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

GUILHERME LELIS GIGLIO

**Avaliação de Diversos Métodos de Detecção de Cistos de
Giardia spp. e Oocistos de *Cryptosporidium parvum* Presentes
no Resíduo Gerado Após o Tratamento de Água de
Abastecimento com Turbidez Elevada**

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos – SP
2015

Página intencionalmente deixada em branco.

GUILHERME LELIS GIGLIO

**Avaliação de Diversos Métodos de Detecção de Cistos de
Giardia spp. e Oocistos de *Cryptosporidium parvum* Presentes
no Resíduo Gerado Após o Tratamento de Água de
Abastecimento com Turbidez Elevada**

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

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Lyda Patricia Sabogal Paz

São Carlos – SP
2015

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

G459a Giglio, Guilherme Lelis
Avaliação de diversos métodos de detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium parvum* presentes no resíduo gerado após o tratamento de água de abastecimento com turbidez elevada / Guilherme Lelis Giglio; orientadora Lyda Patricia Sabogal Paz. São Carlos, 2015.

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, 2015.

1. Protozoário. 2. *Giardia*. 3. *Cryptosporidium*. 4. Jarteste. 5. Resíduo de Tratamento de Água. 6. Cloreto de Polialumínio. 7. Separação Imunomagnética. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **GUILHERME LELIS GIGLIO.**

Título da dissertação: "Avaliação de diversos métodos de detecção de cistos de *Giardia* spp. e Oocistos de *Cryptosporidium parvum* presentes no resíduo gerado após o tratamento de água de abastecimentos com turbidez elevada".

Data da defesa: 24/08/2015

Comissão Julgadora:

Resultado:

Profa. Dra. **Lyda Patrícia 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. **José Roberto Guimarães**
(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

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 **Paulo César Lima Segantine**

Página intencionalmente deixada em branco.

“Mantenha seus pensamentos positivos, porque seus pensamentos tornam-se suas palavras. Mantenha suas palavras positivas, porque suas palavras tornam-se suas atitudes. Mantenha suas atitudes positivas, porque suas atitudes tornam-se seus hábitos. Mantenha seus hábitos positivos, porque seus hábitos tornam-se seus valores. Mantenha seus valores positivos, porque seus valores... tornam-se seu destino.”

Mahatma Gandhi

Página intencionalmente deixada em branco.

Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz e Leonice, ao meu irmão Vinícius e à minha namorada Anne, pelo incansável apoio e incentivo.

Página intencionalmente deixada em branco.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre ter me proporcionado uma vida saudável, repleta de alegrias e constante aprendizado.

À minha família, em especial meus pais, Leonice e Luiz, que são meu alicerce e eterna fonte de inspiração. Agradeço o amor, carinho e conselhos compartilhados.

Ao meu irmão Vinícius, por ter me ensinado o verdadeiro significado das palavras amizade, companheirismo e fidelidade.

À minha segunda mãe Maria, pela bondade, sinceridade e compaixão.

À minha namorada Anne, pelo amor, companheirismo, colaboração e por compartilhar minhas dificuldades e felicidades. Sua presença é minha alegria e paz.

À professora e orientadora Lyda, pela amizade e por ser sempre solícita e atenciosa à pesquisa. Sua colaboração foi imprescindível na realização deste trabalho.

Agradeço aos amigos de infância de Mococa/SP: Duda, Mugode, Piper, Zé Armando, Dreibi, Gustin, Perri e tantos outros que puderam me proporcionar momentos agradáveis e inesquecíveis.

Agradeço aos amigos de Presidente Prudente por terem contribuído com o meu amadurecimento pessoal e profissional. Em especial, agradeço pela amizade duradoura dos amigos da República Na Madrugada: Osório, Murilo, Tangirina, Bubina, Provolone, Deni, Sid e Babora.

Agradeço aos amigos e companheiros do LATAR que me ajudaram em diversos momentos da pesquisa: Gabriela, Priscila, Eloá, Andressa, Char, Gabriel, Dayane, Fernando, entre outros. Em especial, agradeço ao Paulo (Pauleta) pela paciência e colaboração do início ao fim da pesquisa.

Obrigado pela amizade dos amigos conquistados em São Carlos: Seu Jorge, Alecrim, Lombardi, Vitória, Júlia, Zé, Dico, Davi, Bobo, Nay, Cebola, Nego, Loide, Txe, Carla, Karen, Kiemi, Marcão, Fran, Bia, Jéssica, Nath, entre tantos outros que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

Aos companheiros e ex-integrantes da República XB: Teta, Beldade e Quixera, que foram meus irmãos durante os mais de dois anos em São Carlos.

Aos parceiros de escrita da dissertação: Pauleta, Jorge, Dico e Júlia, que me deram apoio em várias madrugadas.

Agradeço os colegas e amigos Guilherme Vuitik e Dario, por colaborarem com os cálculos e resultados dos ensaios hidrodinâmicos.

Agradeço ao colega e amigo Cebola, por contribuir na análise estatística dos dados.

Agradeço também os técnicos de laboratório, em especial, a técnica Maria Teresa do LATAR pela ajuda no preparo de reagentes e pela conversa amiga no ambiente de trabalho; e ao técnico Júlio por contribuir com análises, sempre que necessário.

Agradeço às professoras doutoras Regina Maura e Luciana Urbano e ao técnico biólogo Nilson Branco pelo esclarecimento de dúvidas e pelo treinamento para análise de protozoários no laboratório do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Agradeço ao professor Reali, por ceder o laboratório LATAR para realização das atividades durante a pesquisa.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo suporte financeiro concedido no projeto temático nº 2012/50522-0 “Contaminação ambiental pelos protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. e por *Ascaris suum*: desafios de detecção, remoção e inativação das formas infectantes”.

Agradeço à Quimisa S/A, por genuinamente fornecer o coagulante cloreto de polialumínio (PAC) para realização desta pesquisa.

Página intencionalmente deixada em branco.

RESUMO

GIGLIO, G. L. (2015). **Avaliação de Diversos Métodos de Detecção de Cistos de *Giardia* spp. e Oocistos de *Cryptosporidium parvum* Presentes no Resíduo Gerado Após o Tratamento de Água de Abastecimento com Turbidez Elevada.** Dissertação (Mestrado). 252f. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Este trabalho teve como objetivo avaliar diversos métodos de detecção e recuperação de cistos de *Giardia* spp. e de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em resíduos gerados no tratamento de águas de abastecimento com turbidez elevada tendo como padrão o Método 1623.1 da USEPA (2012). Para tanto, ensaios utilizando aparelho Jarteste (coagulação, floculação, decantação e filtração) foram realizados utilizando o coagulante cloreto de polialumínio – PAC. Em todos os métodos avaliados foi utilizada a técnica de purificação por separação imunomagnética – IMS. A adaptação do método floculação em carbonato de cálcio – FCCa elaborado por Vesey *et al.* (1993) e adaptado por Feng *et al.* (2011), repercutiu nos melhores resultados para a amostra de resíduo sedimentado, com recuperações de $68 \pm 17\%$ para oocisto de *C. parvum* e de $42 \pm 7\%$ para cisto de *Giardia* spp. Entretanto, as recuperações para a amostra de água de lavagem dos filtros – ALF foram inferiores à 1%, não sendo possível determinar um método adequado. A presença dos patógenos indica que o reuso da ALF em ETA convencionais ou o descarte em mananciais sem um tratamento prévio, pode representar problemas de contaminação. A adaptação dos métodos de Boni de Oliveira (2012) e Keegan *et al.* (2008), também repercutiram em porcentagens de recuperação expressivas para a amostra de resíduo sedimentado, sendo de: $41 \pm 35\%$ para oocisto de *C. parvum* e $11 \pm 70\%$ para cisto de *Giardia* spp., e $38 \pm 26\%$ para oocisto de *C. parvum* e $26 \pm 13\%$ para cisto de *Giardia* spp., respectivamente. A análise estatística não resultou em diferença significativa entre estes dois métodos, entretanto, as elevadas recuperações indicam que estes métodos podem ser melhor avaliados em pesquisas futuras.

Palavras-chave: protozoário; *Giardia* spp.; *Cryptosporidium parvum*; jarteste; resíduo de tratamento de água; cloreto de polialumínio – PAC; separação imunomagnética – IMS.

ABSTRACT

GIGLIO, G. L. (2015). **Evaluation of Several Methods for the detection of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Wastes Produced After High-Turbidity Water Treatment.** Dissertação (Mestrado). 252f. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

This dissertation addresses the evaluation of several methods for the detection of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts in wastes produced after a high-turbidity water treatment, according to Method 1623.1 from USEPA (2012). Coagulant polyaluminium chloride – PACl was used in jar test experiments (coagulation/flocculation, sedimentation and filtration). The Immunomagnetic Separation – IMS technique was applied to all methods. The calcium carbonate flocculation (CCF) method, developed by Vesey *et al.* (1993) and adapted by Feng *et al.* (2011), was applied to sludge samples in this research and was the best method tested, with $68\% \pm 17\%$ and $42\% \pm 7,00\%$ recoveries for *C. parvum* oocysts and *Giardia* spp. cysts, respectively. On the other hand, the percentage recovery of (oo)cysts for filter backwash water samples was lower than 1% and no suitable method could be detected. The presence of pathogens represents contamination risks for water sources and the reuse of filter backwash water may be a problem to conventional water treatment plants. The application of Boni de Oliveira (2012) and Keegan *et al.* (2008) methods, adjusted to this study, also resulted in significant percentage recoveries for the sludge samples, with $41 \pm 35\%$ for *C. parvum* oocyst and $11 \pm 70\%$ for cyst *Giardia* spp., and $38 \pm 26\%$ for oocyst *C. parvum* and $26 \pm 13\%$ for cyst *Giardia* spp., respectively. The statistical analysis showed no significant differences between the two methods, however, such high recoveries indicate they should be better evaluated in future research.

Keywords: protozoa; *Giardia* spp.; *Cryptosporidium parvum*; jar test; waste of water treatment; Polyaluminum Chloride – PACl; immunomagnetic separation – IMS.

Página intencionalmente deixada em branco.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Aparelho de Jarteste com <i>kit</i> de filtros de laboratório	68
Figura 3.2 - Análise visual de anomalias em curvas DTR: (a) se aproxima do escoamento tubular com curva posicionada corretamente; (b) aparecimento prematuro do traçador indicando canalização ou regiões de estagnação no reator; (c) recirculação do fluido do reator; (d) traçador aparece mais tarde do que esperado (possibilidade de erro de medição de vazão, erro no volume disponível ou o traçador não é inerte); (e) canalização por dois caminhos paralelos (Adaptado de Levenspiel (2000)).	70
Figura 4.1 - Itens utilizados no preparo da água de estudo com agitação mecanizada.	73
Figura 4.2 - Detalhes dos filtros de laboratório de areia (FLA).	76
Figura 4.3 - Procedimentos adotados na lavagem da areia antes de ser adicionada nos filtros... ..	77
Figura 4.4 - Adaptações nos jarros de Jarteste e nos filtros (FLA) visando controlar a taxa de filtração.	78
Figura 4.5 - Preparo dos filtros FLA para realização dos ensaios de tratabilidade em que era requerida a filtração.....	80
Figura 4.6 - Detalhes do ensaio hidrodinâmico.....	81
Figura 4.7 - Separação das amostras após ensaio de tratabilidade.	85
Figura 4.8 - Amostras geradas no jarteste. Da esquerda para a direita: resíduo sedimentado, ALF, sobrenadante ao resíduo (2 béqueres) e água filtrada.	86
Figura 4.9 - Análise de sólidos sedimentáveis em cone <i>Imhoff</i> das amostras de resíduo sedimentado e ALF.	87
Figura 4.10 - Equipamentos e materiais utilizados para análise de sólidos totais.....	89
Figura 4.11 - Algumas etapas do Procedimento 01 - Determinação da concentração de protozoários em cepas para posterior inóculo.	93
Figura 4.12 - Esquema simplificado do procedimento de concentração de amostras contendo protozoários.....	99
Figura 4.13 - Seleção das amostras do Método 1.....	101
Figura 4.14 - Bomba de vácuo acoplada ao conjunto porta-filtro e membrana Millipore®.	102
Figura 4.15 - Eluição de membrana.	104
Figura 4.16 – Centrifugação das amostras e respectivos <i>pellets</i> finais.	106
Figura 4.17 - Esquema simplificado das etapas do procedimento de IMS.....	125
Figura 4.18 - <i>Kit Dynabeads® Invitrogen</i>	126
Figura 4.19 - Acessórios, equipamentos e procedimentos necessários à purificação por IMS.	127
Figura 4.20 - <i>Kit Merifluor®</i>	132

Figura 5.1 - Diagrama de coagulação para a água de estudo com turbidez próxima a 130 uT, em função da turbidez final, para dosagens de PAC entre 0 (zero) e 65 mg.L ⁻¹ nas seguintes condições: $G_{mr} = 1000 \text{ s}^{-1}$; $T_{mr} = 20 \text{ s}$; $G_f = 25 \text{ s}^{-1}$; $T_f = 20 \text{ min}$; e $V_s = 1,5 \text{ cm.min}^{-1}$.	144
Figura 5.2 - Otimização da mistura rápida – Turbidez remanescente em função das condições da aplicação de 25mg.L ⁻¹ de PAC, $G_{ml} = 20 \text{ s}^{-1}$ e $t_{ml} = 20 \text{ min}$. As velocidades de sedimentação foram de a) $V_s = 2,5 \text{ cm.min}^{-1}$; em b) $V_s = 2,0 \text{ cm.min}^{-1}$; e em c) $V_s = 1,5 \text{ cm.min}^{-1}$.	146
Figura 5.3 - Otimização da mistura lenta – Turbidez remanescente em função das condições da aplicação de 25 mg.L ⁻¹ de PAC. $G_{mr} = 1000 \text{ s}^{-1}$ e $t_{mr} = 10 \text{ s}$ em todos os gráficos sendo que as velocidades de sedimentação foram de a) $V_s = 2,5 \text{ cm.min}^{-1}$; em b) $V_s = 2,0 \text{ cm.min}^{-1}$; e em c) $V_s = 1,5 \text{ cm.min}^{-1}$.	147
Figura 5.4 - Otimização da velocidade de sedimentação – Turbidez remanescente em função das condições da aplicação de 25 mg.L ⁻¹ de PAC adotando $G_{mr} = 1000 \text{ s}^{-1}$; $t_{mr} = 10 \text{ s}$; $G_{ml} = 25 \text{ s}^{-1}$ e $t_{ml} = 30 \text{ min}$.	148
Figura 5.5 - Ensaio hidrodinâmico insatisfatório com 100 mg.mL ⁻¹ de concentração de sal e 4 min de ensaio.	151
Figura 5.6 - Ensaio hidrodinâmico satisfatório com 100 mg.mL ⁻¹ de concentração de sal e 10min de ensaio.	152
Figura 5.7 - Aplicação dos modelos hidrodinâmicos em função da curva DTR real	153
Figura 5.8 - Ajuste da curva DTR conforme modelo N-CSTR	153
Figura 5.9 - Aplicação dos modelos hidrodinâmicos em função da curva DTR ajustada	154
Figura 5.10 - Análise de sólidos sedimentáveis em cone <i>Imhoff</i> da amostra de lodo.	158
Figura 5.11 - Aglomerados de cistos de <i>Giardia lamblia</i> da cepa da Waterborne (>400x).	169
Figura 5.12 - Sete oocistos de <i>C. parvum</i> da cepa da Waterborne (200x).	170
Figura 5.13 - Aglomerado de (oo)cistos observado no controle positivo do <i>kit</i> Merifluor® (>400x).	171
Figura 5.14 - Diferença de concentração de (oo)cistos do controle positivo do <i>kit</i> Merifluor® (400x).	171
Figura 5.15 - Contagem de cistos de <i>Giardia</i> spp. (<200x)	172
Figura 5.16 - Aglomerados de oocistos de <i>Cryptosporidium parvum</i> na nova cepa da Waterborne (>400x).	172
Figura 5.17 – Aspectos do campo de microscópio e dificuldades da contagem do inóculo (100x).	176
Figura 5.18 - Dificuldades da contagem em decorrência da demora da confirmação dos (oo)cistos.	180
Figura 5.19 - Comparação entre a visualização de (oo)cistos em 200x e 400x.	181

Figura 5.20 - Elevada quantidade de microesferas <i>Dynabeads</i> ® Anti- <i>Giardia</i> e Anti- <i>Cryptosporidium</i> (400x).....	181
Figura 5.21 - Aglomerado recuperado no método 3 (>400x).....	182
Figura 5.22 - Sujidades nas amostras de sobrenadante ao resíduo sedimentado, ALF e resíduo sedimentado em diferentes métodos (400x).....	183
Figura 5.23 - Dificuldade na confirmação de cisto de <i>Giardia</i> spp. e oocisto de <i>Cryptosporidium parvum</i> no Método 13 (400x).....	184
Figura 5.24 - Confirmação de cisto de <i>Giardia</i> spp. no Método 20 e oocisto de <i>Cryptosporidium parvum</i> no Método 6 em microscopia de fluorescência DAPI e microscopia DIC (400x).....	185
Figura 5.25 – Aspecto de limpeza do poço no Método 19 (400x).	217
Figura 5.26 - 4 cistos de <i>Giardia</i> spp. facilmente visualizados no Método 20 (200x).....	219
Figura 5.27 - Médias de recuperação para oocistos de <i>Cryptosporidium parvum</i> . dos Métodos 15, 19 e 20. As médias representadas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo método de Tukey.....	224
Figura 5.28 - Médias de recuperação para cistos de <i>Giardia</i> spp. dos Métodos 15, 19 e 20. As médias representadas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo método de Tukey.	225

Página intencionalmente deixada em branco.

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Valores fixados nos sete ensaios preliminares.....	74
Tabela 4.2 - Definição das variáveis utilizadas no ensaio hidrodinâmico	83
Tabela 4.3 - Modelos hidrodinâmicos aplicados.....	83
Tabela 4.4 - Análises confirmatórias dos (oo)cistos em microscópio.....	136
Tabela 5.1 - Caracterização físico-química da água do poço da EESC/USP.....	139
Tabela 5.2 - Turbidez obtida após a adição de caulinita	139
Tabela 5.3 - Caracterização físico-química e microbiológica da água de estudo.....	140
Tabela 5.4 - Parâmetros utilizados nos ensaios preliminares	141
Tabela 5.5 - Características da água de estudo nos ensaios de tratabilidade iniciais	142
Tabela 5.6 - Parâmetros definidos após otimização do tratamento	148
Tabela 5.7 - Qualidade da água filtrada	149
Tabela 5.8 - Características físico-químicas e microbiológicas da água filtrada	149
Tabela 5.9 - Valores calculados, medidos e estabelecidos antes do início do ensaio hidrodinâmico	150
Tabela 5.10 - Parâmetros dos modelos ajustados.....	154
Tabela 5.11 - Análise do potencial zeta em relação ao pH de coagulação.....	156
Tabela 5.12 - Características do lodo de ETA (adaptado de De Julio, Santos e Oroski (2009))	157
Tabela 5.13 - Análise de sólidos totais.....	159
Tabela 5.14 - Análise de DQO	160
Tabela 5.15 - Turbidez e pH das amostras geradas no tratamento	161
Tabela 5.16 - Recuperações obtidas nos métodos avaliados.....	163
Tabela 5.17 - Comparação entre as dissociações ácidas em relação à contagem de (oo)cistos na amostra de resíduo sedimentado	166
Tabela 5.18 - Determinação de inóculo conforme contagem dos (oo)cistos em 5 µL das cepas	173
Tabela 5.19 - Volume de inóculo conforme volume utilizado na contagem dos (oo)cistos das cepas.....	174
Tabela 5.20 - Contagem do inóculo de (oo)cistos no Método 1	186
Tabela 5.21 - Recuperação de (oo)cistos do Método 1	186
Tabela 5.22 - Contagem do inóculo de (oo)cistos no Método 2	188
Tabela 5.23 - Recuperação de (oo)cistos do Método 2	188
Tabela 5.24 - Contagem do inóculo de (oo)cistos no Método 3	190
Tabela 5.25 - Recuperação de (oo)cistos do Método 3	190

Tabela 5.26 - Contagem do inóculo de (oo)cistos no Método 4	192
Tabela 5.27 - Recuperação de (oo)cistos do Método 4	192
Tabela 5.28 - Contagem do inóculo de (oo)cistos no Método 5	193
Tabela 5.29 - Recuperação de (oo)cistos do Método 5	194
Tabela 5.30 - Contagem do inóculo de (oo)cistos no Método 6	195
Tabela 5.31 - Recuperação de (oo)cistos do Método 6	195
Tabela 5.32 - Contagem dos inóculos de (oo)cistos no Método 7	197
Tabela 5.33 - Recuperação de (oo)cistos do Método 7	197
Tabela 5.34 - Contagem dos inóculos de (oo)cistos no Método 8	198
Tabela 5.35 - Recuperação de (oo)cistos do Método 8	199
Tabela 5.36 - Determinação dos inóculos de (oo)cistos no Método 9, 10, 11, 12 e 13.....	200
Tabela 5.37 - Recuperação de (oo)cistos do Método 9	200
Tabela 5.38 - Recuperação de (oo)cistos do Método 10	201
Tabela 5.39 - Recuperação de (oo)cistos do Método 11	202
Tabela 5.40 - Recuperação de (oo)cistos do Método 12	203
Tabela 5.41 - Recuperação de (oo)cistos do Método 13	204
Tabela 5.42 - Contagem dos inóculos de (oo)cistos na primeira repetição do Método 13	205
Tabela 5.43 - Recuperação de (oo)cistos na primeira repetição do Método 13	205
Tabela 5.44 - Contagem dos inóculos de (oo)cistos na segunda repetição do Método 13.....	206
Tabela 5.45 - Recuperação de (oo)cistos na segunda repetição do Método 13.....	207
Tabela 5.46 - Contagem dos inóculos de (oo)cistos na terceira repetição do Método 13	208
Tabela 5.47 - Recuperação de (oo)cistos na terceira repetição do Método 13.....	208
Tabela 5.48 - Contagem dos inóculos de (oo)cistos do Método 14	209
Tabela 5.49 - Recuperação de (oo)cistos no Método 14	210
Tabela 5.50 - Contagem dos inóculos de (oo)cistos do Método 15	211
Tabela 5.51 - Recuperação de (oo)cistos do Método 15 na amostra de resíduo sedimentado ..	212
Tabela 5.52 – Total de (oo)cistos recuperados no Método 15 na amostra de ALF.....	212
Tabela 5.53 - Recuperação de (oo)cistos na terceira repetição do Método 16.....	213
Tabela 5.54 - Recuperação de (oo)cistos no Método 17	214
Tabela 5.55 - Contagem dos inóculos de (oo)cistos do Método 18	215
Tabela 5.56 - Recuperação de (oo)cistos do Método 18	215
Tabela 5.57 - Contagem dos inóculos de (oo)cistos do Método 19 e 20.....	216
Tabela 5.58 - Recuperação de (oo)cistos do Método 19 na amostra de resíduo sedimentado ..	217
Tabela 5.59 - Recuperação de (oo)cistos do Método 20 na amostra de resíduo sedimentado ..	218
Tabela 5.60 - Coeficiente de variação da contagem de inóculo	220
Tabela 5.61 - Protocolos que atenderam aos padrões do Método 1623.1	222

Tabela 5.62 - Controle de qualidade do método da floculação em carbonato de cálcio (Métodos 15 e 13).....	226

Página intencionalmente deixada em branco.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALF – Água de lavagem dos filtros
ANOVA – Análise de variância (*Analysis of variance*)
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APHA – *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*
CSTR – *Continuous stirred-tank reactor*
DAPI – 4',6-diamino-2fenil-indol
DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio
DIC – Microscopia de contraste interferencial diferencial
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DPBS – Solução salina fosfato-tamponada Dulbecco
DQO – Demanda Química de Oxigênio
DTR – Distribuição do Tempo de Residência
EESC – Escola de Engenharia de São Carlos
ETA – Estação de Tratamento de Água
ETE – Estação de Tratamento de Esgoto
FCCa – Floculação em carbonato de cálcio
FITC – Isotiocianato de fluoresceína
FAD – Flotação por Ar Dissolvido
FLA – Filtro de Laboratório de Areia
FM – Fator de multiplicação
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
IMS – Separação imunomagnética
LATAR – Laboratório de Tratamento Avançado e Reúso de Água
MPC-1 – Concentrador de partículas magnéticas 1
MPC-S – Concentrador de partículas magnéticas 2
NaHMP – Hexametáfosfato de sódio
NBR – Norma brasileira
PAC – Cloreto de polialumínio
PBS – Solução salina de fosfato
PCR – Reação em cadeia de Polimerase
SEADE – Sistema Estadual de Análise de Dados

SHS – Departamento de Hidráulica e Saneamento

ST – Sólidos totais

SV – Sólidos voláteis

Ssed – Sólidos sedimentáveis

TLP – Tubo de lado plano

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

USEPA – Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos

USP – Universidade de São Paulo

UV – Ultra violeta

Página intencionalmente deixada em branco.

