015.

PROPOSTA 007-2015

A
Escola de Engenharia de São Carlos
Universidade de São Paulo
A/C: Sra. Lyda Patricia Sabogal Paz
Profª. Drª. do Departamento de Hidráulica e Saneamento
Tel: (55) (16) 33739548 / Fax: (55) (16) 33739550
E-mail: lysaboga@gmail.com

ITEM	CAT.	DESCRIÇÃO	QTDE.	PREÇO UNIT.	PREÇO TOTAL
01	250050	**Merifluor Cryptosporidium/Giardia –** 50 ensaios Kit de imunofluorescência direta para a detecção simultânea de oocistos do *Cryptosporidium spp* e cistos de *Giardia spp*. Utiliza anticorpos monoclonais para aumentar a sensibilidade. O procedimento todo leva uma hora e meia. O kit contem 25 lâminas com 3 cavidades por lâmina. **Marca: Meridian Bioscience**	**02 KIT**	**R$ 5.250,00** (Cinco mil, Duzentos e Cinquenta Reais)	**R$ 10.500,00** (Dez mil e Quinhentos Reais)

Sovereign Com. de Prod.
para Laboratório Ltda

Vossa Referência: A/C Profª Lyda Patrícia
Válido desde 28.05.2015 até 07.06.2015

Item	Referência	Quantidade	Preço Unit	Preço S/IPI Tot
10	**IDEX73012** **DYNABEADS GC COMBO 5ML**	1 x 50 unid.	1 x 10.366,50	**10.366,50**

SANBIO CIENTIFICA LTDA. FUNC: 0008
AV. MAURO KREPSKI 107
JARDIM YPE – PAULINIA – SP – CEP: 13140-542
TEL: (0XX19) 3884-1293 FAX: (0XX19) 3884-1293 CNPJ: 11.326.087/0001-08
IE: 513.468.358-113

05/10/15 ORÇAMENTO # 00**6919** MR. MANAGER GOLD

IQSC-INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS – 00010
AV. TRAB. SÃO-CARLENSE 400
PARQ ARNOLD SCHMIDT – SÃO CARLOS – SP – CEP: 13566-590
TEL: (0XX16) 3373-9646

DESCRIÇÃO DO PRODUTO
CÓDIGO QUANTIDADE UNIDADE $ UNITÁRIO SUB-TOTAL

---

01) MERIFLUOR CRYPTOSPORIDIUM/GIARDIA KIT, 50 TESTS – MARCA: MERIDIAN
MERI-250050 2 KIT R$ 7.534,00 R$ 15.068,00

TOTAL GERAL ---> R$ 15.068,00

VENCIMENTO VALOR

PARA 015 DIAS R$ 15.068,00

FORMA DE ENTREGA: 45/60 DIAS DEVIDO IMPORTAÇÃO DOS USA

OBSERVAÇÕES: PROFª LYDA PATRICIA SABOGAL PAZ

VALIDADE DO ORÇAMENTO: 15/10/15

Gmail by Google

Lyda Patricia Sabogal Paz <lysaboga@gmail.com>

cotação

WMLabnet <wmlabnet@uol.com.br> 7 de dezembro de 2015 14:51
Para: Lyda Patricia Sabogal Paz <lysaboga@sc.usp.br>

Prezada Dra. Lyda,

boa tarde!

Segue a cotação solicitada:

EasySeed (ESCG100-PK/10)...R$ 4930,00

Kit Merifluor Crypto/Giardia. 50 testes (250050)...R$ 6800,00

Interprise®
Ciência é nossa prioridade

Av. Doutor Alexandre Martins Laroca, 20
Jd. América - Paulínia - SP - CEP: 13140-677
CNPJ: 14.813.834/0001-20 - I.E. 513.057.482.114
Fone: 19-3833-6800 - Fax: 19-3833 6801

Orçamento

Pag.: 1/ 1

Nº 0098853 13/10/2015

Cliente: 001660 - ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS - USP
LYDA PATRICIA SABOGAL PAZ
Endereço: AVENIDA TRABALHADOR SÃO CARLENSE, 400 - - CENTRO
SÃO CARLOS, SP - CEP 13566-590
CNPJ: 63.025.530/0028-24 IE: ISENTO
Fone: 16 3373-9259 Fax: 3373-9560
A/C:

Validade da Proposta: 10 dias Forma de Pagamento: 15 DIAS Moeda: REAL Frete: CIF

Item	Cod. Produto	Descrição	UN	Quantidade	Unitário	Venda
1	0039675	MERI-250050	KIT	2,000	8.450,00	16.900,00

KIT MERIFLUOR CRYPTOSPORIDIUM/GIARDIA - 50 TESTES - Marca: MERIDIAN BIOSCIENCE - NCM: 2942.00.00 - Entrega em até: 45 dias

Valor total do orçamento: R$ 16.900,00

29/05/2015 Gmail - cotação

Lyda Patricia Sabogal Paz <lysaboga@gmail.com>

cotação

WMLabnet <wmlabnet@uol.com.br> 29 de maio de 2015 17:37
Para: lysaboga@sc.usp.br

Prezada Profa. Lyda,

boa tarde!