LISTA DE SÍMBOLOS

CaCl_2 – Cloreto de cálcio

CaCO_3 – Carbonato de cálcio

g – Força centrífuga

G_{ml} – Gradiente médio de mistura lenta

G_{mr} – Gradiente médio de mistura rápida

$\log_{10}$ – Logaritmo de base 10

NaCl – Cloreto de sódio

NaHCO_3 – Bicarbonato de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

pH – Potencial hidrogeniônico

Pt-Co – Unidade de cor

pZ – Potencial zeta

rpm – Rotação por minuto

T_{ml} – Tempo de mistura lenta

T_{mr} – Tempo de mistura rápida

uT – Unidade de turbidez (unidade nefolométrica de turbidez)

V_s – Velocidade de sedimentação

$^{\circ}\text{C}$ – Graus celsius

Página intencionalmente deixada em branco.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	35
2. OBJETIVOS.....	38
2.1. Objetivo Geral	38
2.2. Objetivos Específicos	38
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	39
3.1. Características dos Protozoários <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i>	39
3.1.1. <i>Giardia</i>	39
3.1.2. <i>Cryptosporidium</i>	41
3.1.3. Surtos de Giardiose e Criptosporidiose	43
3.1.4. Ocorrência de (Oo)cistos de <i>Giardia</i> e de <i>Cryptosporidium</i> no Brasil	45
3.1.5. Métodos de Detecção de (Oo)cistos de <i>Giardia</i> e de <i>Cryptosporidium</i>	46
3.2. Remoção de (Oo)cistos de <i>Giardia</i> e de <i>Cryptosporidium</i> por Processos que Envolvem o Tratamento de Água de Abastecimento	54
3.2.1. Coagulação e Floculação.....	55
3.2.2. Decantação	56
3.2.3. Filtração.....	57
3.2.4. Desinfecção	59
3.3. Preocupação Ambiental dos Resíduos de ETA	60
3.3.1. Características do Lodo	61
3.3.2. Características da Água de Lavagem dos Filtros	63
3.4. Aplicação do Cloreto de Polialumínio (PAC) Como Coagulante	65
3.5. Ensaio de Tratabilidade da Água	67
3.6. Ensaio Hidrodinâmico.....	68
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	71
4.1. Preparo da Água de Estudo	71
4.1.1. Captação, Armazenamento e Caracterização da Água do Poço.....	71
4.1.2. Determinação da Concentração de Caulinita	72

4.1.3.	Preparo da Água de Estudo Mediante Homogeneização Manual	72
4.1.4.	Preparo da Água de Estudo Mediante Homogeneização Mecânica	73
4.2.	Ensaio de Tratabilidade	74
4.2.1.	Diagrama de Coagulação	74
4.2.2.	Potencial Zeta.....	75
4.2.3.	Adequações nos Filtros de Laboratório Acoplados ao Jarteste	75
4.2.4.	Ensaio Hidrodinâmico.....	81
4.3.	Avaliação das Características dos Resíduos Gerados em Ensaio de Jarteste.....	84
4.3.1.	Seleção de Amostras Após Ensaio de Tratabilidade da Água de Estudo.....	84
4.3.2.	Sólidos Sedimentáveis em Cone <i>Imhoff</i>	86
4.3.3.	Sólidos Totais.....	88
4.3.4.	Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	89
4.4.	Teste, em Laboratório, de Diferentes Métodos de Detecção de (Oo)cistos de <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium parvum</i> nos Resíduos Gerados Após o Tratamento de Água com Turbidez Elevada.....	90
4.4.1.	Ensaio de Tratabilidade da Água de Estudo com Inóculo de Protozoários	90
4.4.2.	Inóculo de Protozoários.....	91
4.4.3.	Métodos de Detecção de Protozoários	97
4.4.3.1.	Método 1 – Filtração em Membranas Utilizando NaHMP como Eluidor e Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) nos 6 Jarros do Jarteste.....	98
4.4.3.2.	Método 2 – Filtração em Membranas Utilizando NaHMP como Eluidor, Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) nos 6 Jarros do Jarteste e Maior Volume de ALF Gerado	108
4.4.3.3.	Método 3 – Filtração em Membranas com Adaptações da Metodologia de Medeiros (2013) Utilizando <i>Tween</i> 80 como Eluidor e Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) em um Único Jarro.	109
4.4.3.4.	Método 4 – Filtração em Membranas com Adaptações da Metodologia de Medeiros (2013) Utilizando NaHMP como Eluidor com Inóculos do Controle Positivo do <i>Kit</i> Merifluor®.....	110
4.4.3.5.	Método 5 – Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) Direto na Amostra e Uso de <i>Tween</i> 80 para Desagregação dos Protozoários.....	111

4.4.3.6. Método 6 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) Direto nos TLPs e Uso de <i>Tween</i> 80 e <i>Extran</i>	112
4.4.3.7. Método 7 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e do Controle Positivo do <i>Kit</i> Merifluor® Diretamente nos TLPs com Uso de <i>Extran</i>	113
4.4.3.8. Método 8 – Filtração em Membranas com Adaptações do Método de Boni de Oliveira (2012) Utilizando <i>Extran</i> (sem Homogeneização em Mixer Rotatório) e Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro do Jarteste	114
4.4.3.9. Método 9 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste e Uso de <i>Extran</i>	115
4.4.3.10. Método 10 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro do Jarteste e Uso de ICN 7X	115
4.4.3.11. Método 11 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no TLP e Uso de <i>Extran</i>	116
4.4.3.12. Método 12 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no TLP e Uso de ICN 7X	117
4.4.3.13. Método 13 – Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro do Jarteste	117
4.4.3.14. Método 14 – Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste sem Descarte de Amostras	119
4.4.3.15. Método 15 – Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste Incluindo Análise de Protozoários na ALF.....	120
4.4.3.16. Método 16 – Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos de Suspensão Comercial (AccuSpike™ da Waterborne) no Jarro de Jarteste	120

4.4.3.17. Método 17 – Floculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos de Suspensão Comercial (AccuSpike™ da Waterborne) no Jarro de Jarteste sem Descarte de Amostra.....	121
4.4.3.18. Método 18 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste, Uso de ICN 7X e Incluindo a Concentração de Amostra	121
4.4.3.19. Método 19 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) Utilizando ICN 7X com Homogeneização por 1 Hora e Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste e Incluindo Concentração de Amostra	122
4.4.3.20. Método 20 – Adaptação do Método de Keegan <i>et al.</i> (2008) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste	122
4.4.4. Purificação Mediante Separação Imunomagnética (IMS).....	124
4.4.5. Preparo das Lâminas de Acordo com o <i>kit</i> Merifluor®	132
4.4.6. Identificação e Contagem de Protozoários Utilizando Microscopia de Imunofluorescência	135
4.5. Análise Estatística dos Métodos Mais Eficientes	137
4.6. Controle de Qualidade do Melhor Método.....	138
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	139
5.1. Preparo da Água de Estudo	139
5.2. Ensaio de Tratabilidade em Jarteste.....	141
5.2.1. Diagrama de Coagulação	141
5.2.2. Otimização dos Parâmetros de Tratamento.....	145
5.3. Ensaio Hidrodinâmico nos Filtros de Laboratório	150
5.4. Potencial Zeta.....	155
5.5. Análise dos Resíduos Sólidos.....	157
5.5.1. Sólidos Sedimentáveis em Cone <i>Imhoff</i>	158
5.5.2. Sólidos Totais.....	159
5.6. Análises Complementares	160
5.6.1. DQO	160

5.6.2. Turbidez e pH.....	161
5.7. Recuperação de Protozoários nos Métodos Testados.....	162
5.7.1. Interferentes dos Métodos de Detecção de Protozoários.....	168
5.7.1.1. Contagem do Inóculo	168
5.7.1.2. Ponto de Aplicação do Inóculo.....	176
5.7.1.3. Volume de <i>Pellet</i>	177
5.7.1.4. Validade dos <i>Kits Dynabeads</i> e das Cepas.....	178
5.7.1.5. Sujidades no Poço, Tempo de Visualização e Outras Interferências na Leitura em Microscópio.	179
5.7.2. Avaliação dos Métodos em Função da Recuperação de (Oo)cistos.....	185
5.7.2.1. Método 1 – Filtração em Membranas Utilizando NaHMP como Eluidor e Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) nos 6 Jarros do Jarteste.....	186
5.7.2.2. Método 2 – Filtração em Membranas Utilizando NaHMP como Eluidor, Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) nos 6 Jarros do Jarteste e Maior Volume de ALF Gerado	188
5.7.2.3. Método 3 – Filtração em Membranas com Adaptações da Metodologia de Medeiros (2013) Utilizando <i>Tween</i> 80 como Eluidor e Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) em um Único Jarro.	189
5.7.2.4. Método 4 – Filtração em Membranas com Adaptações da Metodologia de Medeiros (2013) Utilizando NaHMP como Eluidor com Inóculos do Controle Positivo do <i>Kit Merifluor®</i>	191
5.7.2.5. Método 5 – Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) Direto na Amostra e Uso de <i>Tween</i> 80 para Desagregação dos Protozoários.....	193
5.7.2.6. Método 6 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) Direto nos TLPs e Uso de <i>Tween</i> 80 e <i>Extran</i>	194
5.7.2.7. Método 7 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos da Waterborne e do Controle Positivo do <i>Kit Merifluor®</i> Diretamente nos TLPs com Uso de <i>Extran</i>	196
5.7.2.8. Método 8 – Filtração em Membranas Adaptado ao Método de Boni de Oliveira (2012) Utilizando <i>Extran</i> (sem Homogeneização em Mixer Rotatório) e Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste	198

5.7.2.9. Método 9 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste e Uso de <i>Extran</i>	200
5.7.2.10. Método 10 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos da Waterborne e da UNICAMP no Jarro do Jarteste e uso de ICN 7X.....	201
5.7.2.11. Método 11 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no TLP e Uso de <i>Extran</i>	202
5.7.2.12. Método 12 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no TLP e Uso de ICN 7X	203
5.7.2.13. Método 13 – Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste	204
5.7.2.13.1. Primeira Repetição do Método 13.....	205
5.7.2.13.2. Segunda Repetição do Método 13.....	206
5.7.2.13.3. Terceira Repetição do Método 13	207
5.7.2.14. Método 14 – Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste sem Descarte de Amostras	209
5.7.2.15. Método 15 – Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste Incluindo Análise de Protozoários na ALF.....	211
5.7.2.16. Método 16 – Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos de Suspensão Comercial (AccuSpike™ da Waterborne) no Jarro de Jarteste	213
5.7.2.17. Método 17 – Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos de Suspensão Comercial (AccuSpike™ da Waterborne) no Jarro de Jarteste sem Descarte de Amostra.....	214
5.7.2.18. Método 18 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste, Uso de ICN 7X e Incluindo a Concentração de Amostra	215
5.7.2.19. Método 19 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) Utilizando ICN 7X com Homogeneização por 1 Hora e Inóculos de Suspensão Comercial	

(Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarreste e Incluindo Concentração de Amostra	216
5.7.2.20. Método 20 – Adaptação do Método de Keegan <i>et al.</i> (2008) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarreste	218
5.7.3. Coeficiente de Variação do Inóculo	219
5.8. Análise Estatística dos Melhores Métodos	221
5.9. Controle de Qualidade do Melhor Método.....	225
6. CONCLUSÕES.....	228
7. RECOMENDAÇÕES.....	230
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	231
ANEXOS.....	248
APÊNDICES.....	251

1. INTRODUÇÃO

O acesso seguro à água de qualidade é de direito básico da humanidade, reflexo de uma política efetiva de proteção à saúde (WHO, 2011). O acesso à água de boa qualidade e em quantidade satisfatória contribui para a redução da ocorrência de doenças.

Neste contexto, a presença de microrganismos emergentes representa um dos problemas mais relevantes de saúde pública da atualidade. No Brasil, segundo o guia de vigilância epidemiológica da ANVISA, as doenças veiculadas pela água são responsáveis por praticamente dois terços (65%) das internações hospitalares (BRASIL, 2005). Neste cenário, podem ser incluídos os protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., os quais apresentam baixa dose infectante e sobrevivência por longos períodos em ambientes adversos.

Cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*¹ se aderem facilmente aos compostos orgânicos e inorgânicos, que constituem a turbidez nas águas. Desta forma, ressalta-se a importância de se produzir água de consumo com baixos valores de turbidez. Um tratamento eficiente representa diminuição do risco de surgimento de doenças na população. Apesar disso, vale salientar a dificuldade de remoção desses parasitos. Segundo Le Chevallier, Norton e Lee (1991), já foram encontrados oocistos em águas tratadas com turbidez de 0,19 uT.

As características físicas dos protozoários representam uma das principais dificuldades de remoção destes parasitos em sistemas de tratamento de água. Os cistos de *Giardia* apresentam dimensões aproximadas entre 8 e 18µm de comprimento e entre 5 e 15 µm de largura; já os oocistos de *Cryptosporidium* possuem de 3 a 8 µm de diâmetro (USEPA, 2012). Com essas dimensões, eles são potencialmente removíveis no meio filtrante de estações de tratamento de água – ETA, porém, os oocistos de *Cryptosporidium*, por possuírem capacidade de compressibilidade, podem se comportar como partículas de 2 a 4 µm o que facilita sua passagem pelos sistemas de filtração (FRANCO, 2007). Além do tamanho reduzido, a forma encistada de ambos os

---

¹ Neste trabalho, as formas *Giardia* e *Cryptosporidium* substituirão os termos *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.

protozoários é consideravelmente resistente à inativação pelo uso de cloro, desinfetante comumente utilizado em ETA (KORICH *et al.*, 1990).

No âmbito acadêmico, a maioria das pesquisas brasileiras que avalia a remoção de *Giardia* e *Cryptosporidium* em águas de abastecimento tem focado no uso de sulfato de alumínio como coagulante. Entretanto, mais recentemente no país, aplicações práticas do cloreto de polialumínio, mais conhecido como PAC, têm sido reportadas (LOPES *et al.*, 2009; FERREIRA FILHO; WAELENS, 2009a).

O principal atrativo do PAC é a eventual não necessidade de aplicação de pré-alcalinização, o que resulta em grande vantagem do ponto de vista operacional e econômico, quando comparado aos demais coagulantes tradicionais. Além disso, o uso de PAC ainda pode reduzir o volume de resíduos em ETA, conforme verificado por Silva *et al.* (2008).

Apesar dos avanços no tratamento de águas de abastecimento, a problemática dos resíduos gerados em ETA é evidente, tanto do ponto de vista qualitativo como quantitativo. Portanto, a presença de (oo)cistos² de protozoários em mananciais utilizados pelos sistemas de tratamento faz com que seja certa a existência dos patógenos nestes resíduos.

Embora os protozoários sejam removidos da água tratada, sua presença nos resíduos não representa que eles tenham sido inativados. Este fato é preocupante, visto que a grande maioria dos resíduos gerados em empresas de saneamento é descartada indiscriminadamente em locais impróprios. Segundo o IBGE (2010), dos 5564 municípios registrados na época, 37,71% apresentavam unidades de tratamento de água que geravam resíduos, dos quais 67,45% lançavam diretamente os resíduos nos rios mais próximos.

A responsabilidade pela geração de resíduos em sistemas de tratamento de água, onde se concebe um produto final – no caso a água potável – deve ser sempre levada em consideração. Porém, a falta de conscientização e fiscalização acarreta na disposição dos resíduos *in natura*, muitas vezes em mananciais que servirão ETA a jusante. Segundo Di Bernardo, Dantas e Voltan (2011), o lançamento indiscriminado de resíduos de ETA em corpos d'água altera significativamente a qualidade dos mananciais, sendo observado principalmente: (i) o aumento na concentração de metais;

---

² O termo “(oo)cisto” será utilizado para indicar tanto cistos de *Giardia* como oocistos *Cryptosporidium*, respectivamente.

(ii) a limitação da luminosidade do meio líquido afetando a biota; e (iii) o uso limitado do recurso hídrico para dessedentação de animais ou como fonte de abastecimento de comunidades à jusante do lançamento.

A contaminação causada por esses resíduos tem piorado a qualidade da água bruta, exigindo, assim, o aumento na dosagem de produtos químicos, e consequentemente, o acréscimo na geração de resíduos em ETA. Segundo a NBR 10.004 (ABNT, 2004), esses resíduos, mesmo contendo, na grande maioria dos casos mais de 95% de água, são considerados “resíduos sólidos”; portanto, seu lançamento *in natura* nos corpos d’água sem um tratamento prévio está sujeito a penalização. No país, a legislação mais abrangente em relação à gestão e ao gerenciamento dos resíduos sólidos é a Lei nº 12.305 de 2010, instituída pela Política Nacional de Resíduos Sólidos – PNRS (BRASIL, 2010).

A problemática associada à presença dos (oo)cistos de protozoários em resíduos de ETA fica mais complexa ao avaliar os protocolos utilizados na detecção desses parasitos, os quais ainda estão sujeitos a grande variabilidade e baixa reprodutibilidade, e também representam um alto custo frente aos métodos usados para medir outros parâmetros de qualidade da água e dos resíduos.

Em função da problemática existente, nesta pesquisa pretendeu-se avaliar, em laboratório, diversos métodos de detecção de cistos de *Giardia* e de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em resíduos gerados ao tratar, com cloreto de polialumínio (PAC), água de abastecimento com turbidez elevada.

A importância desta pesquisa se deve à carência de estudos sobre o assunto, concomitantemente ao fato de que, em 2015 espera-se a revisão da Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011) que envolverá os avanços do padrão de potabilidade, o que inclui as adequações dos órgãos e entidades em relação ao monitoramento dos protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium*.

Além da problemática dos protozoários, a atual crise hídrica brasileira, principalmente da região sudeste, faz com que o reuso das águas seja uma alternativa emergente interessante. Desta forma, avaliar a presença de (oo)cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium* em águas de lavagem de filtros (ALF) de ETA juntamente com outras características é de fundamental importância, principalmente quando é de interesse público a reutilização deste efluente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar diversos protocolos de detecção de (oo)cistos de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium parvum* presentes em resíduos gerados após o tratamento de água de abastecimento com turbidez elevada.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a aplicabilidade do cloreto de polialumínio (PAC) como coagulante em águas com turbidez elevada mediante a realização de ensaios de tratabilidade;
- Avaliar as características dos resíduos gerados em ensaios de tratabilidade utilizando o aparelho de Jarteste;
- Testar, em laboratório, diferentes métodos de detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium parvum* nos resíduos gerados pós-tratamento, elegendo o(s) melhor(es) protocolo(s) de detecção de (oo)cistos mediante estudo estatístico;
- Avaliar o(s) melhor(es) protocolo(s) de acordo com o controle de qualidade analítico do Método 1623.1 da USEPA, (2012).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica foi realizada de acordo com os temas inerentes da pesquisa. Primeiramente, foram descritas as principais características biológicas dos protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium* e os problemas causados por estes patógenos no âmbito sanitário. Posteriormente, foram relatados alguns métodos de remoção de protozoários por processos convencionais de tratamento de água e as características dos resíduos gerados por estes tratamentos. Também foi feita uma abordagem sucinta em relação ao coagulante PAC em ETA, aos ensaios de tratabilidade de água e aos ensaios hidrodinâmicos. E finalmente, uma descrição sucinta da análise estatística foi realizada.

3.1. Características dos Protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium*

Neste tópico serão relatadas as principais características que envolvem os aspectos biológicos dos protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium*, os diversos surtos documentados e as principais dificuldades de remoção destes microrganismos no tratamento de água para consumo.

3.1.1. *Giardia*

Giardia foi primeiramente relatado em 1681 pelo pesquisador Anton van Leeuwenhoek. O protozoário é um dos principais responsáveis por infecções entéricas causadas em todo o mundo. Atualmente, há seis espécies de *Giardia* reconhecidas pela comunidade científica que podem parasitar mamíferos, anfíbios e aves (ADAM, 2000). Na pecuária, por exemplo, a giardiose pode levar os animais à morte com perdas econômicas significativas embora a ocorrência de infecções assintomáticas seja mais comum (GUERDEN; OLSON, 2011).

Conforme Karanis (2011), o crescente aumento da criação pecuária nos países desenvolvidos e a consequente existência de milhões de bovinos, suínos e ovinos, além da dificuldade da adequada deposição dos estrumes, agrava a problemática da contaminação dos corpos hídricos e do solo.

Entre as espécies de *Giardia* conhecidas, a espécie *Giardia duodenalis* (sinonímia de *Giardia intestinalis* e *Giardia lamblia*) é a única parasitária em humanos, apesar de ser encontrada em animais de estimação como cachorros e gatos, e em animais selvagens (ORTEGA-PIERRES *et al.*, 2009; FENG; XIAO, 2011; CACCIÒ; SPRONG, 2011).

A contaminação geralmente ocorre por via fecal-oral ou pela ingestão de alimentos ou água contaminados, mas também pode ocorrer devido ao contato interpessoal ou animal. O contato sexual também representa um risco iminente para aquisição da doença (FAUBERT, 2000). Conforme Ali e Hill (2003), ainda é possível que a giardiose seja transmitida indiretamente por insetos (vetores), como as moscas. Portanto, locais pouco higienizados proporcionam maiores riscos de infecção.

Assim como em animais, a giardiose em humanos, na maior parte dos casos, é considerada assintomática. Contudo, alguns indivíduos infectados podem apresentar diarreia aguda ou crônica, dor abdominal, náuseas, desidratação, má absorção de nutrientes, vômitos, perda de massa corporal e retardo do desenvolvimento infantil (físico e cognitivo) (LINDQUIST, 1999; ALI; HILL, 2003; ECKMANN, 2003; CACCIÒ; RYAN, 2008). Dentre os indivíduos afetados estão crianças e pessoas imunodeficientes, em especial, pessoas portadoras do vírus HIV (MUHSEN; LEVINE, 2012).

A infecção depende da conclusão do ciclo de vida do gênero *Giardia* que ocorre principalmente em dois estádios: na forma de trofozoíto (fase de replicação) e na forma de cisto (fase de resistência) (RYAN; CACCIÒ, 2013). O cisto possui morfologia ovalada e suas dimensões variam de 8 a 18µm de comprimento e de 5 a 15µm de largura. Nos seres humanos, a dose infectante é de aproximadamente 10-100 cistos (RENDTORFF, 1954; LINDQUIST, 1999).

Quando o cisto é ingerido, a acidez do estômago promove o rompimento de suas paredes liberando excizoítos que são rapidamente transformados em trofozoítos capazes de aderirem às paredes epiteliais do intestino e se multiplicarem por divisão binária. Os trofozoítos se encistam originando novos cistos com elevado poder infeccioso. A

eliminação da forma infectante nas fezes, no caso dos seres humanos, ocorre em até 72 horas após a ingestão do patógeno (GARDNER; HILL, 2001).

Quando presentes no meio ambiente, os cistos – assim como os oocistos de *Cryptosporidium* – contaminam os mananciais devido à descarga de esgoto *in natura* ou tratado e, também, devido ao escoamento superficial da chuva, que conduz ao manancial, as fezes de animais contaminados e o solo agrícola que utiliza adubo proveniente de esterco ou, mesmo, lodo de esgoto contendo (oo)cistos (OTTOSON *et al.*, 2006).

Em comparação com os oocistos de *Cryptosporidium*, os cistos de *Giardia*, quando não estão infectando o hospedeiro, sobrevivem por menos tempo às condições climáticas e também são menos resistentes aos processos de desinfecção comumente utilizados. Os cistos podem sobreviver por até dois meses a 8 °C (CACCIÒ *et al.*, 2003), mas são facilmente removidos em estações de tratamento de água se submetidos à filtração (CACCIÒ *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2006), comparativamente aos oocistos de *Cryptosporidium*.

3.1.2. *Cryptosporidium*

O gênero *Cryptosporidium* foi primeiramente descrito por Ernest E. Tyzzer na primeira década do século 20, entretanto, a primeira infecção humana pelo parasito somente foi registrada em 1976 (LEITCH; HE, 2011). Já a partir da década de 80, a preocupação em relação ao patógeno aumentou quando 21 pessoas portadoras do vírus HIV foram diagnosticadas com criptosporidiose nos Estados Unidos, tornando-se um perigo à saúde pública (TZIPORI; WARD, 2002).

Além do homem, as variadas espécies de *Cryptosporidium* infectam peixes, anfíbios, répteis, aves e outros mamíferos. Todas as espécies são parasitas intracelulares e, fora do hospedeiro, o patógeno sempre se apresenta na forma de oocisto (FAYER, 2004).

Quando ingerido pelo hospedeiro, a acidez do estômago promove o rompimento do oocisto liberando quatro esporozoítos que invadem e parasitam células epiteliais do trato gastrointestinal. O ciclo de vida completo do parasito ocorre em um único

hospedeiro e inclui estádios de reprodução sexuada e assexuada. Após a reprodução de novos oocistos, estes são eliminados nas fezes e a excreção pode levar apenas dois dias ou até duas semanas após a data da ingestão, conhecido como período de incubação (CACCIO; PUTIGNANI, 2014). O indivíduo imunocomprometido, portador da parasitose, pode apresentar infecção crônica de longo prazo, muitas vezes com duração de vários meses (FAYER, 2004).

O oocisto possui morfologia esférica com dimensão que varia de 3 a 8 μm de diâmetro. A célula possui membrana extremamente espessa e robusta, o que lhe garante elevada resistência a estresses ambientais em ambientes úmidos por semanas e até meses. Segundo Fayer, Morgan e Upton (2000), oocistos de *C. parvum*, mesmo depois de permanecerem por 6 meses em água deionizada e em temperaturas que variaram de 0 a 20 °C, se mantiveram infecciosos em roedores.

Cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* permanecem infecciosos mesmo depois do contato com agentes floculadores em estações de tratamento (ROSE, 1997; KEEGAN *et al.*, 2008) e ainda apresentam extrema resistência ao cloro e à monocloramina em níveis comumente utilizados na desinfecção para produção de água potável (KING *et al.*, 2005; BETANCOURT; PEELE; ROSE, 2002).

Diante da elevada resistência dos (oo)cistos aos desinfetantes habitualmente utilizadas em tratamentos e da dificuldade de inativação, os tratamentos de desinfecção utilizando dióxido de cloro, ozonização e radiação ultra violeta (UV), são opções que podem interromper a vida infecciosa desses organismos (BETANCOURT; ROSE, 2004).

Apesar dos esforços na inativação destes patógenos, muitos casos de contaminação ainda são registrados. A transmissão pode ocorrer via fecal-oral ou devido à ingestão de alimentos ou água contaminados por oocistos. No caso do *Cryptosporidium parvum*, segundo Okhuysen *et al.* (1999), a ingestão de apenas 9 oocistos é suficiente para que o indivíduo se infecte.

Uma grande parte dos indivíduos infectados é assintomática, porém, aqueles que apresentam baixa imunidade, conhecidos como imunocomprometidos, podem apresentar, na maioria das vezes, diarreia que pode evoluir ao óbito (KING *et al.*, 2005).

3.1.3. Surtos de Giardiose e Criptosporidiose

De acordo com Karanis e Kourenti (2004), dos 325 surtos associados à transmissão de protozoários parasitas por via hídrica, os principais responsáveis foram *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum* com 132 e 165 surtos epidêmicos, respectivamente – juntos representaram 91,3% dos eventos reportados.

Entre 2004 e 2010, uma revisão apontou a ocorrência de 199 surtos causados por protozoários, deste total, 35% corresponderam a *Giardia*. A principal ocorrência destes casos foi relacionada ao consumo de água contaminada (BALDURSSON; KARANIS, 2011).

Conforme Fayer, Morgan e Upton (2000), entre 1984 e 1999, estima-se que mais de 470 mil pessoas foram infectadas por oocistos de *Cryptosporidium*. Ao todo, 108 surtos de criptosporidiose foram registrados, sendo mais da metade (56%) relacionados à veiculação hídrica e os outros surtos (44%) foram associados ao uso recreativo da água, como piscinas, rios e lagos (BETANCOURT; PEELE; ROSE, 2002).

Fayer, Morgan e Upton (2000) ainda alertam para o uso recreativo em piscinas. Segundo os autores, mesmo que o serviço oferecido para os banhistas seja de ótima qualidade, o que caracteriza o uso de uma água filtrada e desinfetada de qualidade, os “acidentes fecais” não podem ser prevenidos. Este risco é evidente e pode ser agravado quando o ambiente é frequentado por bebês, crianças e idosos e, pode piorar quando a dosagem de cloro é realizada de forma inadequada.

É sabido que doenças entéricas são mais comuns e danosas nos países em desenvolvimento. Porém, o aumento de surtos nestes países tem gerado preocupação na comunidade científica e nas autoridades locais. Em 2011, por exemplo, uma cidade no norte da Suécia sofreu com um surto de criptosporidiose forçando a população a ferver a água por meses. Apenas 155 pessoas foram diagnosticadas com a doença, entretanto, mais de 6000 apresentaram os sintomas (MANSER *et al.*, 2014).

O Canadá, outro país desenvolvido, registrou entre 1974 e 2001, um total de 288 surtos de veiculação hídrica, sendo que, mais de um quinto foram causados por protozoários (WILLIS *et al.*, 2013). Conforme Schuster *et al.* (2005), dos 155 surtos causados por um protozoário, os patógenos *Giardia* e *Cryptosporidium* foram responsáveis por 51 e 12 surtos, respectivamente.

Robertson (2014) adverte que além da ampla gama de sintomas que as doenças entéricas podem causar, em alguns pacientes, o problema é agravado mesmo após o parasito ter sido eliminado. Mørch *et al.* (2009) relataram que, em 2004, a cidade norueguesa de Bergen vivenciou um surto de giardiose com mais de 1200 casos confirmados em laboratório. Dois anos após o registro, 41% das pessoas tratadas com sucesso ainda relataram sofrer de fadiga e 38% de dores abdominais.

De todos os surtos de veiculação hídrica relatados, nenhum acarretou maior repercussão do que o surto de criptosporidiose ocorrido na cidade de Milwaukee, em 1993, nos EUA. Os números são alarmantes: cerca de 403.000 pessoas foram infectadas levando 100 pessoas portadoras do vírus HIV a óbito. O incidente fez com que o governo americano desembolsasse 96 milhões de dólares em medidas de controle e prevenção (MACKENZIE *et al.*, 1994; CORSO *et al.* 2003). No ano seguinte, em Las Vegas (EUA), outro surto ocasionou a morte de 41 pessoas com HIV (GOLDSTEIN *et al.*, 1996).

Apesar do cumprimento das legislações americanas de potabilidade vigentes naquela época, verificou-se, com o surto em Milwaukee, que o sistema de tratamento necessitava de maiores cuidados. As autoridades foram então obrigadas a reavaliar as questões que envolviam o tratamento de águas de consumo, com o objetivo de detectar as formas infectantes nos mananciais, avaliar as rotas de transmissão e criar protocolos de detecção e prevenção desses protozoários (MACKENZIE *et al.*, 1994; CORSO *et al.*, 2003; CHALMERS, 2014).

Além da transmissão destes patógenos por veiculação hídrica, muitos episódios de contaminação podem ocorrer em ambientes em que o contato interpessoal é maior, aliado, principalmente, à hábitos de higiene em formação – fato comum em creches. As crianças, neste ambiente, são alvos fáceis desses protozoários. No Brasil, segundo Rose, Huffman e Gennaccaro (2002), 20% dos casos de crianças com diarreia que frequentam creches foram infetadas por *Cryptosporidium*. Em relação ao Estado de São Paulo, *Giardia duodenalis* foi a espécie proeminente em crianças entre 0 e 4 anos (CARVALHO-ALMEIDA *et al.*, 2006). Em 2001, um surto de criptosporidiose em uma creche do Hospital das Clínicas na cidade de São Paulo foi comprovado por Gonçalves *et al.*, (2006).

Apesar do progresso na avaliação e detecção destes microrganismos nos últimos anos em território nacional, a comprovação da ocorrência de surtos no Brasil ainda é

dificultada pela ausência de dados devidamente documentados e pela reduzida quantidade de pesquisas científicas sobre esses protozoários (FRANCO, 2007).

3.1.4. Ocorrência de (Oo)cistos de *Giardia* e de *Cryptosporidium* no Brasil

Apesar de não ter sido registrado nenhum surto de giardiose ou criptosporidiose por veiculação hídrica no País, a presença dos patógenos causadores destas doenças foi registrada em muitos mananciais brasileiros (DIAS JUNIOR, 1999; FRANCO ROCHA-EBERHARDT; CANTUSIO NETO, 2001; FARIAS; GAMBA; PELLIZARI, 2002; SANTOS, 2007; DIAS *et al.*, 2008; CANTUSIO NETO *et al.*, 2010).

No Brasil, o monitoramento das espécies de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* se concentra na região sudeste, sobretudo no Estado de São Paulo. Uma avaliação quantitativa do risco microbiológico desses organismos foi realizada por Sato *et al.* (2013). Os autores do estudo demonstraram que quatro regiões do Estado paulista (Campinas, São Paulo, Litoral Sul e Vale do Paraíba), onde vivem mais de 25 milhões de pessoas (13% da população brasileira) segundo a Fundação SEADE (2011), possuem risco potencial de contrair doenças associadas a esses parasitos em função das deficiências dos serviços de coleta e tratamento de esgotos domésticos.

No interior do Estado de São Paulo, na cidade de Campinas, também foi comprovada a presença dos parasitos. Em amostras coletadas no Rio Atibaia, verificou-se a prevalência de *Giardia* e *Cryptosporidium* em 87,5% e 62,5%, respectivamente. As amostras de água bruta, decantada e filtrada, foram coletadas durante o tratamento da ETA da cidade, que utiliza a água deste manancial e foram positivas para ambos os protozoários em pelo menos uma das diferentes amostras citadas (CANTUSIO; FRANCO, 2004).

Além da evidência destes patógenos em mananciais, muitos casos de giardiose associada, principalmente, à contaminação ambiental e à falta de higiene, têm prejudicado, em especial, as crianças. Elas podem desenvolver sintomas crônicos de má-nutrição, deficiência de micronutrientes, prejuízo no desenvolvimento físico e anemia (SAVIOLI; SMITH; THOMPSON, 2006; THOMPSON, 2008).

Em Juiz de Fora, no Estado de Minas Gerais, um estudo avaliou a presença de cistos de *Giardia duodenalis* em 560 crianças de 1 a 5 anos. Deste total, cerca de 100 crianças (18%) abrigavam o patógeno (TEIXEIRA; HELLER; BARRETO, 2007). No mesmo Estado, no Vale do Jequitinhonha, mais de 400 crianças com até 5 anos e 11 meses de idade também foram diagnosticadas, sendo que 26,3% dos casos foram positivos para o parasito (SILVA *et al.*, 2009).

No nordeste do País, um estudo realizado em uma favela da cidade de Fortaleza, CE, avaliou a presença de *Giardia duodenalis* em 189 crianças. A giardiose foi confirmada para 47 crianças (aproximadamente 25%) (KHOLI *et al.*, 2008). O alto índice de contaminação em favelas pode estar associado a graves problemas de saneamento básico destas comunidades. Outro estudo em uma favela da capital paulista comprovou que 16,7% das crianças avaliadas haviam sido contaminadas por *Giardia* (KORKES *et al.*, 2008).

Além da infecção de *Giardia duodenalis* em crianças, uma avaliação abordou a presença de enteroparasitoses também em adultos. O estudo foi realizado no sul do País, no município de Maria Helena no Paraná, cuja população rural é maior do que a população urbana. Ao todo, foram analisadas 431 amostras de fezes de pessoas entre 0 e 89 anos. Deste total, 15 indivíduos – cerca de 3,5% – apresentaram infecção pelo parasito (SANTOS; MERLINI, 2010).

A análise do contexto destes protozoários em âmbito nacional em conjunto com o monitoramento destes patógenos em mananciais é, de fato, um importante alicerce para as políticas públicas e empresas de saneamento no País. Desta forma, é evidente que a proteção dos corpos d'água (CANTUSIO NETO *et al.*, 2010; DIAS *et al.*, 2008) seja essencial para a diminuição dos riscos de contaminação da população.

3.1.5. Métodos de Detecção de (Oo)cistos de *Giardia* e de *Cryptosporidium*

Há uma grande variedade de métodos de detecção e identificação destes patógenos, podendo variar, desde métodos básicos, que envolvem uma suspensão contendo organismos em lâminas de vidro para visualização em microscopia de campo

claro, até métodos mais sofisticados, como é o caso das análises biomoleculares (CLANCY *et al.*, 2000).

Entretanto, somente selecionar determinada técnica de detecção é, na grande maioria dos casos, insuficiente (McCUIN; CLANCY, 2005). A dificuldade de seleção do método está atrelada a diversos fatores, entre eles estão as características físico-químicas e microbiológicas particulares de cada matriz ambiental. Os cistos de *Giardia*, por exemplo, já foram registrados em uma grande variedade de amostras ambientais, incluindo águas superficiais, para recreação, subterrâneas e tratadas, além de efluentes, solos e alimentos (ROBERTSON, 2014).

Embora exista uma diversificada avaliação destes patógenos em várias matrizes, os procedimentos ainda são complexos e caros. Além disso, os resultados obtidos com alto investimento monetário e laboratorial, muitas vezes, ainda estão sujeitos à elevada variabilidade e baixa reprodutibilidade, podendo ser prejudicados pelo aumento da turbidez da água (FRANCO, BRANCO e LEAL, 2012). Conforme Ongerth, (2013), a quantificação precisa das concentrações de *Cryptosporidium* e *Giardia* em determinadas amostras requer medições rotineiras de acentuada eficiência, caso contrário, as formas de detecção estarão susceptíveis à inferência de erros. Em função destes aspectos, o diagnóstico de protozoários em amostras de água é considerado um grande desafio (FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012).

Independentemente das dificuldades, a grande maioria dos métodos de detecção de (oo)cistos é realizada em três fases: concentração; purificação; visualização e contagem dos (oo)cistos (FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012).

A fase de concentração é realizada com objetivo de concentrar os protozoários presentes em um reduzido volume. Todavia, a amostra, depois de concentrada, pode apresentar uma grande quantidade de sujidades e de microrganismos indesejáveis ao processo de detecção. Desta maneira, a fase de purificação é extremamente importante para eliminação destes interferentes. Ao final, o volume reduzido de amostra concentrada e purificada, é submetido à fase de visualização e enumeração dos (oo)cistos em microscópio.

Na fase de concentração, o método de floculação em carbonato de cálcio – FCCa, elaborado por Vesey *et al.* (1993) e adaptado por alguns autores, como Feng *et al.* (2011), está entre os métodos comumente utilizados por pesquisadores.

Uma limitação desse método pode ocorrer quando há dificuldade de visualização dos (oo)cistos em microscopia de fluorescência. O contato prolongado dos protozoários

com ácidos e a ampla variação do valor de pH podem deformar os (oo)cistos implicando em resultados falso-positivos ou falso-negativos (FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012). Os autores também mencionaram que o método FCCa pode interferir na viabilidade dos patógenos, comprometendo possíveis ensaios de infectividade.

Outras formas comumente utilizadas na concentração de protozoários consistem em sistemas de filtração estabelecidos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA). Primeiramente foi criado o Método 1622 em dezembro de 1996, que foi aprimorado no Método 1623 em 1999 e sua última versão foi descrita no Método 1623.1 em 2012. Este protocolo consiste na utilização dos *kits* Environcheck® e Filta-Max®.

O uso do Environcheck® consiste, primeiramente, na filtração de toda amostra em fluxo de 2 L.min⁻¹ e o volume filtrado é devidamente registrado. Após a filtração, é adicionado água reagente garantindo a proporção de 1:10 com o objetivo de lavar o recipiente. A bomba é novamente ligada filtrando toda a água adicionada. Após a filtração, o equipamento é desmontado e é realizada a eluição com hexametáfosfato de sódio (NaHMP) a 5%. A cápsula deve ser devidamente fechada e agitada por 5 min entre 700 e 900rpm. O filtro é então removido do agitador e o conteúdo é despejado em um tubo de centrífuga. O filtro é novamente lavado com o tampão de eluição e a mistura é também adicionada ao tubo de centrífuga. A etapa de purificação é realizada com o objetivo de detectar os (oo)cistos.