Em resposta à sua solicitação segue a cotação:

DYNABEADS GC COMBO 5ml, 50 testes (73012)...R$ 23760,00

DYNABEADS GC COMBO 1ml, 10 testes (73012)...R$ 7530,00

Meridian Bioscience™ MeriFluor™ Cryptosporidium/Giardia Test Kit (250050)

1 unidade: R$ 6200,00

2 unidades: R$ 11960,00

29/05/2015 Gmail - Fw: Cotação kit IMS e kit Merifluor

Lyda Patricia Sabogal Paz <lysaboga@gmail.com>

Fw: Cotação kit IMS e kit Merifluor

Luiz Antonio Daniel <ldaniel@sc.usp.br> 29 de maio de 2015 15:42
Para: Lyda Patricia Sabogal Paz <lysaboga@sc.usp.br>

From: Tavares, Emerson
Sent: Monday, May 11, 2015 3:11 PM
To: Luiz Antonio Daniel
Subject: RE: Cotação kit IMS e kit Merifluor

PRezado Luiz

Obrigado pelo retorno, segue valor:

PN	Descrição	Apresentação	Preço (R$)	Prazo de Entrega
73012	DYNABEADS© GC-COMBO, 5ML	5 ml	R$ 11,170.00	30 dias úteis

LIFE TECH BRASIL COM IND PROD BIO LTDA — CNPJ: 63.067.904/0005-88 — IE: 373.054.920.113

AV. PORTUGAL, 1100 - ITAQUI — ITAPEVI - SP — CEP: 06696060

Tel: 1150709600 / 1150691000 Fax: 11 2730-3009 — www.lifetechnologies.com — PAG: 001

São Paulo, 01 de Junho de 2015 — A/C: LYDA PATRICIA - DEPTO: - — **ORÇAMENTO Nº 098298**

CLIENTE : M002AY-01 - ESCOLA DE ENGENHARIA DE SAO CARLOS — **CGC:** . . / - — **IE:**

ENDEREÇO : - — **COMP:**

BAIRRO : — **CIDADE :** SAO CARLOS — **UF:** SP — **CEP:** -

VENDEDOR : EMERSON — **DDD :** — **TELEFONE :** 0 - RAMAL:PROS

IT	PRODUTO	DESCRIÇÃO	DOSAGEM	PERIGOSO	BIOSTOCK	MARCA	ENTREG.	QTD.	LOTE	VALIDADE	LOCALIZ.	COMPRA	VLR UNIT.	IPI	TOTAL
01	73012	DYNABEADS® GC-COMBO, 5ML	5ML	NÃO	NÃO	APPLIED		1.00					11.217,00	0,00	11.217,00

VALOR TOTAL S/ IPI:	11.217,00
VALOR IMPOSTO(IPI):	0,00
VALOR TOTAL C/ IPI:	11.217,00

Condições Comerciais

Condição de Pagamento:		Seguro:	0,00	Frete:	0,00	Despesas:	0,00
Validade da Proposta(em Dias) :		30 Dias		PO#:		Nº Ord. Primes:	
Peso Liquido:	0,00	Peso Bruto	0,00	Espécie:		Qtde. Volumes:	0

Comentários ou Instruções

COTACAO EM REAIS / FRETE INCLUSO
ENTREGA 30 DIAS UTEIS APOS A CONFIRMACAO DO PEDIDO
ESTOQUE SUJEITO A CONFERENCIA ATE O FINAL DO DIA.
NAO COMPRAR ESSE PRODUTO SE A FINALIDADE FOR TESTE EM AGUA E COMID
D1 ALI
MSG NF1: ATENCAO!!!
MSG NF2: Nao comprar esse produto se a finalidade for teste em agua e comid

Local de Entrega

Cadastro: 01/06/2015 — Usuario: Aline Santos de Lima

CMS INSTRUMENTOS ANALITICOS LTDA
CNPJ: 02.493.897/0001-68 / IE: 276.026.280.118
Rua Willian Neuman,1.134 - Vila Kalil
Cosmópolis - SP / CEP. 13150-000
Fone / Fax: (19) 3882-2514 (19)3812-9222

Cosmópolis, 27 de Agosto de 2015

Cliente:		**ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS**	**Cotação: 27.08.4.15**		**Condições Comerciais**		
A/C:		PROFA. LYDA					
Fone:		**(16) 3373-9548**			**Pagto**		14 Dias
E-mail:		lysabogal@sc.usp.br			**Prazo Entrega**		60 Dias
Endereço:					**Validade**		10 Dias
Cidade:		**SÃO CARLOS - SP**			**Frete**		CIF
Item	**Marca/Código**	**Descrição de produto**	**Quant.**	**NCM**	**Preço Unit. (R$)**	**IPI (%)**	**Valor Total (R$)**
1	BTF ESCG100	EasySeed™ bx 10 units	1	3822.00.90	R$ 3.950,00		R$ 3.950,00
2	WATERBORNE	aguardando	1	3822.00.90			R$ 0,00
		Grata,			**TOTAL (R$)**		**3.950,00**