O sistema Filta-Max® consiste na filtração da amostra em cápsulas, em que a espuma filtrante, após ser submetida à filtração, é embalada em um saco plástico. A espuma contendo a amostra é lavada com a solução de NaHMP a 5% e comprimida entre os dedos polegar e indicador do técnico de laboratório. O líquido resultante é submetido à etapa de centrifugação e, por fim, realiza-se a purificação da amostra. Entre as vantagens deste método, pode-se destacar a elevada sensibilidade na recuperação de protozoários em amostras de grandes volumes. Em um estudo realizado por Razzolini, da Silva Santos e Bastos (2010), 400 litros de água tratada foram filtrados e as recuperações foram de 41,7% de cistos de *Giardia* e 7,6% de oocistos de *Cryptosporidium*.

Em contrapartida, várias desvantagens inviabilizam seu uso no País, tais como: elevado custo, necessidade de importação, relevante influência de amostras com elevada turbidez, dificuldade operacional em comparação com outros métodos, além da necessidade de pessoal especializado (FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012).

O método de filtração em membranas está entre os métodos amplamente utilizados na concentração de (oo)cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium* (ONGERTH; STIBBS, 1987; ALDOM; CHAGLA, 1995). Há diferentes protocolos de concentração de amostras, como por exemplo, o executado por Clancy *et al.* (2000), em que a amostra é filtrada em membranas de acetato de celulose com porosidade de 1,2µm e após a filtração, acetona é adicionada ao material filtrado e, posteriormente, a etapa de centrifugação é realizada. As recuperações obtidas por Clancy *et al.* (2000) na realização deste método foram, em média, de 50,2% para oocistos de *Cryptosporidium* e 63,1% para cistos de *Giardia*.

Outro método que concentra amostras a partir da filtração foi realizado por Franco, Rocha-Eberhardt e Cantusio Neto (2001). Entretanto, as membranas utilizadas foram de ésteres mistos de celulose com porosidade de 3µm e 47mm de diâmetro. O material aderido à membrana foi raspado com o auxílio de alças plásticas flexíveis e determinada solução de eluição e o material resultante do procedimento foi transferido a um tubo de centrífuga. O *pellet* formado após a etapa de centrifugação foi visualizado em microscopia.

A principal limitação desta técnica é a turbidez da amostra. A obstrução da membrana provoca sua substituição. Desta forma, há uma maior demanda de membranas, tornando o procedimento comparativamente árduo e, muitas vezes, inviável. Em compensação, o custo dos equipamentos e materiais é relativamente baixo e podem ser facilmente adquiridos pelos laboratórios de países latino-americanos (FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012).

A realização da etapa de centrifugação consiste não somente em concentrar a quantidade de (oo)cistos presente na amostra, mas também em elevar a quantidade de sujidades na amostra final concentrada que, ao final do procedimento, podem interferir na detecção dos protozoários alvo. Para evitar a interferência das sujidades, os métodos de purificação que se destacam são os de flutuação em sacarose e a separação imunomagnética (IMS).

Apesar do método de purificação por flutuação promover a separação dos (oo)cistos, ainda assim, uma grande quantidade de partículas e células de algas podem persistir na amostra e interferirem negativamente na visualização em microscopia de fluorescência (CLANCY *et al.*, 2000; McCUIN *et al.*, 2001). Esta técnica ainda está sujeita à grande variabilidade de recuperação e depende do número original de (oo)cistos, da turbidez e do período em que os protozoários estiveram em contato com

as partículas presentes na matriz (McCUIN *et al.*, 2001). Além disso, a variabilidade de recuperação pode ser causada pelo elevado número de protozoários. Segundo Bukhari e Smith (1995), amostras contendo mais do que 10.000 oocistos, resultaram em recuperações que variaram entre 20 e 74%. Fricker (1995) também verificou que a ampla variação na recuperação de oocistos – de 11% a 56% – dependia do tempo de contato com as partículas da água bruta.

Por estas razões, a técnica de separação imunomagnética (IMS) primeiramente descrita pelo Método 1622 e recentemente atualizada pelo Método 1623.1 (USEPA, 2012) é, atualmente, a alternativa mais eficiente na purificação e separação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* (CLANCY *et al.*, 2000). A IMS é uma inovação tecnológica que substitui os procedimentos convencionais de purificação.

O kit *Dynabeads® GC Combo* é o único reconhecido pelo Método 1623.1, entretanto, há outros *kits* no mercado que podem ser utilizados na detecção de (oo)cistos. Eles possuem anticorpos monoclonais específicos para *Giardia* e *Cryptosporidium* conjugados com microesferas magnéticas de tamanho pré-definido que, segundo Clancy *et al.* (2000), variam de 0,8 a 4,5 μm de diâmetro, dependendo do *kit*. Estas esferas magnéticas, denominadas *dynabeads*, são capazes de reconhecerem epítomos das paredes dos (oo)cistos e formarem um conjugado “beads magnéticas + (oo)cistos”. Além das *dynabeads*, os *kits* também dispõem de soluções de tamponamento concentradas. O procedimento da IMS será descrito mais adiante.

Um dos principais interferente da IMS é o volume de *pellet* a ser purificado. Bukhari *et al.* (2000) analisaram três *kits*: *Dynabeads® Combo*, *Crypto-Scan® IMS* e *Crypto-Scan® IMS* modificado; verificaram que o *kit Dynabeads® Combo* apresenta relativa vantagem na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras com volume de *pellet* superior a 0,5 mL. Todavia, o Método 1623.1 não recomenda a purificação de amostras que possuem *pellet* superior a 0,5 mL. Outro interferente dos métodos de detecção está relacionado com a presença de ferro dissolvido na água, o que pode dificultar a formação do complexo “beads magnéticas + (oo)cistos”. Segundo Yakub e Standterman-Knauer (2000), concentrações de ferro de 40 mg.L^{-1} e 4 mg.L^{-1} interferiram no processo de purificação por IMS.

Após a remoção dos resíduos interferentes na fase de purificação, a amostra purificada contendo (oo)cistos é acondicionada no poço da lâmina de imunofluorescência e reagentes que promovem a identificação e enumeração dos (oo)cistos são adicionados, como é o caso do *kit Merifluor®*.

Em relação à última fase do procedimento (visualização em microscopia), pode-se dizer que a técnica vem sendo aperfeiçoada há alguns anos. Uma melhora significativa ocorreu no ano de 1987, quando se passou a utilizar anticorpos monoclonais (marcados com isotiocianato de fluoresceína - FITC) específicos para protozoários. Este procedimento incorporou o uso da reação de imunofluorescência direta na detecção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*. Esta medida proporcionou um aumento na eficiência do processo de detecção em 12 vezes, quando comprado às técnicas anteriores (CLANCY *et al.*, 2000).

Dentre o uso de anticorpos específicos que auxiliam a etapa de detecção de cistos *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*, o Método 1623.1 aprova quatro kits: 1) *MeriFluor*®; 2) *Aqua-Glo*™; 3) *Crypt-a-Glo*™ e *Giardi-a-Glo*™; e 4) *EasyStain*™ C&G.

A adição do reagente de detecção e do contra corante do kit *MeriFluor*®, provoca, após 30min, a fluorescência dos (oo)cistos na tonalidade maçã-verde brilhante quando visualizados em microscopia FITC. Apesar do cumprimento das particularidades inerentes do Método 1623.1 muitas vezes não é possível evitar que organismos de tamanhos semelhantes aos (oo)cistos, tais como leveduras e algas, sejam removidos do procedimento, podendo assim, serem confundidos com os protozoários na visualização em microscópio. Em decorrência deste infortúnio, a análise de microscopia de fluorescência pode ficar comprometida, implicando em resultados falso-positivos (CLANCY *et al.*, 2000).

Desta forma, o corante fluorogênico vital DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindol) vem sendo uma opção que atenua a dificuldade de visualização em microscopia. Sua adição causa a coloração azul-claro da estrutura interna dos (oo)cistos (máximo de quatro núcleos) e facilita a identificação dos protozoários no exame microscópico (GRIMASON *et al.*, 1994). Contudo, Clancy *et al.* (2000) destacam que a impermeabilidade dos protozoários pode interferir negativamente na coloração dos núcleos pelo uso de DAPI. Desta forma, a análise em microscopia DIC complementa a identificação dos patógenos.

Além disso, a utilização do DAPI não é recomendada para avaliação de infectividade animal. Segundo Gasser e O'Donoghue (1999), o corante pode se ligar ao material nuclear mesmo que a célula esteja morta. Assim, não é possível determinar a atividade metabólica dos esporozoítos ou trofozoítos.

Um exemplo do uso de sistemas de detecção de protozoários mais avançados foi avaliado no Japão. Para verificar a eficiência de remoção de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em uma ETA no Japão, Hashimoto, Kunikane e Hirata (2002) filtraram durante 15 meses, 13 amostras de 50L de água bruta e 26 amostras de 2000L de água filtrada. O procedimento foi baseado na ultra-filtração em membrana de fibra, eluição com solução de detergente Tris e separação de *pellet* pelo método de flutuação em sacarose (USEPA, 1999). Do total de amostras de água filtrada analisadas, 35% foram de oocistos de *Cryptosporidium* ($1,2 \text{ oocistos.1000L}^{-1}$) e 12% de cistos de *Giardia* ($0,8 \text{ cistos.1000L}^{-1}$). Para as amostras de água bruta foi verificada a presença em todas as amostras (100%) para *Cryptosporidium* ($40 \text{ oocistos.100L}^{-1}$) e a presença de cistos de *Giardia* foi verificada em 92% das amostras ($17 \text{ cistos.100L}^{-1}$). Segundo os autores, o método de concentração mediante ultra-filtração em membrana de fibra pode facilmente concentrar grandes volumes tanto de águas não tratadas como filtradas com elevada recuperação.

Além da detecção destes patógenos em amostras de água, muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de determinar a recuperação de protozoários em amostras de solo, principalmente para oocistos de *Cryptosporidium* (KUCZYNSKA; SHELTON, 1999; BARWICK *et al.*, 2000; ZILBERMAN *et al.*, 2009) e, em alguns casos, para cistos de *Giardia* (ORLOFSKY *et al.*, 2013). Destaque para o trabalho de Barwick *et al.* (2000) com 44% de recuperação de oocistos; e de Zilberman *et al.* (2009), que avaliaram a eficiência de dois métodos, obtendo recuperações de oocistos de 39% (método de flutuação em sacarose) e 61% (método utilizado na detecção de esporos de *Clostridium perfringens* adaptado para oocistos).

Com o objetivo de determinar técnicas de detecção de *Giardia* em amostras de solo, Boni de Oliveira (2012) padronizou uma metodologia que resultou em recuperações de 37,60% e 33,20% para amostras de solo que detinham 500 e 1000 cistos, respectivamente. O estudo também comprovou que os melhores resultados foram obtidos quando a solução de dispersão do detergente ICN 7X foi utilizada.

Também foram realizadas diversas técnicas visando padronizar uma metodologia na remoção de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia duodenalis* em alimentos por Cook *et al.* (2007).

Em geral, ainda é observada grande variabilidade dos resultados na aplicação dos métodos de detecção de protozoários, principalmente devido ao fato da grande variação das condições ambientais como, por exemplo, o tipo de amostra; a idade dos

(oo)cistos e; as características físico-químicas e biológicas do meio afetarem as recuperações destes protozoários (DIGIORGIO; GONZALEZ; HUITT, 2002).

Os métodos anteriormente descritos possibilitam a identificação e quantificação dos (oo)cistos, entretanto, não diferenciam espécies. Esta preocupação geralmente emerge quando há possibilidade da ocorrência de surtos, pois a determinação do espécime facilita a compreensão das vias de transmissão (RYAN; XIAO, 2014).

Neste cenário, o método de Reação em Cadeia de Polimerase, mais conhecida pela sigla em inglês PCR, vem contribuindo nesta determinação genotípica de variados patógenos. A PCR já foi experimentalmente útil na detecção de vírus, bactérias e inclusive protozoários em águas de abastecimento e efluentes. A técnica consiste na reprodução de múltiplas cópias de ácido desoxirribonucleico (DNA) do patógeno. A definição da espécie é realizada pela comparação do sequenciamento genético obtido com uma base de dados. A PCR é considerada relativamente rápida, altamente sensível e precisa, no entanto, limitações como a exposição de ácidos nucléico, organismos não viáveis e contaminação laboratorial contribuem para a geração de resultados falso-positivos (TOZE, 1999; RYAN; XIAO, 2014).

Keegan *et al.* (2008) avaliaram a influência do tratamento em Jarreste utilizando sulfato de alumínio como coagulante pelos processos de decantação e flotação, e a diferença na infectividade e na recuperação de oocistos de *Cryptosporidium*. O ensaio de tratabilidade em Jarreste consistiu no uso de 2 L de água de um rio da Austrália juntamente com o inóculo de aproximadamente 100.000 oocistos e foi aplicado sulfato de alumínio para promover os processos de coagulação, floculação e decantação (ou flotação). Finalizado o ensaio de tratabilidade, amostras de resíduo sedimentado (50 a 200 mL) foram centrifugadas a 2500 g por 10 min obtendo um volume concentrado de 10 mL de amostra. Com o objetivo de liberar oocisto dos flocos, ácido sulfúrico foi gotejado reduzindo o pH para 3. Uma nova centrifugação foi realizada e o *pellet* formado foi ressuscitado pela adição de *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) até atingir valor de pH = 7. A amostra era então submetida à separação imunomagnética (IMS).

O ensaio de tratabilidade em Jarreste resultou em elevadas remoções, sendo acima de 90 (processo de decantação) e mais de 95% (processo de flotação). Os processos de tratamento de água pouco influenciaram na infectividade dos (oo)cistos, inclusive nos protozoários sedimentados com os resíduos (KEEGAN *et al.*, 2008).

O Método 1623.1 da USEPA estabelece que a avaliação do controle de qualidade do método deve ser feita envolvendo 4 ensaios (quadruplicata) em que são inoculados uma quantidade exata de protozoários, como é o caso das cepas AccuSpike™ da Waterborne, contendo 100 cistos e 100 oocistos de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., respectivamente, somados a um ensaio branco (sem inóculo) de forma a avaliar a contaminação amostral. Conforme a agência americana, a validação do método ocorre quando as médias das porcentagens de recuperação estão entre 32 e 100% para oocistos de *Cryptosporidium* spp. e entre 8 e 100% para cistos de *Giardia* spp. e o desvio padrão relativo à média de porcentagem, ou seja, o coeficiente de variação, é menor do que 46 e 97% para *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., respectivamente.

3.2. Remoção de (Oo)cistos de *Giardia* e de *Cryptosporidium* por Processos que Envolvem o Tratamento de Água de Abastecimento

A coagulação, floculação, decantação, filtração e desinfecção constituem os principais processos e operações utilizadas na produção de água potável em ETA convencionais. Estes, quando aplicados em conjunto, funcionam como uma barreira múltipla na redução de patógenos de interesse à saúde pública (BETANCOURT; ROSE, 2004³ *apud* GELDREICH, 1996).

Contudo, Smith e Grimason (2003) destacam que até mesmo eficientes tratamentos físico-químicos adequadamente combinados em série, não promovem a total remoção de (oo)cistos, sendo que, os cistos de *Giardia* são mais facilmente removidos do que os oocistos de *Cryptosporidium*. Assavasilavasukul *et al.* (2008) acreditam que isto ocorra provavelmente devido à pequena diferença de dimensão entre as formas de resistência.

---

³ BETANCOURT, W. Q.; ROSE, J. B. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. Veterinary Parasitology, v. 126, n. 1-2 SPEC.ISS., p. 219–234, 2004.

Betancourt e Rose (2004) e Assavasilavasukul *et al.* (2008) ainda alertam que a eficiência de remoção sempre dependerá da concentração de protozoários (número de (oo)cistos por litro) em águas afluentes ao tratamento.

3.2.1. Coagulação e Floculação

A coagulação por varredura é considerada eficiente na remoção de cistos (JAKUBOWSKI, 1990) e oocistos (BUTKUS; BAYS; LABARE, 2003) em sistemas de tratamento de água. Os coagulantes utilizados em ETA são, predominantemente, sais inorgânicos de ferro e alumínio, como, por exemplo, cloreto férrico e sulfato de alumínio, respectivamente. A coagulação promovida por esses sais é extremamente essencial na diminuição do risco microbiológico (JIANG, 2015).

A eficiência do processo de coagulação tem demonstrado ser fundamentalmente importante na remoção de *Cryptosporidium*. A otimização deste processo é mais significativa do que melhorias na remoção de variáveis controle, tais como turbidez e esporos de bactérias aeróbias (DUGAN *et al.*, 2001).

States e Tomko (2002) realizaram um estudo em escala piloto que avaliou a remoção de *Cryptosporidium parvum* no uso de diferentes coagulantes. A remoção média do patógeno, atribuída pelos autores foi de aproximadamente 5,8- $\log_{10}$, cumprindo com a exigência da USEPA que determina que a remoção de oocistos de *Cryptosporidium* em tratamento convencional deva ser, em média, de 3- $\log_{10}$ (USEPA, 2003).

A adição de carvão ativado auxilia na remoção de (oo)cistos juntamente com o uso de cloreto férrico como coagulante. Segundo Bell *et al.* (2000), o uso do carvão ativado alavancou a remoção dos (oo)cistos, atingindo resultados superiores a 1- $\log_{10}$. Os autores também verificaram que a temperatura também influenciou na remoção dos patógenos, pois ensaios em que a temperatura da água estava próxima à 4°C não foram tão eficientes quanto àqueles em que as amostras coletadas estavam à temperatura ambiente.

A interação entre coagulantes e oocistos de *Cryptosporidium* também foi avaliada por Bustamante *et al.* (2001). O uso de cloreto férrico, apesar de ter alterado o

potencial zeta e o pH (3,0-10,0), não influenciou na carga dos (oo)cistos. Entretanto, a coagulação provocou a adsorção de espécies hidrolisadas à superfície dos oocistos, alterando o potencial zeta do meio e dos (oo)cistos. Esta interação específica sugere ser importante para que ocorra melhores remoções de (oo)cistos aderidos aos flocos.

Hsu, Huang e Pan (2001) avaliaram a influência – não somente em oocistos de *Cryptosporidium*, mas também em cistos de *Giardia* – da força iônica e do pH em relação ao potencial zeta e a hidrofobicidade dos organismos. Os autores concluíram que: (i) os (oo)cistos adquiriram potencial zeta mais negativo com a redução de pH; (ii) os valores de potencial zeta neutros para cistos e oocistos foram verificados em pH de 2,2 e 3,3, respectivamente; (iii) a determinação hidrofóbica por cálculos matemáticos demonstrou que taxas iniciais de remoção de cistos foram menores do que para oocistos; (iv) houve uma redução nas taxas iniciais de remoção para ambos os patógenos em decorrência dos valores de pH e; (v) a taxa de remoção inicial de (oo)cistos está diretamente relacionada com o aumento da força iônica.

Neste mesmo sentido, a pesquisa de Butkus, Bays e Labare (2003) também evidenciaram que oocistos de *Cryptosporidium* podem apresentar carga superficial neutra e, esta estabilidade, pode prejudicar a remoção do parasito em ETA convencionais.

3.2.2. Decantação

A decantação é a primeira barreira para os (oo)cistos em tratamentos convencionais de água de abastecimento (EDZWALD; KELLEY, 1998). Esta operação é realizada pela clarificação da água e sedimentação dos flocos (JAKUBOWSKI; GRAUN, 2002). Porém, infelizmente, a adsorção dos protozoários aos flocos pode não ocorrer, e consequentemente, diminui a eficiência da operação em decorrência da baixa velocidade de sedimentação dos (oo)cistos.

Conforme Dai e Boll (2006), cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* sedimentam em águas naturais com velocidades próximas a $0,67 \mu\text{m.s}^{-1}$ e $0,27 \mu\text{m.s}^{-1}$, respectivamente. Portanto, a não agregação dos (oo)cistos aos flocos formados

acarretará em um lento processo de sedimentação, o que aumenta a probabilidade destes patógenos não serem removidos.

Entretanto, segundo Kulkarni *et al.* (2004), foi verificada uma velocidade média de sedimentação de oocistos de *Cryptosporidium* de $0,029 \mu\text{m.s}^{-1}$. Este resultado foi dado como certo pelos autores, pois a comparação deste valor com a velocidade de sedimentação, em acordo com a Lei de Stokes, comprovou que mais de 95% dos oocistos possuíam velocidades inferiores à calculada pela Lei. Contudo, a velocidade de sedimentação inicial medida foi de $0,379 \mu\text{m.s}^{-1}$, ou seja, compatível com os resultados observados por outros pesquisadores, como Dai e Boll (2006).

A influência da decantação na remoção de protozoários ainda é obscura, ou seja, poucas pesquisas avaliaram tal comportamento (SMITH; GRIMASON, 2003). Um processo alternativo à decantação é a flotação por ar dissolvido (FAD) que tem demonstrado melhor desempenho frente à remoção de (oo)cistos (EDZWALD *et al.*, 2000). A eficiência da FAD pode representar remoções entre 2 e 3-log_{10} para oocistos de *Cryptosporidium* spp. (EDZWALD *et al.*, 2010), enquanto que a decantação é de, aproximadamente, 1-log_{10} de remoção de (oo)cistos (NIEMINSKI; ONGERTH, 1995).

3.2.3. Filtração

Na filtração, existem diversos mecanismos que permitem a remoção dos (oo)cistos. Assim, esta etapa é considerada fundamental para redução do risco microbiológico na água de consumo. Desta forma, diversos estudos envolvendo a remoção de protozoários pela filtração foram avaliados.

Hsu, Huang e Pan (2001), por exemplo, avaliaram o comportamento de filtros em relação à força iônica do meio filtrante e aos valores de pH na remoção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*. O experimento indicou interações entre coloides e o meio filtrante sob influência do pH e foi verificado que os (oo)cistos, quando aderidos aos coloides, podem ser eficientemente removidos pelo meio filtrante. Neste contexto, a eficiência de remoção de cistos de *Giardia* nos filtros testados foi ligeiramente maior na faixa de 2,4 a 8,7 de pH e diminuiu significativamente em pH

superior a 8,7. Em contrapartida, melhores eficiências de remoção de oocistos de *Cryptosporidium* foram verificadas em valores de pH maiores que 8,7.

Huck *et al.* (2000) analisaram o desempenho da filtração na remoção de *Cryptosporidium* em águas de baixa turbidez (0,6 a 2,5 uT) em duas ETA piloto que utilizam sulfato de alumínio como coagulante. Sob ótimas condições de coagulação (turbidez da água efluente ao filtro próxima à 0,1 uT) as remoções de oocistos foram superiores a 5-log₁₀ e 3-log₁₀ para alta e baixa dosagem de coagulante, respectivamente. Os autores concluíram que ao excluir o uso do coagulante, a eficiência dos filtros na remoção, para ambas as ETA, declinaram significativamente de 0,2 a 0,3-log₁₀, reforçando a importância da coagulação na remoção de oocistos.

Xagorarakis *et al.* (2004) realizaram um estudo em escala piloto avaliando a remoção de *Cryptosporidium parvum*. A pesquisa demonstrou que a diminuição da turbidez da água filtrada de 0,5 uT para 0,3 uT não interferiu de maneira significativa na remoção do patógeno. Porém, valores inferiores a 0,2 uT repercutiram em maior redução do risco microbiológico. Ao todo, foram avaliadas 46 amostras de água filtrada e a remoção média de protozoários foi de 1,5-log₁₀.

Um dos fatores que influenciam a remoção de (oo)cistos na filtração foi verificado por Ongerth e Hutton (2001). Os autores observaram que o início da carreira diminui a remoção de (oo)cistos na ordem de 0,5 a 1,0-log₁₀ em comparação com o período ideal de filtração (filtro maduro).

A eficiência de remoção no filtro é extremamente dependente da etapa de coagulação (DUGAN *et al.*, 2001; EMELKO, 2003). Em condições ótimas de tratamento, Dugan *et al.* (2001) obtiveram em todas as análises, remoções de *Cryptosporidium* maiores que 4-log₁₀. Emelko (2003) verificou que deficiências na coagulação, embora com água filtrada apresentando valores baixos de turbidez (0,3 uT), geraram diminuição na remoção de *Cryptosporidium parvum* em até 3-log₁₀. Portanto, não é plausível afirmar que águas com baixos valores de turbidez não possam apresentar (oo)cistos (STATES; TOMKO, 2002).

Uma série de outros estudos (DROZD; SCHWARTZBROD, 1997; HIRATA; HASHIMOTO, 1997; HIJNEN *et al.*, 2010; PAPINEAU *et al.*, 2013) aferiram a eficiência, na remoção de protozoários, em sistemas de filtração mais complexos.

3.2.4. Desinfecção

A dificuldade de inativação de cistos de *Giardia* e, principalmente de oocistos de *Cryptosporidium* pelo cloro (desinfetante comumente utilizado em ETA convencionais) (CLANCY; HARDY; DYKSEN, 1998), tem sido tema relevante para a comunidade científica e preocupado as autoridades responsáveis pelo tratamento de água.

Neste contexto, como forma alternativa de inativação, Widmer *et al.* (2002) estudaram o uso do ozônio no tratamento de águas contendo cistos de *Giardia lamblia*. Uma dosagem de 1,5 mg.L⁻¹ foi aplicada por 0, 30, 60 e 120 s. Verificou-se que após 60 s as paredes dos cistos foram danificadas diminuindo, conseqüentemente, sua capacidade de infecção.

A desinfecção por radiação ultravioleta (UV) é outro método de interesse atual. Hijnen, Beerendonk e Medema (2006) reuniram vários trabalhos e comprovaram a eficiência pelo uso da UV na inativação de (oo)cistos e outros patógenos de veiculação hídrica. A maioria dos organismos avaliados (adenovírus, esporos de bactérias e o protozoário *Acanthamoeba*) apresentou maior resistência à radiação UV do que cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*, sendo observada a inativação destes últimos com dosagens de até 20 mJ.cm⁻² com inativações de 3-log₁₀.

Segundo Bukhari *et al.* (2000), a inativação de (oo)cistos por desinfecção pode ser estimada, com maior precisão, quando realizados ensaios de infectividade animal. Neste sentido, os autores avaliaram a capacidade virulenta de oocistos de *Cryptosporidium parvum* após desinfecção com ozônio e verificaram que estes métodos são mais confiáveis (menor variabilidade) quando comparados com ensaios de excitação *in vitro*. Ainda pode-se concluir com o trabalho que não estão claros os fatores responsáveis pela diferença de resultados entre os métodos testados, contudo, podem estar relacionados à sensibilidade do ensaio, aos mecanismos de inativação dos oocistos ou à desigual distribuição dos organismos no pós-tratamento.

3.3. Preocupação Ambiental dos Resíduos de ETA

No Brasil, a grande maioria das ETA é do tipo convencional (IBGE, 2010). A maior parte de resíduos gerados neste sistema ocorre nos decantadores (ou flutadores) e filtros, contudo, flocculadores e tanques de produtos químicos também originam resíduos. (CORDEIRO, 1999; DI BERNARDO *et al*, 2011).

A responsabilidade pela geração de resíduos deve ser sempre levada em consideração. Porém, a falta de tratamento com disposição *in natura* no manancial é uma prática comum dos sistemas de tratamento de água nacionais. Segundo Parsekian (1998), no País, são poucas as preocupações com a manutenção da qualidade dos mananciais o que implica na piora da qualidade da água e aumento do uso de produtos químicos em ETA.

Segundo Di Bernardo *et al.*, (2012), o lançamento indiscriminado de resíduos de ETA em mananciais altera significativamente sua qualidade. Esta atitude implica no aumento da concentração de metais, na limitação da luminosidade do meio líquido e na redução do uso da água para dessedentação de animais e fonte de abastecimento.

A contaminação causada por esses resíduos tem piorado a qualidade da água bruta exigindo, assim, o aumento na dosagem de produtos químicos, e conseqüentemente, o acréscimo na geração de resíduos em ETA (BIDONE *et al.*, 2001).

As ETA que despejam inadequadamente os resíduos gerados em mananciais estão sujeitas às penalidades constituindo-se crime ambiental, de acordo com o artigo nº 54 da Lei 9.605/1998, que estabelece: “Causar poluição de qualquer natureza em níveis tais que resultem ou possam resultar em danos à saúde humana, ou que provoquem a mortandade de animais ou a destruição significativa da flora”.

Os estudos nacionais e internacionais no assunto são claros ao indicar que os resíduos de ETA são altamente prejudiciais ao ambiente, contudo, essa problemática em ETA é pouco estudada se comparada aos resíduos gerados em estações de tratamento de esgoto – ETEs (CORDEIRO, 1999).

3.3.1. Características do Lodo

A composição do lodo em ETA depende basicamente da qualidade da água bruta, do tipo e dosagem dos produtos químicos (por exemplo, coagulantes e adsorventes) e das diferentes formas de limpeza das unidades (CORDEIRO, 1999; DI BERNARDO; DANTAS, 2005).

Segundo Cordeiro (1999), a reunião de diversos trabalhos científicos e a comparação de vários valores medidos comprova a diversidade que o lodo pode apresentar para um mesmo parâmetro: DBO (30 a 480 mg.L⁻¹); DQO (500 a 15.000 mg.L⁻¹); pH (5,55 a 7,6); ST (1.100 a 81575 mg.L⁻¹) e SV (15 a 73 mg.L⁻¹). Esta complexidade demonstra a necessidade de resolver a problemática de resíduos quase que individualmente.

Além da medição dos parâmetros convencionais, um dos principais parâmetros que caracterizam os lodos é o tamanho das partículas. As pequenas partículas contidas no lodo dificultam a remoção da água e são responsáveis pelo aumento da resistência específica do lodo. Contudo, sabe-se pouco ao respeito, sendo, portanto, mais um problema na determinação das características do resíduo (CORDEIRO, 1999).

Segundo Richter (2009), o coagulante utilizado no tratamento influencia diretamente a geração de lodo, assim, quando sais de alumínio ou de ferro são utilizados, o lodo pode aparentar características gelatinosas, partículas inorgânicas e inorgânicas, coloides, além de microrganismos.

A necessidade de dosagens maiores de produtos químicos, em águas poluídas, pode interferir não somente no aumento da produção de resíduos – lodo e água de lavagem dos filtros (ACHON, 2008) – como também em elevadas concentrações de sólidos e metais (REALI, 1999). Neste sentido, Souza (2004) verificou que as concentrações de cromo e chumbo na água filtrada da ETA de São Carlos/SP eram 9 e 130 vezes, respectivamente, superiores às concentrações permissíveis pela legislação vigente da época (Portaria 518/2004), sendo que, não foram detectados tais metais na água bruta.

Com relação à frequência de remoção de lodo nos decantadores de ETA convencionais no Brasil, verificou-se que, em algumas estações, este procedimento pode ocorrer em intervalos de até seis meses, podendo causar acúmulo de lodo com elevada concentração de contaminantes orgânicos e inorgânicos, o que pode dificultar a

remoção e disposição final (ACHON, 2008; RICHTER, 2009). A remoção de lodo na unidade pode ser realizada por uso de raspadores mecânicos longitudinais ou rotativos, porém, a realidade de muitas estações de tratamento, ainda inclui a raspagem manual e o uso de mecanismos de esguicho de água de alta pressão, o que proporciona um contato direto dos funcionários com este resíduo, que se apresenta mais diluído (ACHON, 2008).

Reis *et al.* (2004) avaliaram a composição química (macro e micronutrientes) do lodo do decantador produzido em uma ETA. Dentre os parâmetros medidos, se destacam a DQO de 1940 mg.L⁻¹, pH entre 6,0 e 6,4 e alcalinidade de 220 mg de CaCO₃.L⁻¹. Os elementos encontrados nas amostras de lodo (Na, Mg, Ca, P, K, Fe, Al, Mn, Ba, Co, B, V, Cr, Ni, Cu, Zn, Mo, Pb, Ag e Cd) comprovam a diversidade química que este residual possui.

Ainda em relação ao compartimento de decantação, Cunha (2004) avaliou a importância da frequência de descarte de lodo na eficiência de uma ETA que abastece a região metropolitana de Belém/PA. Dentre as conclusões obtidas, foi verificado que descargas de lodo de 5 em 5 dias durante 5 minutos reduzia o gasto de água no tratamento em 47%. Além disso, sob ponto de vista da geração de resíduos e quantidade de sólidos gerados pelo lodo, esta foi considerada a rotina mais adequada.

Em cada unidade na qual ocorre a remoção de sólidos da fase líquida, o princípio de remoção, o procedimento operacional e o tipo de produto químico adicionado (eventualmente mais que um) interagem para produzir resíduos em volumes e massas diferentes. Em termos mássicos, uma ETA de ciclo completo gera a maior parte de seus resíduos nos decantadores, entretanto, em termos volumétricos essa geração é predominante nos filtros, pois demandam maior quantidade de água para sua lavagem (DI BERNARDO; DANTAS, 2005).

Entretanto, como relatado anteriormente, as características dos resíduos gerados depende de uma série de fatores, fazendo com que seja necessária a avaliação individual em cada ETA.

Achon (2008) e Januário e Ferreira Filho (2005) destacam a existência de múltiplos destinos para o lodo, tais como: i) disposição *in natura* (não desejada); ii) disposição adequada sem tratamento prévio (encaminhamento à estação de tratamento de esgoto); iii) diferentes formas de tratamento seguido da disposição adequada (aterros particulares, municipais ou exclusivos); iv) aplicação no solo para agricultura ou

recuperação de áreas degradadas; v) reciclagem e produção de material cerâmico ou cimento; vi) lançamento em esgotamento sanitário; e vii) incineração.

Segundo Januário e Ferreira Filho (2005), apesar da inerente possibilidade de disposição deste resíduo, seu uso esbarra em diversos obstáculos, tais como: i) elevado custo de transporte e ampla área requerida no caso da disposição em aterros; ii) experimentos específicos que comprovem a ausência de contaminantes no caso do uso em solos agrícolas; e iii) atender aos requisitos técnicos mínimos quando há produção de material cerâmico.

A literatura consultada indica poucos estudos envolvendo a presença de protozoários em lodos de ETA. Neste contexto, Marquez *et al.* (2005) inocularam uma quantidade significativa de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em uma ETA piloto, do tipo convencional, e verificou a presença dos patógenos em todos os compartimentos da estação. Os autores coletaram água no rio Jucú, principal fonte do sistema de tratamento da Companhia Espírito Santense de Saneamento (CESAN) e durante 8 horas de tratamento na instalação piloto, foi realizado o inóculo de 16.000 (oo)cistos na água bruta por meio de gotejamento de cerca de 100 (oo)cistos.L⁻¹. A quantidade de oocistos de *Cryptosporidium* foi superior à quantidade de cistos em todos os compartimentos, sendo que, as maiores concentrações foram encontradas no lodo do decantador (466 oocistos.L⁻¹) e na água de lavagem do filtro (120 oocistos.L⁻¹). Duas observações importantes devem ser feitas em relação a este estudo. A primeira condiz à utilização do método de detecção de Floculação em Carbonato de Cálcio e, a segunda, em relação à inutilização da separação imunomagnética (IMS).

3.3.2. Características da Água de Lavagem dos Filtros

Segundo Cordeiro (1993), a maior fração da água de lavagem dos filtros (ALF) é inorgânica e composta por areia, silte, argila e metais, o restante é constituído por substâncias húmicas e diversos organismos como, por exemplo, plânctons, bactérias, vírus e protozoários.

A lavagem dos filtros pode representar um consumo de 2 a 10% do volume total de água produzido por uma ETA. A retrolavagem dos filtros, normalmente, envolve a

aplicação de elevada vazão de água filtrada (superior à vazão de operação da ETA) com o objetivo de expandir o leito filtrante e liberar o material retido no meio. Portanto, em um curto período, um grande volume de água de lavagem é gerado. (USEPA, 2002).

Confirmando este cenário, Achon, Barroso e Cordeiro (2013), avaliaram 5 ETA e verificaram que apenas duas utilizavam água decantada para lavar seus decantadores, sendo que, em todas era empregada água tratada para limpeza dos filtros.

O elevado consumo de água filtrada para lavagem dos filtros aumenta ainda mais o interesse pelo reaproveitamento da ALF. Além do mais, grande parte da população brasileira, principalmente no sudeste, passa por dificuldades em vista à escassez de água. A possibilidade da reciclagem da ALF também diminuiria substancialmente seu lançamento nos corpos d'água, conforme descrito em USEPA (2002).

Entretanto, a prática da recirculação da ALF na ETA, atividade comum no Brasil, representa uma série de riscos que podem comprometer o tratamento de água e a saúde da população.

Neste sentido, Freitas *et al.* (2010) avaliaram o risco associado à reintrodução da ALF em relação à presença de protozoários em um sistema de escala piloto. Os autores detectaram, em média, a presença de 0,9 cistos.L⁻¹ de *Giardia* e 3,57 oocistos.L⁻¹ de *Cryptosporidium* na ALF. Eles também realizaram diversos ensaios de recirculação da ALF (não clarificada, clarificada com polímero catiônico e sem polímero catiônico) com variação da taxa de recirculação (5 – 20%) e inferiram que há riscos de reintrodução de protozoários no sistema de tratamento testado. Os autores ainda concluíram que o uso de polímero no processo de clarificação pode minimizar os riscos de reintrodução dos patógenos no sistema de tratamento e, recomendaram a continuidade dos estudos em detrimento do aumento da carga de (oo)cistos no meio filtrante e o impacto da recirculação da ALF.

Braga *et al.* (2006) verificaram um incremento significativo na concentração de (oo)cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium* na ALF obtida na lavagem dos dois filtros pertencentes a ETA de Ciclo Completo da Universidade Federal de Viçosa em comparação com a água bruta introduzida no sistema de tratamento. O aumento anotado foi de 4,6 e 18,8 vezes para oocistos de *Cryptosporidium* e de 22,8 e 6,7 vezes para cistos de *Giardia* na ALF do primeiro e do segundo filtro, respectivamente.

Muitas vezes decide-se recircular a ALF depois de comprovado que as características do efluente não impactam de forma negativa o sistema de tratamento.

Com esse objetivo, Scalize e Di Bernardo (2000) caracterizam a ALF da Estação de Tratamento de Água de São Carlos (ETA SC) após a clarificação do resíduo com uso de polímero aniônico. Os resultados indicaram que a recirculação da ALF poderia ser realizada, pois os valores de turbidez, sólidos suspensos totais (SST) e coliformes do sobrenadante decorrente da clarificação foram superiores aos medidos na água bruta. Entretanto, cistos, ovos e larvas de parasitas patogênicos foram encontrados em concentrações superiores às avaliadas na água bruta, o que indica a necessidade de desinfecção do clarificado caso seja de interesse a recirculação da ALF clarificada.

No cenário brasileiro, atualmente, não há norma ou legislação referente ao tratamento e recirculação de ALF em ETA. Contudo, é de interesse dos sistemas de saneamento reduzir gastos e melhorar a eficiência de recirculação deste impactante efluente (CAMPOS, 2014).

Embora com poucas pesquisas, nacionais e internacionais sobre o assunto, é evidente o impacto negativo da recirculação de ALF em ETA quando existem suspeitas da presença de (oo)cistos. Destaca-se, que em grande parte dos trabalhos consultados (FREITAS *et al.*, 2010; BRAGA *et al.*, 2006; MARQUEZ *et al.*, 2005) foi utilizada a floculação em carbonato de cálcio descrita por Vesey *et al.* (1993) para a detecção de (oo)cistos nas amostras.

3.4. Aplicação do Cloreto de Polialumínio (PAC) Como Coagulante

Produzido na década de 1990, o cloreto de polialumínio é um coagulante de caráter inorgânico catiônico e polimérico, amplamente conhecido como PAC. No Brasil, o produto pode ser facilmente adquirido no mercado na forma solúvel ou em pó. (DI BERNARDO *et al.*, 2003). Atualmente, a aplicação de PAC como coagulante tem sido mais frequente no tratamento de águas de abastecimento, como, por exemplo, em ETA de filtração direta (BARBOSA; MENDES; BAYLÃO, 2003) e aquelas que apresentam limitações operacionais em seus sistemas de pré-alkalinização (FERREIRA FILHO; WAELENS, 2009b).

Muitas vezes a eficiência do tratamento de água para consumo pode ser comprometida pelo simples fato da escolha incorreta do coagulante. Diante desta perspectiva, o PAC está entre os coagulantes que mais despertam interesse das

companhias responsáveis pelo tratamento de água. Dentre suas características, segundo Di Bernardo *et al.* (2003), a estabilidade de suas formas hidrolisadas proporciona uma melhor eficiência na desestabilização e consequente remoção de partículas no processo de coagulação, ocorrendo de forma mais acelerada e de consumo reduzido de coagulante se comparado, por exemplo, com os efeitos produzidos pelo sulfato de alumínio.

Segundo Santos (2011), o uso de PAC em substituição do sulfato de alumínio demonstrou ser vantajoso quando aplicado na ETA Casemiro de Abreu no estado do Rio de Janeiro. Dentre os resultados obtidos, destaca-se o maior poder de coagulação/floculação do PAC, reduzindo consideravelmente os valores de turbidez com diminuição, em 30%, do consumo de alcalinizante.

A aplicação de PAC em sistemas de tratamento de água também é atraente devido às características químicas que possibilitam a redução de lodo se comparado com os coagulantes tradicionalmente utilizados. Neste contexto, Ferreira Filho e Waelkens (2009b) compararam o desempenho do PAC e do sulfato de alumínio na produção de lodo. Os resultados indicaram que os coagulantes testados produziram quantidades de lodo semelhantes quando aplicados em uma mesma dosagem em termos de Al.

Em contrapartida, um estudo realizado por três meses em uma ETA da Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento – SANASA de Campinas/SP, em parceria com uma indústria produtora de PAC, apresentou resultados positivos no emprego do coagulante, tais como: i) diminuição do lodo gerado em decorrência do menor consumo de coagulante e alcalinizante; ii) redução do custo da água clarificada em praticamente 20% e; iii) economia do uso de cal hidratada superior a 50% (TOLEDO, 2005).

Dalsasso e Sens (2006) avaliaram o emprego de sulfato de alumínio e PAC em uma ETA de filtração direta descendente. O estudo foi realizado de forma a avaliar as características do tratamento. A água bruta da ETA, apesar de apresentar valores de cor aparente e turbidez inferiores a 20 Pt-Co e 10 uT, respectivamente, passou a apresentar elevados picos de fitoplâncton (100.000 a 250.000 indivíduos.mL⁻¹). Os resultados indicaram que o uso do PAC gerou melhores resultados em uma ampla faixa de pH. Além disso, houve redução no consumo de água utilizada para limpeza dos filtros de 23,8% para 5,5% e a água filtrada apresentou uma melhor qualidade em termos de turbidez, cor aparente e alumínio residual.

A vantagem da aplicação do PAC ocorre, na maior parte dos casos devido à maior concentração de elemento ativo se comprado aos outros coagulantes (LOPES *et al.*, 2009).

3.5. Ensaio de Tratabilidade da Água

A definição dos parâmetros utilizados no tratamento de água é indispensável ao funcionamento adequado de um sistema de abastecimento. Diante desta lógica, os ensaios de tratabilidade e, se possível, combinados com testes em instalação piloto, são fundamentais para estabelecer, com critério, os principais parâmetros de projeto a serem utilizados no dimensionamento de uma ETA.

Conforme Di Bernardo e Dantas (2005) e Libânio (2008), a realização dos ensaios de tratabilidade permite definir as melhores dosagens de produtos químicos (coagulantes, alcalinizantes e acidificantes) e as faixas de pH de melhor desempenho do coagulante. Igualmente, são estabelecidos os gradientes médios de velocidade e os tempos de mistura rápida e lenta, as velocidades de sedimentação e as características da filtração, bem como é possível ponderar as particularidades dos resíduos gerados.