Priscila Porfirio
Depto - Vendas
Fone: (19)3812-9222 / Fax(19)3812-9222
e-mail: priscila.vendas@cmscientifica.com.br

SANBIO CIENTIFICA LTDA. FUNC: 0008
AV. MAURO KREPSKI 107
JARDIM YPE – PAULINIA – SP – CEP: 13140-542
TEL: (0XX19) 3884-1293 FAX: (0XX19) 3884-1293 CNPJ: 11.326.087/0001-08
IE: 513.468.358-113

19/08/15 ORÇAMENTO # 00**7507** MR. MANAGER GOLD

ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS – 00724
AVENIDA TRABALHADOR SANCARLENSE 400
CENTRO – SÃO CARLOS – SP – CEP: 13566-590
CNPJ: 63.025.530/0028-24 IE: ISENTO

DESCRIÇÃO DO PRODUTO CÓDIGO	QUANTIDADE UNIDADE	$ UNITÁRIO	SUB-TOTAL
01) EASYSEED - 10 KIT - MARCA: BTFBIO BTFB-ESCG100	1 KIT	R$ 4.043,00	R$ 4.043,00

TOTAL GERAL ---> R$ 4.043,00

VENCIMENTO	VALOR
PARA 015 DIAS	R$ 4.043,00

FORMA DE ENTREGA: 45/60 DIAS DEVIDO IMPORTAÇÃO DOS USA

OBSERVAÇÕES: SRA. LYDA PATRICIA SABOGAL PAZ

VALIDADE DO ORÇAMENTO: 31/08/15

Lab-Research do Brasil Com. de Produtos P/ Pesquisa Ltda.
CNPJ: 07.912.701/0001-46
Av. Itaberaba , 2052 – Sala 11 – Freguesia do Ó
São Paulo – SP CEP – 02739000
Fone: 11-3991-9033 11-3854-8865 - Fax 3976-7157
E-mail: labresearch@labresearch.com.br

DATA	COTAÇÃO Nº	VALIDADE	PAGAMENTO	PEDIDO Nº	ENTREGA	REPRESENTANTE
28/08/2015	1915-15	10 DIAS	Á VISTA	------	30 A 45 DIAS	Guilherme

FORMAS DE PAGAMENTOS : Banco Bradesco: Ag. 1756-6 C/C 31.998-8 **– Banco do Brasil** Ag. 6844-6 C/C 1453-2
Banco Santander: Ag. 3372 C/C 130051500 ou **CARTÃO DE CREDITO**

DADOS DO CLIENTE	LOCAL DE ENTREGA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS CNPJ: 46.068.425/0001-33 I.E.: ISENTO UNICAMP ZEFERINO VAZ, SN - BARÃO GERALDO. CAMPINAS – SP - 13083-97	

Item	Qt	Embalagem	Código	Descrição	Preço Unit (R$)	Valor Total (R$)
1	1	PK/10	ESCG100	ESCG100-10/PK - BTFBIO EasySeed™	4.023,00	4.023,00
2	1	12 vials	PACIR12	PACIR12 - WATERBORNE AccuSpike-IR, 12 vials	5.395,00	5.395,00
					VALOR DOS PRODUTOS (R$)	9.418,00
					FRETE (R$)	0,00
					VALOR TOTAL DA PROPOSTA (R$)	9.418,00

Interprise®
Ciência é nossa prioridade

Av. Doutor Alexandre Martins Laroca, 20
Jd. América - Paulínia - SP - CEP: 13140-677
CNPJ: 72.949.449/0001-01 - I.E. 513.026.267.114
Fone: 19-3833-6800 - Fax: 19-3833 6801

Pag.: 1/ 1

Orçamento

Nº 0097647 21/08/2015

Cliente: 001660 - ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS - USP
LYDA PATRICIA SABOGAL PAZ
Endereço: AVENIDA TRABALHADOR SÃO CARLENSE, 400 - - CENTRO
SÃO CARLOS, SP - CEP 13566-590
CNPJ: 63.025.530/0028-24 IE: ISENTO
Fone: 16 3373-9259 Fax: 3373-9560
A/C:

Validade da Proposta: 10 dias Forma de Pagamento: 15 DIAS Moeda: REAL Frete: CIF

Item	Cod. Produto	Descrição	UN	Quantidade	Unitário	Venda
1	0009379	BTF-ESCG100-10UN EASYSEED CG 100 - CX/10 VIALS - Marca: BTF BIO - NCM: 2942.00.00 - Entrega em até: 45 dias	PÇ	1,000	4.503,00	4.503,00
2	0119395	WATE-PACIR12 GIARDIA E CRYPTOSPORIDIUM EM SOLUÇÃO - 12 VIALS - Marca: WATERBORNE - Entrega em até: 45 dias	CX	1,000	5.497,00	5.497,00

Valor total do orçamento: R$ 10.000,00