O equipamento de Jarreste, amplamente utilizado para determinação destes parâmetros, possui 6 jarros de jarreste com capacidade de 2 L, paletas de agitação controladas por motor de rotação, tacômetro digital com visor que possibilita o controle dos tempos e a velocidade de mistura, além de saídas que permitem a coleta de água para avaliação dos ensaios como um todo (Figura 3.1).

Figura 3.1 - Aparelho de Jarteste com *kit* de filtros de laboratório

O Jarteste é um aparelho de escala de laboratório que trabalha em batelada, no qual são realizados os processos e operações de coagulação (mistura rápida), floculação (mistura lenta), decantação e também filtração, sendo que, no caso deste último, há necessidade de filtros de laboratório (DE JULIO *et al.*, 2009). A metodologia para execução dos ensaios de tratabilidade está descrita em (DI BERNARDO; DANTAS; VOLTAN, 2011).

3.6. Ensaios Hidrodinâmicos

O ensaio hidrodinâmico permite avaliar o desempenho de reatores não ideais tendo em vista sua aplicação em otimização de processos, permitindo a detecção de problemas em unidades em escala de laboratório, piloto ou até mesmo real.

Os elementos constituintes de um fluido atravessam os reatores, na grande maioria dos casos, com velocidades diferentes. Portanto, são necessários diferentes tempos para que estes elementos percorram todo o reator e a distribuição deste tempo é denominada distribuição do tempo de residência - DTR (PEGORARO, 2012).

A DTR é uma das principais ferramentas do ensaio hidrodinâmico, pois possibilita aferir quantitativamente a presença de anomalias presentes em um reator, tais como zonas mortas, caminhos preferenciais, curto-circuito, recirculação do fluido e retromistura (LEVENSPIEL, 2000).

As curvas DTR são comumente obtidas em ensaios de estímulo-resposta. Elas são originadas pela injeção de determinado composto inerte (traçador) que promove a perturbação do meio na corrente afluyente e sua resposta é medida na corrente efluente (LEVENSPIEL, 2000).

O traçador deverá ser facilmente detectável, ser uma espécie não reativa, não ser adsorvido em superfícies dentro do reator, ser altamente solúvel quando inserido no fluido e possuir características físicas semelhantes à do material em estudo (FOGLER, 2002). Os traçadores habitualmente utilizados são sais, corantes, materiais radiativos, ácidos e bases (RAO; LONCIM, 1974).

As formas comumente conhecidas para injeção de traçador são em degrau, em pulso, periódica ou aleatória (LEVENSPIEL, 2000). No caso da injeção tipo pulso, uma quantidade conhecida de traçador é injetada (sem dispersão) na corrente afluyente do sistema, em um tempo minimamente curto ($t=0$) (FOGLER, 2002). Entre os traçadores amplamente utilizados na determinação da DTR está o cloreto de sódio (NaCl). Esse traçador é usualmente utilizado devido ao seu baixo custo, alta dissolubilidade, não é tóxico, de fácil medição e aquisição no mercado. Após a injeção, a medição de diversas concentrações do traçador na corrente efluente possibilita a avaliação da DTR e, consequentemente, a análise do reator em questão.

Vale ressaltar que somente a análise visual da DTR permite avaliar a presença de anomalias (Figura 3.2). Apesar de qualitativa, esta análise pode fornecer informações de extrema relevância para a análise do sistema.

Figura 3.2 - Análise visual de anomalias em curvas DTR: (a) se aproxima do escoamento tubular com curva posicionada corretamente; (b) aparecimento prematuro do traçador indicando canalização ou regiões de estagnação no reator; (c) recirculação do fluido do reator; (d) traçador aparece mais tarde do que esperado (possibilidade de erro de medição de vazão, erro no volume disponível ou o traçador não é inerte); (e) canalização por dois caminhos paralelos (Adaptado de Levenspiel (2000)).

Ao final da revisão bibliográfica, pode-se ordenar a realização da pesquisa, sendo que, em um primeiro momento, foram realizados os ensaios de tratabilidade em Jarteste, sem inóculo de protozoários, de forma a obter: i) as condições adequadas para uso do coagulante PAC; ii) os parâmetros otimizados de tratamento; iii) as características dos resíduos (sedimentado e ALF) e; iv) a real forma de filtração conforme ensaios hidrodinâmicos. E em um segundo momento foram realizados os ensaios de tratabilidade em Jarteste com inóculo de protozoários, em que foram avaliados os diversos métodos de detecção dos (oo)cistos, em que foram selecionados para uma avaliação estatística. E finalmente foi realizada a avaliação do controle de qualidade do(s) método(s) adequado(s) de acordo com o Método 1623.1 da USEPA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida na Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo – EESC/USP. O Laboratório de Tratamento Avançado e Reuso de Água (LATAR) e o Laboratório de Saneamento, ambos pertencentes ao Departamento de Hidráulica e Saneamento (SHS), foram utilizados para desenvolver as atividades descritas a seguir.

4.1. Preparo da Água de Estudo

O preparo da água de estudo consistiu na determinação da concentração de caulinita que seria adicionada à água coletada do poço na EESC/USP. A forma com que foi realizado tal procedimento está descrita nos itens que seguem.

4.1.1. Captação, Armazenamento e Caracterização da Água do Poço

Cerca de 3000 L de água do poço da EESC/USP foram captadas e armazenadas. O armazenamento foi feito em uma caixa d'água previamente lavada e desinfetada com hipoclorito de sódio.

A água do poço foi caracterizada efetuando-se a medição de pH, alcalinidade total, condutividade elétrica, cor aparente, turbidez, temperatura e dureza. Os métodos analíticos adotados e os equipamentos utilizados estão descritos no Apêndice A.

4.1.2. Determinação da Concentração de Caulinita

Um ensaio foi realizado com o objetivo de se estimar uma relação de massa de caulinita por volume de água de estudo para que a turbidez desejada fosse atingida. Seis diferentes porções de caulinita foram previamente pesadas em balança analítica e adicionadas aos jarros do aparelho de Jarteste com o objetivo de atingirem concentrações de caulinita de 0,1; 0,12; 0,14; 0,16; 0,18; e 0,2 g.L⁻¹. A água com caulinita foi mantida sob agitação a 200 rpm (295,5 g a 25°C) durante 2 horas. Após este período, realizou-se a leitura dos valores de turbidez das misturas de cada jarro. O ensaio foi realizado em triplicata, conforme Di Bernardo, Dantas e Voltan (2011).

4.1.3. Preparo da Água de Estudo Mediante Homogeneização Manual

A homogeneização da água de estudo foi realizada inicialmente de forma manual. A preparação da água de estudo teve início com a coleta de 180 L de água do poço armazenada na caixa d'água descrita anteriormente. O volume era coletado por meio de galões de 20 L e transferido para uma bombona com capacidade de 200 L, previamente desinfetada com hipoclorito de sódio e devidamente lavada com água deionizada.

A massa de caulinita a ser adicionada era calculada conforme estipulado na Equação 1.

$$Caulinita = Conc_{caulinita} \times Vol_{bombona} \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

$Caulinita$ = Massa de caulinita a ser adicionada na bombona (g);

$Conc_{caulinita}$ = Concentração de caulinita (g.L⁻¹);

$Vol_{bombona}$ = Volume de água na bombona (L).

A caulinita foi adicionada à água do poço e homogeneizada manualmente por 10 minutos. Amostras eram coletadas para realização dos ensaios de tratabilidade. Em função da alteração da turbidez ao longo dos ensaios, a forma como era realizada a homogeneização da água foi modificada por um misturador mecanizado.

4.1.4. Preparo da Água de Estudo Mediante Homogeneização Mecânica

A água de estudo, preparada conforme Equação 1, era homogeneizada por 25 min utilizando agitador mecanizado. A rotação da hélice era controlada por um inversor de frequência. Ao longo dos ensaios era necessário diminuir a rotação em função do nível de água remanescente (Figura 4.1).

Figura 4.1 - Itens utilizados no preparo da água de estudo com agitação mecanizada.

4.2. Ensaios de Tratabilidade

Os ensaios de tratabilidade foram realizados em Jarreste, conforme metodologia de Di Bernardo, Dantas e Voltan (2011). Através deste aparelho (Apêndice B), foram simulados, em escala de bancada, os processos e operações de coagulação, floculação, decantação e filtração.

Com o objetivo de caracterizar a água de estudo, alguns parâmetros como temperatura, turbidez, pH, cor aparente, alcalinidade, dureza, coliformes totais e diversos metais foram determinados conforme procedimentos indicados no Apêndice A.

4.2.1. Diagrama de Coagulação

Diversos ensaios de tratabilidade foram realizados, utilizando cloreto de polialumínio (PAC) como coagulante. O PAC utilizado nos ensaios foi fornecido pela empresa Quimisa S/A e possuía as seguintes especificações: densidade de $1,350 \text{ mg.L}^{-1}$ e teor de alumínio de 16,36% na forma de Al_2O_3 .

Os testes consideraram a adição ou não de alcalinizante (NaOH). A turbidez foi o principal parâmetro de controle da eficiência do tratamento.

Sete ensaios preliminares foram realizados e alguns parâmetros foram fixados (Tabela 4.1). Os valores foram adotados conforme os resultados obtidos, pelo uso de PAC, reportados por Pavanelli (2001), Corrêa *et al.* (2005), De Julio, Fioravante e Graham (2010) e Ferrari, De Julio e De Julio (2011).

Tabela 4.1 - Valores fixados nos sete ensaios preliminares.

Parâmetros	Unidades	Valores adotados
Gradiente de mistura rápida	s^{-1} ou rpm	1000 ou 500
Tempo de mistura rápida	s	15
Gradiente de mistura lenta	s^{-1} ou rpm	25 ou 35
Tempo de mistura lenta	min	20
Velocidades de sedimentação	cm.min^{-1}	2,5; 2,0; e 1,5

O diagrama de coagulação foi construído e, desta forma, a dosagem ótima de coagulante (PAC) e o pH ótimo de coagulação foram determinados. Após esta etapa, os parâmetros de mistura rápida, mistura lenta e decantação foram otimizados conforme metodologia de Di Bernardo, Dantas e Voltan (2011).

4.2.2. Potencial Zeta

O potencial zeta foi medido conforme APHA (2012) depois de otimizados os parâmetros de tratabilidade.

4.2.3. Adequações nos Filtros de Laboratório Acoplados ao Jarteste

Depois de serem definidas as condições ótimas de tratamento foi empregado o *kit* de filtros de laboratório de areia – FLA. A granulometria dos grãos foi estabelecida entre 0,30 a 0,59 mm e tamanho efetivo de 0,42 mm, de acordo com as recomendações de Di Bernardo, Dantas e Voltan (2011). Os FLA são constituídos por tubos acrílicos de 19 mm de diâmetro interno com 40 cm de altura, e possuem malha metálica como suporte do meio filtrante (Figura 4.2).

Figura 4.2 - Detalhes dos filtros de laboratório de areia (FLA).

Os filtros eram preenchidos com 15 cm de areia. A areia era higienizada, conforme indicado na Figura 4.3, considerando os seguintes passos: i) uma porção do material era colocada em um béquer de 2 L; ii) cerca de 1 L de água da torneira era adicionado; iii) a mistura era agitada manualmente pelo uso de uma pequena vassoura por 30 s e deixava-se em repouso por 1 min; iv) o sobrenadante ao resíduo era descartado vertendo-se o béquer; v) os passos ii), iii) e iv) eram repetidos até o momento em que fosse gerado um sobrenadante visualmente límpido; e vi) a areia era então colocada na estufa a aproximadamente 110 °C durante 24 h.

Figura 4.3 - Procedimentos adotados na lavagem da areia antes de ser adicionada nos filtros.

A taxa de filtração foi controlada conforme recomendações de Di Bernardo, Dantas e Voltan (2011). Contudo, adaptações foram necessárias conforme indicado na Figura 4.4. A taxa máxima de filtração foi adotada em $20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ($100 \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$).

No controle da taxa de filtração, os jarros eram preenchidos com água da torneira até a marcação de 2 L e todos os registros eram fechados, exceto o do primeiro jarro. Os coletores dos jarros eram vertidos e com o uso de uma proveta graduada, media-se o volume coletado no primeiro jarro por 1 min. Caso o volume fosse diferente a 20 mL, regulava-se o registro e efetuava-se nova medição. Vale destacar que a cada medição era preciso preencher novamente o jarro com água da torneira até a marcação

“zero”, procurando garantir uma carga hidráulica constante. Depois de definida a abertura correta do primeiro registro para obtenção da vazão desejada, repetia-se o procedimento nos registros dos outros jarros que seriam utilizados no tratamento.

Figura 4.4 - Adaptações nos jarros de Jarteste e nos filtros (FLA) visando controlar a taxa de filtração.

Algumas imagens apresentadas na Figura 4.5, ilustram o preparo dos filtros antes de se iniciar o processo de lavagem da areia por filtração.

O preparo dos filtros era realizado como descrito nos passos a seguir: i) um cone plástico era acoplado à parte superior do filtro e, com uma colher, adicionava-se areia limpa e seca até a marcação de 15 cm; ii) o cone era removido e, posteriormente, o filtro

era retirado do suporte e com uma seringa plástica de 60 mL, efetuava-se a lavagem ascendente do meio filtrante com o objetivo de estratificar o leito, evitando a formação de bolsões de ar (Figura 4.5-A); iii) a lavagem ascendente era repetida mais duas vezes acomodando-se a areia no meio filtrante até atingir a marcação de 15 cm; iv) analisava-se a presença de bolsões de ar (Figura 4.5-B), caso existissem, o filtro estava preparado para uso, caso contrário repetia-se a lavagem ascensional. Era imprescindível que o meio filtrante fosse mantido com água, do contrário, bolsões de ar eram formados e o processo de preparo do filtro deveria ser todo repetido. Finalmente, colocava-se água até a primeira marcação no filtro que estava pronto para ser utilizado no ensaio de tratabilidade (Figura 4.5-C). O procedimento era repetido para os outros filtros, quando utilizados (Figura 4.5-D).

Legenda: A – Estratificação do leito; B – Da esquerda para direita: filtro sem bolsões de ar e filtro com bolsões de ar; C – Preenchimento de água até a primeira marcação no filtro; D – Filtros prontos para serem utilizados.

Figura 4.5 - Preparo dos filtros FLA para realização dos ensaios de tratabilidade em que era requerida a filtração.

O controle de vazão de saída de água nos jarros era feito de forma semelhante ao controle de vazão de saída de água nos filtros, sempre com o objetivo de ajustar a taxa de filtração.

Depois de realizado o procedimento de preparo dos filtros, iniciava-se o tratamento da água. A água filtrada, gerada em cada filtro, era armazenada em seus respectivos béqueres de 1 L.

4.2.4. Ensaio Hidrodinâmico

Além de manter as condições adequadas no momento da filtração também foi averiguado se o filtro estava operando em fluxo pistonado, conforme Levenspiel (2000).

O ensaio hidrodinâmico considerou a aplicação de sal (NaCl) na forma de pulso. O sal foi utilizado devido ao seu baixo custo e fácil manuseio. A concentração de sal na água filtrada era feita por uma sonda de condutividade com interface Go!link. (Figura 4.6).

Figura 4.6 - Detalhes do ensaio hidrodinâmico.

Uma solução mãe de sal foi preparada com concentração de 50.000 mg.L^{-1} e estabeleceu-se que o nível da coluna de água deveria ser de 17 cm. Este nível foi mantido durante o ensaio com o auxílio de registros. A mangueira posterior ao filtro foi desconectada e com o uso de uma proveta graduada, mediu-se o volume de 50 mL de

água presente no filtro. Tal volume representava o volume da coluna de água somado ao volume de água entre os grãos de areia.

A medição do volume foi essencial para a realização do ensaio hidrodinâmico, pois 50 mL representava o volume em que o pulso de sal seria adicionado no momento da filtração. A verificação desse volume foi feita conforme Equação 2:

$$Vol_{teórico} = \frac{\pi \times \phi_i^2 \times h_{col.água}}{4} \quad \text{Equação 2}$$

Em que:

$Vol_{teórico}$ = Volume teórico de água na coluna de água (mL);

ϕ_i = Diâmetro interno do filtro (cm);

$h_{col.água}$ = Altura da coluna de água no filtro (cm).

O volume do pulso que deveria ser inserido ao filtro foi calculado conforme descreve a Equação 3. Para tanto, foi estabelecida uma concentração de sal desejada de 100 mg.L⁻¹, segundo recomendação indicadas em Levenspiel (2000).

$$Vol_{pulso} = \frac{Conc_{desejada} \times Vol_{filtro} \times 1000}{Conc_{pulso}} \quad \text{Equação 3}$$

Em que:

Vol_{pulso} = Volume de solução mãe (μL);

$Conc_{desejada}$ = Concentração desejada (mg.L⁻¹);

$Conc_{pulso}$ = Concentração do pulso (mg.L⁻¹);

Vol_{filtro} = Volume de água no filtro (mL).

O ensaio hidrodinâmico era iniciado logo após a inserção do pulso na superfície da coluna de água por meio de uma micropipeta automática e, logo em seguida, iniciava-se a filtração e a medição da sonda. A cada 3 s era feita uma medição da concentração, sendo possível observar a construção do gráfico no monitor da concentração versus tempo (Figura 4.6-C).

A curva da distribuição do tempo de residência (DTR) foi realizada conforme as equações descritas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Definição das variáveis utilizadas no ensaio hidrodinâmico

Variável	Sigla	Definição
Distribuição do tempo de residência (DTR) medido	$E(t)$	$\frac{C(t)}{\int_0^\infty C(t)dt}$
Tempo de residência médio	$\bar{\theta}_h$	$\int_0^\infty t \cdot E(t)dt$
Tempo de residência adimensional	θ	$\frac{t}{\bar{\theta}_h}$
Distribuição do tempo de residência (DTR) em função do tempo de residência adimensional	E_θ	$\bar{\theta}_h \cdot E(t)$
Variância na curva DTR	σ^2	$\int_0^\infty (t - \bar{\theta}_h)^2 \cdot E(t)dt$
Variância adimensional na curva DTR	σ_θ^2	$\frac{\sigma^2}{(\bar{\theta}_h)^2}$

Legenda: C: concentração; e t: tempo. **Fonte** – Levenspiel (2000).

A partir da definição da curva DTR foram aplicados os modelos hidrodinâmicos conforme a Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Modelos hidrodinâmicos aplicados

Modelo	Parâmetro	Equação
Pequena dispersão	$\frac{D}{uL} = \frac{\sigma_\theta^2}{2}$	$E_\theta = \frac{1}{2 \cdot \sqrt{\pi \left(\frac{D}{uL}\right)}} \exp \left[-\frac{(1 - \theta)^2}{4 \cdot \left(\frac{D}{uL}\right)} \right]$
Grande dispersão	$\sigma_\theta^2 = 2 \left(\frac{D}{uL}\right) + 8 \left(\frac{D}{uL}\right)^2$	$E_\theta = \frac{1}{2 \cdot \sqrt{\pi \left(\frac{D}{uL}\right)}} \exp \left[-\frac{(1 - \theta)^2}{4 \cdot \theta \cdot \left(\frac{D}{uL}\right)} \right]$
N-CSTRs em série	$N = \frac{1}{\sigma_\theta^2} = \frac{(\bar{\theta}_h)^2}{\sigma^2}$	$E_\theta = \frac{N(N \cdot \theta)^{N-1}}{(N-1)!} \exp(-N \cdot \theta)$

Legenda: D/uL: número de dispersão.

A análise da qualidade do ajuste dos modelos matemáticos aos dados obtidos experimentalmente foi feita a partir da análise do coeficiente de determinação (R^2), fornecido pela Equação 4.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n [(E_{\theta})_{\text{real}} - (E_{\theta})_{\text{estimado}}]^2}{\sum_{i=1}^n [(E_{\theta})_{\text{real}} - (E_{\theta})_{\text{médio}}]^2} \quad \text{Equação 4}$$

4.3. Avaliação das Características dos Resíduos Gerados em Ensaios de Jarteste

Após o término de cada ensaio de Jarteste, diversas amostras eram geradas, dentre elas os resíduos. Primeiramente foi preciso estabelecer procedimentos para separar tais amostras de resíduos e posteriores análises foram realizadas.

4.3.1. Seleção de Amostras Após Ensaio de Tratabilidade da Água de Estudo

Finalizado o tratamento de água, verificou-se que o resíduo sedimentado no jarro apresentava características visualmente distintas à parcela de sobrenadante ao resíduo, como pode ser observado na Figura 4.7. Portanto, foi adotado que a amostra ‘resíduo sedimentado’ deveria ser separada da amostra ‘sobrenadante ao resíduo’, sempre mediante sifonamento da parcela sobrenadante.

O procedimento de sifonamento iniciava-se pela cuidadosa introdução de uma das extremidades de uma mangueira flexível ao jarro, sempre evitando que o fundo do jarro fosse tocado, assim, o resíduo não seria perturbado. Depois da inserção da mangueira, com o auxílio de uma seringa plástica conectada à outra extremidade da mangueira, dava-se início ao sifonamento. Eram sifonados, aproximadamente, 900 mL de água sobrenadante ao resíduo. Este volume era armazenado em um béquer de 2 L e realizavam-se as devidas análises.

Figura 4.7 - Separação das amostras após ensaio de tratabilidade.

Os resíduos sedimentados no jarro eram homogeneizados manualmente por movimentos circulares do jarro e eram transferidos vertendo o material para um béquer de 1 L. Com uma pisseta, efetuavam-se duas lavagens nas paredes do jarro com água deionizada. O material resultante da lavagem era reagrupado ao béquer contendo a amostra de resíduo sedimentado. Depois de efetuados tais procedimentos, as amostras ‘resíduo sedimentado’ e ‘sobrenadante ao resíduo’ eram selecionadas e posteriormente analisadas.

Para obtenção da água de lavagem dos filtros (ALF) a areia era removida dos respectivos filtros FLA e algumas lavagens eram realizadas. Para tanto, as seguintes etapas eram efetuadas: i) o filtro era vertido em direção a um béquer e, após remoção da mangueira conectada ao filtro, transferia-se a areia para o béquer; ii) o filtro era então

lavado com água deionizada por meio de uma seringa plástica; iii) 250 mL de água deionizada eram introduzidos no béquer e com uma pequena vassoura era promovida a agitação da areia; iv) aguardava-se a sedimentação da areia por 1 min; e v) vertia-se a água da lavagem de areia para um novo béquer sempre evitando a transferência da areia. Tal procedimento era executado 4 vezes e ao final, 1 L de ALF era obtido.

Caso houvesse mais jarros utilizados no ensaio de Jarteste e caso fosse de interesse analisar as amostras ‘água filtrada’, ‘resíduo sedimentado’, sobrenadante ao resíduo’ e ‘ALF’, dever-se-ia repetir os procedimentos de separação das parcelas para obtenção das amostras em questão (Figura 4.8).

Figura 4.8 - Amostras geradas no jarteste. Da esquerda para a direita: resíduo sedimentado, ALF, sobrenadante ao resíduo (2 béqueres) e água filtrada.

4.3.2. Sólidos Sedimentáveis em Cone *Imhoff*

A análise de sólidos sedimentáveis em cone *Imhoff* foi realizada para as amostras de resíduo sedimentado e de ALF. Devido ao pouco volume de resíduo sedimentado gerado em cada jarro, reuniram-se as amostra dos seis jarros e obteve-se um volume de 1 L. A amostra de ALF representava 6 L, obtidos pela reunião do efluente dos seis FLA. Entretanto, somente 1 L de ALF foi necessário para o ensaio, assim, mediante prévia homogeneização da amostra composta em agitador magnético, 1 L de ALF foi coletado e transferido ao cone *Imhoff*. A amostra de resíduos sedimentados também foi homogeneizada antes de ser submetida ao ensaio (Figura 4.9).

Legenda: A – Da esquerda para a direita: amostra de resíduo sedimentado e de ALF; B – Homogeneização da amostra de resíduo sedimentado em agitador magnético; C – Início da análise de sólidos sedimentáveis (da esquerda para a direita: ALF e resíduo sedimentado); D – Sedimentação dos sólidos de ambas as amostras após 4min; E – Sedimentação dos sólidos de ambas as amostras após 1 h; F – Sedimentação dos sólidos da amostra de resíduo sedimentado após 8 h; G – Sedimentação dos sólidos da amostra de resíduo sedimentado após 12 h.

Figura 4.9 - Análise de sólidos sedimentáveis em cone *Imhoff* das amostras de resíduo sedimentado e ALF.

De acordo com APHA (2012), 1 L das amostras era transferido para o respectivo cone *Imhoff* e em seguida, era iniciada a sedimentação dos sólidos por uma hora. O tempo de sedimentação era marcado por meio de um cronômetro. Inicialmente, a cada minuto era anotado o volume sedimentado. Depois de 35 min de sedimentação, passou-se a anotar o volume sedimentado a cada 5 min até completar 1 h de sedimentação. Após 45 min, os cones foram submetidos a suaves rotações nos sentidos horário e anti-horário por algumas vezes. Este procedimento permitia o desprendimento dos sólidos

aderidos às paredes dos cones. O movimento era efetuado cuidadosamente evitando que os sólidos já sedimentados não fossem ressuspensos.

Com o objetivo de simular a compactação dos sedimentos em um decantador real de alta taxa, os cones permaneceram em repouso por 24 horas e algumas anotações de volume de sólidos sedimentados foram feitas. Determinou-se o tempo de sedimentação de no mínimo 12 h nos jarros.

4.3.3. Sólidos Totais

Os cadinhos, previamente nomeados, eram calcinados a 550°C por uma hora em mufla. Decorrido o tempo, aguardava-se o esfriamento dos cadinhos sem que fosse aberta a porta da mufla. Depois, os cadinhos eram transferidos para a estufa e posteriormente para o dessecador, onde repousavam por 20 min. Decorrido o tempo estipulado, anotava-se a massa de cada cadinho, prontos para receber as diferentes amostras (Figura 4.10).

Figura 4.10 - Equipamentos e materiais utilizados para análise de sólidos totais.

Enquanto os cadinhos repousavam no dissecador a homogeneização das amostras (sobrenadante ao resíduo, resíduo sedimentado, ALF e água filtrada) era realizada em agitador magnético por, no mínimo, 10 min. As amostras eram então mantidas em agitação e com os cadinhos localizados nas proximidades, pipetava-se 50 mL de cada amostra – exceto para a amostra de resíduo sedimentado, onde o volume foi de 100 mL – e transferia-as para os respectivos cadinhos. O procedimento era repetido mais duas vezes de forma a ser feita a análise de sólidos em triplicata.

4.3.4. Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Conforme Método 5220 (APHA, 2012) a análise de DQO foi realizada em triplicata, utilizando em cada uma delas, 2 mL de amostra.

4.4. Teste, em Laboratório, de Diferentes Métodos de Detecção de (Oo)cistos de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium parvum* nos Resíduos Gerados Após o Tratamento de Água com Turbidez Elevada

Uma série de Métodos foram testados com o objetivo de avaliar a recuperação de (oo)cistos de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium parvum* em águas com turbidez elevada. Na sequência, podem ser observados os detalhes dos ensaios de tratabilidade com inóculo de protozoários, os diversos métodos de detecção testados e os detalhes dos procedimentos laboratoriais.

4.4.1. Ensaios de Tratabilidade da Água de Estudo com Inóculo de Protozoários

Antes de serem iniciados os ensaios de tratabilidade com inóculo de protozoários deveria ter sido realizado o controle de qualidade analítica do método, conforme descreve o Método 1623.1. Contudo, por não haver um método específico para análise de protozoários em resíduos de ETA, diversos métodos descritos na literatura foram testados. Desta forma, a partir do momento em que a recuperação de protozoários estivesse dentro dos padrões estabelecidos pelo Método 1623.1 seria realizado o controle de qualidade. As devidas adaptações foram realizadas em função do volume de resíduo gerado no Jarteste.

Os ensaios de tratabilidade contendo o inóculo dos (oo)cistos de protozoários, foram realizados utilizando o ponto “ótimo” selecionados no diagrama de coagulação juntamente com os parâmetros otimizados.

Para que fossem iniciados os ensaios de Jarteste contendo protozoários, era preciso determinar a quantidade de (oo)cistos inoculados. Para tanto, realizava-se o procedimento descrito no item a seguir.

Ao final de todos os ensaios de tratabilidade com inóculo de protozoários, as amostras eram devidamente armazenadas e desinfetadas com hipoclorito de sódio antes dos descartes finais. Além disso, béqueres, pipetas de vidro, jarros de Jarteste, entre

outros materiais reutilizáveis, eram desinfetados antes de serem reutilizados em novos ensaios.

4.4.2. Inóculo de Protozoários

Primeiramente foram utilizadas duas cepas de protozoários adquiridas da Waterborne (New Orleans – LA , EUA): (i) a cepa de *Giardia lamblia* com cerca de 1×10^6 cistos vivos e armazenados em 4 mL de PBS e (ii) a cepa de *Cryptosporidium parvum* com cerca de 1×10^6 de oocistos inativados e armazenados em 4 mL de formalina a 5,0%. Mais detalhes das cepas podem ser observados no Apêndice C.

Posteriormente, a cepa de suspensão comercial da Waterborne contendo cistos de *Giardia lamblia* foi substituída pela cepa de suspensão purificada adquirida na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) contendo cerca de $0,2 \times 10^6$ cistos vivos de *Giardia* spp. A mudança de cepa foi realizada devido à alguns problemas, tais como a formação de aglomerados de cistos e consequente dificuldade na contagem dos cistos da cepa americana, que era purificada em gradiente de densidade a partir de fezes de indivíduos infectados.

Em função da dificuldade analítica, alguns procedimentos foram descritos em etapas sequencialmente enumeradas. O primeiro procedimento, denominado *Procedimento 1 – Determinação da Concentração de Protozoários em Cepas para Posterior Inóculo*, descreve como era determinada a concentração dos (oo)cistos em suas respectivas cepas e também nos respectivos inóculos. A Figura 4.11 facilita a compreensão do procedimento.

Legenda: A – Cepas de *G. lamblia* e *C. parvum* vedadas com para-filme; B – Homogeneização da cepa em vórtex, ora em posição original ora em posição invertida; C – Da esquerda para direita: coleta das alíquotas e sua adição aos poços das lâminas; D – De cima para baixo: alíquotas “molhadas” e alíquotas secas; E – Vedação da cepa com para-filme; F – Adição de metanol; G – Câmara úmida e escura preparada; H – De cima para baixo: adição de contra corante e visualização de coloração rosada; I – Da esquerda para direita: solução tampão 20x e lavagem da lâmina com solução diluída 1x; J – Adição de meio de montagem; K – Colocação da lamínula sobre a amostra; L – Da esquerda para direita: selante CoverSlip e fixação das bordas com o selante; M – Da esquerda para direita: armazenamento de amostras e denominação da placa/ensaio de contagem.

Figura 4.11 - Algumas etapas do Procedimento 01 - Determinação da concentração de protozoários em cepas para posterior inóculo.

A seguir os passos do Procedimento 1:

1. As cepas *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum* eram removidas da geladeira e mantidas em repouso até atingirem a temperatura ambiente (Figura 4.11-A);
2. A solução eluente *Tween* 80 a 0,1% (1 mL *Tween* 80, 100 µL de *AntiFoam* em 1 L de água reagente Milli-Q) era preparada;

3. Duas lâminas eram nomeadas e colocadas nas proximidades para receber as alíquotas de protozoários após homogeneização das cepas;
4. Duas ponteiros eram enxaguadas com *Tween* 80 a 0,1%;
5. As cepas eram homogeneizadas em vórtex por 2 min em agitação média do aparelho. A cada 20 s a cepa era invertida e depois de 20 s voltava-se à posição original e a homogeneização continuava até que fossem completados 2 min e 20 s de agitação (Figura 4.11-B);
6. Após homogeneização, três alíquotas de cada cepa eram transferidas para três poços em duas lâminas, sendo que o poço central era inutilizado. Inicialmente era utilizada a alíquota de 5 μ L de cada cepa. Entretanto, após alguns resultados, passou-se a utilizar alíquotas de volumes variados, em função do número previsto de (oo)cistos desejado. Procurava-se pipetar as alíquotas no meio do volume contido na cepa, evitando arrastar “bolhas” que surgiam após a homogeneização (Figura 4.11-C). A contagem era realizada em triplicada, portanto, eram necessários três poços. Apesar de a lâmina possuir três poços, o poço central era inutilizado devido à dificuldade de se trabalhar com três poços com amostras. Assim, eram necessárias duas lâminas para efetuar uma única contagem (Figura 4.11-D);
7. As cepas eram tampadas, vedadas com para-filme (Figura 4.11-E) e retornadas à geladeira;
8. A secagem das alíquotas inseridas nos poços era aguardada (Figura 4.11-D). O ambiente do laboratório era climatizado, fato que favorecia a rápida secagem dos poços;
9. O *kit* Merifluor® era removido da geladeira e os produtos eram utilizados somente depois de atingirem a temperatura ambiente. A remoção dos produtos da caixa acelerava o processo;
10. Duas câmaras úmidas e escuras eram então preparadas. O procedimento consistia no envolvimento de placas de *Petri* em papel alumínio, tanto na tampa como na base, e dentro das placas dispunha-se de um pequeno pedaço de papel absorvente que era dobrado e umedecido com água deionizada (Figura 4.11-G);
11. Observada a secagem das alíquotas, cobriam-se as alíquotas pela adição de metanol anidro 99,8% Sigma-Aldrich® objetivando fixar a amostra ao poço da lâmina (Figura 4.11-F). No caso de 5 μ L de alíquota, foram necessários 10 μ L de metanol. Caso houvesse necessidade, era adicionado mais metanol. As

- alíquotas eram mantidas em repouso por pelo menos 10 min ou até que fosse observada a secagem;
12. As lâminas eram transferidas para as placas de *Petri*. Na ausência de luz, pingava-se uma gota do reagente de detecção do *kit* Merifluor® (frasco de tampa azul) no centro de cada poço contendo a amostra. Logo em seguida, pingava-se uma gota do contra corante do *kit* Merifluor® (frasco de tampa verde) também no centro de cada poço com amostra. Por fim, a placa de *Petri* era tampada e aguardava-se 30 min, conforme recomendações do *kit* Merifluor® (Figura 4.11-H). A etapa era repetida para as outras amostras;
  13. A solução tampão do *kit* Merifluor® de 20x era diluída para 1x utilizando água reagente Milli-Q (Figura 4.11-I). O volume de solução tampão diluída era preparado de acordo com a necessidade. Em cada poço, havia a necessidade da utilização de, no mínimo, 150 µL de solução tampão diluída, desta forma, atentava-se à quantidade de poços, e desta forma, calculava-se o volume de solução a ser preparada. Sempre era preparado um volume superior ao calculado, garantindo que não faltaria produto;
  14. Decorridos os 30 min estipulados na etapa 12 e ainda na ausência de luz, as lâminas eram então removidas das placas de *Petri*. Uma das lâminas era inclinada em um ângulo de aproximadamente 30° em relação à mesa, de forma a garantir que o líquido escorresse pela lâmina. Posteriormente, efetuava-se a lavagem dos dois poços contendo as amostras com 50 µL de solução tampão diluída. O procedimento era repetido para a outra lâmina. Depois de finalizada a primeira lavagem em cada poço, mais duas lavagens eram realizadas, executando, ao final, três lavagens por poço;
  15. Com cautela, os resquícios das lavagens ao redor de cada poço eram removidos utilizando um pequeno pedaço de papel absorvente;
  16. As lamínulas eram colocadas nas proximidades para que pudessem ser sobrepostas aos poços, depois de ser efetuada a etapa seguinte;
  17. Uma gota do meio de montagem do *kit* Merifluor® (frasco de tampa cinza) era aplicada no centro do poço (Figura 4.11-J). Uma lamínula era colocada sobre o poço, sempre em inclinação próxima a 45° em relação à mesa, evitando a formação de bolhas que poderiam dificultar a posterior visualização dos (oo)cistos (Figura 4.11-K). A etapa era repetida para os outros poços;

18. As bordas da lamínula eram seladas aplicando uma gota do selante CoverSlip em cada canto da lamínula (Figura 4.11-L). Para tanto, era preciso pressionar manualmente um canto da lamínula contra a lâmina, evitando que, no momento da selagem, ocorresse perda de amostra. A etapa era repetida para os outros poços;
19. As lâminas eram transferidas para as respectivas câmaras úmidas e escuras, as quais eram tampadas (Figura 4.11-J) e mantidas em refrigeração (2 – 8 °C);
20. Ao final, realizava-se a leitura dos poços e contagem dos (oo)cistos. Segundo o Método 1623.1, a leitura da lâmina pode ser efetuada em um prazo máximo de sete dias;
21. A contagem de protozoários era realizada poço a poço, sendo que primeiramente era feita a leitura de oocistos de *Cryptosporidium parvum* e posteriormente de cistos de *Giardia* spp.;
22. Depois de realizada a contagem, era calculada a média dos (oo)cistos de cada protozoário;
23. A média calculada representava apenas a alíquota de inóculo feita para a contagem, no caso de 5 µL. Objetivando preparar uma água de estudo com concentrações entre 10² a 10³ (oo)cistos.L⁻¹.

$$Vol_{inóculo} = \frac{Vol_{contagem} \times Conc_{desejada} \times Vol_{jarteste}}{Méd_{protozoários}} \quad \text{Equação 5}$$

Em que:

$Vol_{inóculo}$ = volume do inóculo de protozoários (µL);

$Vol_{contagem}$ = volume utilizado para efetuar a contagem de protozoários (µL);

$Conc_{desejada}$ = concentração desejada de protozoários, (oo)cistos.L⁻¹;

$Vol_{jarteste}$ = volume de água de estudo no jarro (L);

$Méd_{protozoários}$ = média de protozoários contados nas lâminas.

24. A quantidade de (oo)cistos a serem inoculados era realizada conforme a Equação 6.

$$Protoz_{inoculados} = \frac{Vol_{inóculo} \times Méd_{protozoários}}{Vol_{contagem}}$$

Equação 6

Em que:

$Protoz_{inoculados}$ = número de protozoários inoculados no jarro;

$Vol_{contagem}$ = volume utilizado para efetuar a contagem de protozoários (µL);

$Méd_{protozoários}$ = média de protozoários contados nas lâminas;

$Vol_{inóculo}$ = volume do inóculo de protozoários.

25. Os cálculos eram repetidos para determinação do volume e quantidade de oocistos *Cryptosporidium parvum* a serem inoculados.

O procedimento descrito anteriormente era repetido a cada ensaio de jarteste, de forma a obter, aproximadamente, a quantidade de (oo)cistos a ser inoculada.

Os jarros de Jarteste eram preenchidos com a água de estudo e realizava-se o inóculo de protozoários após execução do Procedimento 1. Posteriormente, efetuava-se o ensaio de tratabilidade conforme parâmetros otimizados.

4.4.3. Métodos de Detecção de Protozoários

Os métodos de detecção de protozoários foram realizados somente nas amostras que detinham resíduos, ou seja, ‘ALF’, ‘resíduo sedimentado’ e ‘sobrenadante ao resíduo’, enquanto que a amostra de água filtrada era descartada.

Os protocolos testados foram avaliados em função das recuperações, as quais deveriam estar em concordância com as indicadas no Método 1623.1 (USEPA, 2012), ou seja, de pelo menos 8,0% para cistos de *Giardia* spp. e 32,0% para *Cryptosporidium* spp. A partir do momento em que estes valores fossem atingidos dever-se-ia realizar o controle de qualidade do método.

Em todos os métodos avaliados, foram inoculados cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. Inicialmente foram utilizadas as duas cepas da

Waterborne. Posteriormente, substitui-se a cepa de *Giardia lamblia* pela cepa de *Giardia* spp. fornecida pelo Laboratório de Protozoologia da UNICAMP. Também foi avaliado o controle positivo do *kit* Merifluor® e o inóculo AccuSpike™ (fabricado pela Waterborne), este último contendo 100 (oo)cistos de cada gênero. Ao final da pesquisa, uma nova cepa da Waterborne, contendo oocistos de *C. parvum* foi avaliada.

A separação imunomagnética (IMS) foi realizada em todos os métodos e a técnica está descrita no item 4.4.4. As particularidades de cada método e as devidas adequações realizadas ao longo da pesquisa estão relatadas a seguir.

4.4.3.1. Método 1 – Filtração em Membranas Utilizando NaHMP como Eluidor e Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) nos 6 Jarros do Jarteste

O método proposto por Franco, Rocha-Eberhardt e Cantusio Neto (2001) baseado na filtração de amostras em ésteres mistos de celulose foi o primeiro método a ser avaliado mediante algumas modificações. Autores como Cantusio Neto (2004), Branco (2006) e Santos (2007) têm empregado a técnica no Brasil com recuperações dentro dos padrões do Método 1623.1.

A Figura 4.12 apresenta um esquema simplificado do procedimento.

Figura 4.12 - Esquema simplificado do procedimento de concentração de amostras contendo protozoários.

Fonte: MACIEL, 2014

O procedimento de concentração de amostras por filtração em membranas foi realizado em um dia de trabalho.

Neste protocolo, as cepas utilizadas foram as de suspensão comercial da Waterborne contendo elevada quantidade de (oo)cistos cada. O cálculo do volume de inóculo foi efetuado conforme item 4.4.2. A contagem do inóculo foi realizada a partir de 5 μL de cada cepa conforme descrito anteriormente. Os cálculos foram realizados para determinar o volume de inóculo que fosse compatível com valores próximos a 10^2 - 10^3 (oo)cistos. L^{-1} .

Neste primeiro método, apenas 0,5 L de água deionizada foi utilizada para efetuar a lavagem de cada filtro, e não 1 L, como descrito no processo de obtenção de ALF no item 4.3.1.

Seis jarros do jarteste foram utilizados, sendo que, todos os jarros receberam o inóculo. As diferentes amostras geradas a partir do ensaio de tratabilidade em cada jarro foram reagrupadas, formando assim, amostras compostas de ALF e resíduos sedimentados.

A Figura 4.13 ilustra alguns dos passos realizados para seleção das amostras.

Legenda: A – Início do ensaio em Jarteste; B – Filtração; C – Descarte do sobrenadante ao resíduo por sifonamento; D – Amostra de resíduo sedimentado de um único jarro; E – Separação da amostra de sobrenadante ao resíduo após reagrupamento; F – Homogeneização da amostra de resíduo sedimentado em agitador magnético; G – Tubos de centrifuga de 50 mL contendo a amostra de resíduo sedimentado antes da centrifugação.

Figura 4.13 - Seleção das amostras do Método 1.

A amostra sifonada nos 6 jarros, anteriormente denominada de ‘sobrenadante ao resíduo’ no item 4.3.1 foi descartada, considerando que não haveria protozoários. Posteriormente, as amostras de resíduos sedimentados foram agrupadas em um béquer de 2 L e obteve-se uma nova amostra com aproximadamente 1,2 L. Os resíduos ali presentes rapidamente se sedimentaram e considerando que as características do sobrenadante ao resíduo eram visualmente diferentes às dos resíduos sedimentados, optou-se por realizar um novo sifonamento, gerando, exclusivamente neste método, a amostra denominada de ‘sobrenadante aos resíduos reagrupados’ com volume de 1 L.

Já a amostra de ‘resíduos sedimentados’ era representada por aproximadamente 200 mL e foi mantida em repouso.

A filtração em membranas foi realizada exclusivamente para amostras com turbidez baixa, assim, este procedimento foi adotado somente para ALF e sobrenadante aos resíduos reagrupados.

Todo material que fosse entrar em contato com as amostras contendo protozoários era enxaguado com solução eluente *Tween* 80 a 0,1%. Além disso, o material utilizado no procedimento era marcado, o que incluía as placas de *petri*, pipetas *Pasteur* de 3 mL e tubos de centrifuga de 50 mL, desta forma, diminuía-se a chance de ocorrer contaminação de diferentes amostras.

Uma bomba de vácuo foi utilizada para filtração em membranas de ésteres mistos de celulose. A membrana possuía 47 mm de diâmetro e 3 µm de porosidade nominal (Figura 4.14).

Figura 4.14 - Bomba de vácuo acoplada ao conjunto porta-filtro e membrana Millipore®.

Fonte: MACIEL, 2014

A amostra era homogeneizada em agitador magnético por no mínimo 5min antes de se iniciar a filtração. A pressão era mantida abaixo de 525 mmHg e a vazão permanecia entre 1 e 4 L.min⁻¹, de forma a manter a recuperação dos (oo)cistos dentro dos padrões da USEPA (2012).

A filtração das amostras era feita até o início do gotejamento, sempre respeitando o limite da pressão recomendada.

Caso houvesse mais volume de amostra a ser filtrado, substituía-se a membrana. Tal procedimento demandava cuidados para não danificar a membrana. Deste modo,

aguardava-se o término da filtração do volume contido no copo, desligava-se a bomba de vácuo e aguardava-se a estabilização da pressão depois de atingir a pressão ambiente. Posteriormente, com cautela, desacoplava-se o copo do conjunto bomba de vácuo e com uma pinça metálica transferia-se a membrana para uma placa de *Petri* previamente molhada com algumas gotas de solução eluente. No caso, foi utilizado NaHMP (hexametafosfato de sódio) a 5%.

As membranas armazenadas nas placas de *Petri* passavam pelo processo denominado eluição, que consiste na raspagem e lavagem das membranas. Um suporte foi adaptado para efetuar tal procedimento. Desta maneira, as placas de *Petri* eram mantidas em um ângulo de aproximadamente 30° em relação à mesa, facilitando o processo. Utilizando-se duas alças plásticas macias presente no *kit* Merifluor®, efetuava-se a raspagem do material retido na membrana (Figura 4.15).

Figura 4.15 - Eluição de membrana.

Fonte: MACIEL, 2014

Utilizando a mesma pipeta *Pasteur* utilizada no manejo da solução de eluição, gotejava-se por volta de 1 mL de material eluente sobre a membrana. A raspagem das membranas era realizada de modo que, enquanto uma das alças plásticas efetuava a raspagem em movimentos paralelos de mesmo sentido, a outra alça era responsável por manter a membrana fixa na placa, evitando contato com o líquido e material raspado.

Efetuada a primeira raspagem, lavava-se a membrana com aproximadamente 1 mL de solução de eluição. A lavagem era sempre iniciada com gotejamento na parte superior da membrana e posteriormente na parte inferior, o que proporcionava o carreamento do material aderido à membrana. Utilizando a pipeta *Pasteur* referente à respectiva amostra, realizava-se a homogeneização do material raspado com sucessivas

sucções e dispensas do material líquido. Transferia-se o material eluído para um tubo de centrífuga de 50 mL previamente lavado com *Tween* 80 a 0,1%.

Após o recolhimento do material líquido em questão, a placa era rotacionada 90° para que fosse realizada uma nova raspagem, de forma a obter estrias perpendiculares às da primeira raspagem. O procedimento de raspagem era repetido mais duas vezes, fazendo com que todo o processo (3 raspagens seguidas de lavagens) durasse cerca de 20 min, conforme descrito por Branco (2006).

Caso houvesse mais de uma membrana utilizada na filtração de uma mesma amostra, o material resultante da eluição era transferido ao seu respectivo tubo de centrífuga. Após a transferência de todo material eluído, completava-se o tubo de centrífuga com a solução eluente (NaHMP a 5%) até a marcação de 50 mL e efetuava-se a etapa de centrifugação das amostras.

Depois de realizada a raspagem das membranas das amostras filtradas e as transferências para os tubos de centrífuga, iniciava-se a transferência da amostra de resíduos sedimentados para os tubos de centrífuga. A amostra presente no béquer foi homogeneizada em agitador magnético por pelo menos 10 min e o conteúdo foi transferido para quatro tubos de centrífuga de 50 mL. O béquer foi lavado com água Milli-Q de forma que o material resultante das lavagens foi transferido para os tubos de centrífuga representados pela amostra de resíduos sedimentados.

Depois de obtidas as amostras (água de lavagem dos filtros, sobrenadante aos resíduos reagrupados e resíduo sedimentado) nos respectivos tubos de centrífuga efetuava-se a etapa de concentração das amostras. Para tanto, levavam-se os tubos contendo as amostras para as quatro bandejas da centrífuga, entretanto, a determinação da posição dos tubos era cuidadosamente realizada, de forma a balancear o peso da centrífuga. Os espaços que não conteriam tubos com amostras eram preenchidos com tubos de centrífuga preenchidos com água da torneira até a marcação de 50 mL. Todos os 16 tubos eram pesados em balança analítica e aqueles que apresentavam pesos relativamente próximos eram colocados em lados opostos para um adequado balanceamento e pleno funcionamento da centrífuga, como pode ser visto na Figura 4.16. A centrifugação era feita a uma rotação de 1500g (2852rpm) por 15 minutos, conforme USEPA (2012).

Figura 4.16 – Centrifugação das amostras e respectivos *pellets* finais.

Após a primeira centrifugação, selecionava-se um dos tubos e com a pipeta *Pasteur* referente àquela amostra, aspirava-se cuidadosamente o sobrenadante ao *pellet* (40 mL), deixando 10 mL de amostra nos tubos, inclusive o *pellet*. Em seguida, com uma pipeta *Pasteur* homogeneizava-se o *pellet* por meio de sucessivas sucções e dispensas do material líquido, semelhante ao processo efetuado na eluição. Caso houvesse mais do que um tubo de centrífuga para uma mesma amostra, como foi para a amostra de resíduo sedimentado (4 tubos), efetuava-se a aspiração e homogeneização nos respectivos tubos e a amostra era reagrupada em um único tubo. Efeituavam-se pelo

menos duas lavagens com água reagente Milli-Q em cada tubo e o material resultante de cada lavagem era transferido para o respectivo tubo.

As amostras em cada tubo eram homogeneizadas e preenchia-se com água Milli-Q até a marcação de 50 mL caso houvesse necessidade, e efetuava-se nova centrifugação em condições semelhantes às da primeira.

Após a segunda centrifugação, analisava-se o volume de *pellet* (Figura 4.16) conforme determina o Método 1623.1, o qual descreve que a cada 0,5 mL de *pellet*, é necessário deixar 10 mL de sobrenadante ao *pellet* no tubo de centrífuga.

Ainda segundo o Método 1623.1, o volume máximo de *pellet* recomendado para ser processado na separação imunomagnética (IMS), é de 0,5 mL (500 µL). Caso houvesse um volume de *pellet* superior a 0,5 mL, como por exemplo, 1,2 mL, deveria ser deixado, neste exemplo específico, 30 mL de sobrenadante. A amostra era toda homogeneizada com uma pipeta automática de 10 mL por meio de coletas e dispensas de material. Após a homogeneização, apenas 10 mL eram coletados e transferidos para um tubo de lado plano (TLP do kit *Dynabeads® Life Technologies™*). Desta forma, obtinha-se um terço do volume de *pellet* – neste exemplo, era de aproximadamente 0,4 mL ou 400 µL – podendo assim, efetuar a etapa de IMS de acordo com as recomendações da USEPA (2012). Os outros 20 mL de amostras no tubo de centrífuga eram descartados.

Esse descarte de amostras, e de protozoários, influenciava diretamente no cálculo de recuperação de (oo)cistos nas diferentes metodologias testadas. Além das dificuldades metodológicas embutidas em se avaliar diversas amostras, o custo de materiais e reagentes eram dois fatores que impediam a análise de toda a amostra, ou seja, de todo o *pellet*, em diversos métodos. Assim, era realizado um cálculo denominado fator de multiplicação (FM), ou seja, a quantidade de protozoários analisada em microscópio deveria ser multiplicada por esse fator para que fosse realizado o cálculo da porcentagem de protozoários recuperados em cada método (Equação 7).

$$FM = \frac{Vol_{rem}}{Vol_{TLP}} \quad \text{Equação 7}$$

Em que:

FM = Fator de multiplicação;

Vol_{rem} = Volume remanescente após descarte do sobrenadante (mL);

Vol_{TLP} = Volume transferido para o tubo de lado plano (mL).

Após a centrifugação das amostras, os respectivos volumes de *pellets* eram observados. Caso o *pellet* fosse menor do que 500 μ L, não havia necessidade de efetuar descartes e a amostra era processada como um todo, de forma que o FM para este caso era inexistente ou igual a 1, não influenciando no cálculo de recuperação de (oo)cistos. Assim, o sobrenadante era removido até a marcação de 5 mL e, com a respectiva pipeta *Pasteur* de plástico, a amostra era homogeneizada. O volume era transferido para um TLP devidamente marcado e previamente enxaguado com *Tween* 80 a 0,1%. Depois de realizada a transferência de toda a amostra, com uma pipeta automática de 5 mL, duas lavagens do tubo de centrifuga com 2,5 mL de água Milli-Q eram realizadas. A cada lavagem, com o uso da respectiva pipeta *Pasteur*, era realizada a transferência da amostra para o respectivo TLP, totalizando um volume de 10 mL.

Finalmente, as amostras eram destinadas à etapa de purificação por separação imunomagnética (IMS) que será descrita mais adiante.

4.4.3.2. Método 2 – Filtração em Membranas Utilizando NaHMP como Eluidor, Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) nos 6 Jarros do Jarteste e Maior Volume de ALF Gerado

Este segundo método, basicamente, foi semelhante ao primeiro. Portanto, não serão descritos todos os passos realizados e sim as etapas essenciais com algumas modificações e adaptações realizadas em relação ao método anterior.

As cepas de protozoários utilizadas para inocular no tratamento continuaram sendo da Waterborne com elevado número de patógenos. O cálculo do volume de inóculo a ser realizado continuou baseando-se em 5 μ L inseridos em três diferentes poços. Depois de realizada a contagem em triplicata, o volume de inóculo foi determinado, sempre procurando obter uma concentração entre 100 a 1000 (oo)cistos.L⁻¹.

1.

Neste método, a lavagem de cada filtro foi aumentada de 0,5 L para 1 L. Depois de efetuado o descarte do sobrenadante ao resíduo mediante sifonamento nos 6 jarros, a amostra foi reagrupada em um único béquer, conforme descrito no método anterior. Entretanto, não foi efetuado novo sifonamento do sobrenadante formando no béquer. Este novo sobrenadante permaneceu juntamente com a porção de resíduo sedimentado.

A etapa de filtração foi realizada somente para a amostra de ALF e o material de eluição continuou sendo o NaHMP a 5%. Duas centrifugações foram realizadas para as amostras de ALF e de resíduos sedimentados nas mesmas condições descritas no método anterior, ou seja, por 15 min a 1500 g e com a balança devidamente balanceada.

O cálculo do fator de multiplicação (FM) foi novamente realizado para a amostra de resíduos sedimentados devido aos elevados volumes de *pellets* observados nos diferentes tubos de centrífuga. Já para a amostra de ALF, novamente não houve descarte, assim, a amostra foi toda transferida para o respectivo TLP, não havendo necessidade do FM. Em seguida, a separação imunomagnética (IMS) foi processada.

4.4.3.3. Método 3 – Filtração em Membranas com Adaptações da Metodologia de Medeiros (2013) Utilizando *Tween 80* como Eluidor e Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) em um Único Jarro.

Este terceiro método foi novamente baseado na técnica de filtração em membranas e concentração de amostras pelo uso da centrífuga. Poucas modificações foram realizadas em relação aos métodos anteriores, portanto, serão destacadas e descritas somente as técnicas que caracterizam este novo método.

As condições para determinação do volume de inóculo foram idênticas às descritas no método anterior.

Diferentemente dos primeiros dois métodos, o ensaio de tratabilidade da água de estudo foi realizado utilizando apenas um jarro e, conseqüentemente, o inóculo se deteve a esse jarro. De forma semelhante ao método anterior, apenas 1 L de ALF foi gerada na lavagem dos filtros. O sobrenadante ao resíduo foi descartado mediante sifonamento após transcorrido o tempo mínimo de 12 h de sedimentação. Ao final do

ensaio de tratabilidade, apenas as amostras de ALF e resíduo sedimentado foram selecionadas para análise de protozoários.

A amostra de ALF foi a única processada pela etapa de filtração, entretanto, na etapa de eluição da membrana, substituiu-se a solução eluente NaHMP a 5% por *Tween* 80 a 0,1%.

Neste método, a técnica descrita por Medeiros (2013) foi adaptada. Segundo o autor, é necessário misturar *Tween* 80 a 0,1% com a amostra por 3 min em agitador magnético. A relação de solução detergente pela amostra deve ser de 1:3. Desta forma, foi adicionado 40 mL de *Tween* 80 a 0,1% em 120 mL da amostra de resíduos sedimentados, obedecendo a proporção. Depois de efetuada a mistura, o volume de 160 mL foi transferido para 4 tubos de centrifuga de 50 mL. Efetuou-se então as lavagens do béquer (agora com *Tween* 80 a 0,1%) e o material resultante das lavagens foi transferido para cada tubo de centrifuga até completar a marca de 50 mL.

Foram realizadas duas centrifugações tanto para as amostras de ALF quanto para a de resíduos sedimentados. Salienta-se que as condições de centrifugação foram idênticas aos métodos anteriores, ou seja, tempo de 15 min e rotação de 1500 g.

Finalizadas as centrifugações foram realizados os devidos descartes e as devidas homogeneizações conforme descrito anteriormente, e as amostras eram transferidas para seus respectivos TLPs. O volume final representava 10 mL em cada TLP.

Devido aos descartes realizados por motivos anteriormente descritos, o fator de multiplicação (FM) foi novamente calculado para a amostra de resíduo sedimentado. Já para a amostra de ALF, não foram realizados descartes, portanto a amostra foi completamente transferida para o TLP, inexistindo FM. Finalmente a purificação das amostras foi realizada via separação imunomagnética (IMS).

4.4.3.4. Método 4 – Filtração em Membranas com Adaptações da Metodologia de Medeiros (2013) Utilizando NaHMP como Eluidor com Inóculos do Controle Positivo do *Kit* Merifluor®

Este quarto método foi muito semelhante ao anterior. Novamente foi realizada a técnica de filtração em membranas e concentração de amostras pelo uso da centrifuga

com as devidas adaptações de Medeiros (2013). Contudo, a solução de NaHMP a 5% foi mais uma vez testada por apresentar melhores resultados se comparado com o método em que foi utilizado *Tween 80* a 0,1%.

Uma importante modificação em relação aos métodos anteriores foi a substituição das cepas da Waterborne pelo controle positivo do *kit* Merifluor®. Nesta solução, ambos os protozoários ficam armazenados no mesmo recipiente, porém em concentrações distintas. Segundo informações do *kit*, a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. é cerca de nove vezes maior do que a de cistos de *Giardia* spp. Esta informação foi constatada pela contagem dos (oo)cistos na determinação do volume de inóculo. Desta forma, não foi possível atingir concentrações em torno de 100 a 1000 protozoários por litro. Assim, a concentração de oocistos inoculados foi maior do que a de cistos.

Depois de efetuado todo o procedimento, conforme descreve o Método 3, as amostras de resíduos sedimentados e ALF foram processadas mediante separação imunomagnética (IMS).

4.4.3.5. Método 5 – Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) Direto na Amostra e Uso de *Tween 80* para Desagregação dos Protozoários

Este quinto método foi executado com diversas modificações se comparado aos métodos anteriores. Entre elas, destaca-se a não análise da amostra de ALF devido as baixas recuperações de (oo)cistos nos protocolos aplicados anteriormente. Desta forma, a recuperação restringiu-se a amostra de resíduo sedimentado. Outra importante mudança foi a realização do inóculo diretamente na amostra de resíduo sedimentado e não nos 2 L de água de estudo, como comumente estava sendo realizado.

O ensaio de tratabilidade foi iniciado, entretanto, sem o inóculo de (oo)cistos. A etapa de filtração não foi realizada, já que a amostra de ALF não seria avaliada e, desta maneira, não foi necessário o uso do conjunto de filtros FLA. Ainda assim, a água floculada acima da saída do coletor do jarro do Jarteste foi removida com vazão controlada de 20 mL.min⁻¹. Ao final do ensaio de tratabilidade, aguardou-se o tempo mínimo de 12 h para sedimentação dos resíduos no jarro do Jarteste.

O sobrenadante ao resíduo sedimentado foi descartado conforme descrito anteriormente e a amostra de resíduos sedimentados foi transferida para um béquer de 300 mL. Depois de homogeneizada em agitador magnético por cerca de 10 min, 20 mL de amostra foram coletados e transferidos para um novo béquer, previamente enxaguado com *Tween* 80 a 0,1%. Esta porção foi mantida em agitação em agitador magnético enquanto o inóculo dos protozoários (cepas de suspensão comercial da Waterborne) e 20 mL de *Tween* 80 a 0,1% eram adicionados. Depois de 30min em homogeneização, o volume contido no béquer foi transferido para um tubo de centrífuga de 50 mL anteriormente lavado com solução de *Tween* 80. Duas lavagens do béquer com água Milli-Q também foram incorporadas ao tubo de centrífuga.

A etapa seguinte consistiu nas duas centrifugo concentrações da amostra da mesma maneira que efetuada nos métodos anteriores (1500 *g* por 15 min). Foi observado um *pellet* menor do que 500 µL, portanto, 45 mL de sobrenadante ao *pellet* foram aspirados e descartados. O volume de 5 mL, incluindo o *pellet*, foram homogeneizados e transferidos por meio de uma pipeta *Pasteur* para um TLP já lavado com *Tween* 80 a 0,1%. Duas lavagens de 2,5 mL de água Milli-Q foram realizadas ao tubo de centrífuga e o material foi adicionado à amostra contida no TLP. A amostra estava pronta para ser processada pela IMS.

Neste Método 5, é relevante destacar que não houve descarte de amostras, portanto o fator de multiplicação não interferiu no cálculo de recuperação (FM = 1).

4.4.3.6. Método 6 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) Direto nos TLPs e Uso de *Tween* 80 e *Extran*

Devido à indisponibilidade da centrífuga por dano, não foi realizada a etapa de concentração das amostras neste Método 6. Os inóculos (cepas da Waterborne) foram realizados diretamente ao TLP contendo a amostra de resíduos sedimentados. A amostra de ALF continuou não sendo gerada, conforme explicado no método anterior.

Neste Método 6, foram realizadas diversas adaptações do método descrito de Boni de Oliveira (2012). Finalizado o tratamento da água de estudo e obtida a amostra

de resíduo sedimentado mediante sifonamento, o volume de amostra (cerca de 100 mL) foi transferido para um béquer. A amostra foi homogeneizada em agitador magnético por 10min, duas alíquotas de 5 mL de amostra foram transferidas, cada qual para dois TLPs devidamente nomeados e lavados com *Tween* 80 a 0,1%. Foram realizados os inóculos das cepas da Waterborne diretamente nos TLPs contendo as alíquotas de amostra. Cada tubo recebeu uma solução detergente. A um TLP foi adicionado 5 mL de *Tween* 80 a 0,1% e ao outro, 5 mL de *Extran* a 1%. Os TLPs contendo a amostra de resíduo sedimentado, os inóculos e os respectivos detergentes, foram conectados ao mixer rotatório e rotacionados por pelo menos 30 min a 20 rpm. Decorrida a mistura, era iniciado a purificação das amostras em IMS.

O cálculo do fator de multiplicação foi novamente excluído da recuperação já que toda a amostra foi processada.

4.4.3.7. Método 7 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e do Controle Positivo do *Kit* Merifluor® Diretamente nos TLPs com Uso de *Extran*

Ainda devido à indisponibilidade da centrífuga por dano, a etapa de concentração das amostras não foi realizada. De forma semelhante à realizada no Método 6, os procedimentos descritos por Boni de Oliveira (2012) foram adaptados à este método.

Novamente não foi realizado inóculo no jarro do Jarteste e somente a amostra de resíduo sedimentada foi coletada, assim como descrito no método anterior. Dois TLPs foram devidamente nomeados e enxaguados com *Tween* 80 a 0,1% onde foi adicionada alíquota de 5 mL da amostra de resíduo sedimentado, previamente homogeneizada em agitador magnético por pelo menos 10 min. Cada TLP recebeu um tipo de inóculo, sendo que, um recebeu os inóculos das cepas de suspensão comercial da Waterborne e o outro o inóculo do controle positivo do *kit* Merifluor®. O volume de 5 mL da solução do detergente *Extran* a 1% foram adicionados em cada TLP e as amostras foram misturadas em mixer rotatório por 30 min a 20 rpm.

Depois de misturadas, as amostras foram purificadas via IMS. Novamente, não houve necessidade de se incluir fatores de multiplicação para realização dos cálculos de recuperação de protozoários, já que ambas as amostras foram completamente analisadas.

4.4.3.8. Método 8 – Filtração em Membranas com Adaptações do Método de Boni de Oliveira (2012) Utilizando *Extran* (sem Homogeneização em Mixer Rotatório) e Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro do Jarteste

O ensaio de tratabilidade foi realizado depois de serem inoculados oocistos de *Cryptosporidium parvum* da cepa de suspensão comercial da Waterborne e cistos de *Giardia* spp. da cepa de suspensão purificada da UNICAMP à água de estudo.

O conjunto de filtro não foi utilizado no ensaio de tratabilidade, de forma que a água que seria filtrada, cerca de 1 L, foi armazenada em um béquer. A amostra de sobrenadante ao resíduo foi sifonada e adicionada ao béquer, resultando em uma amostra de aproximadamente 1,8 L. Vale lembrar que o sifonamento somente foi realizado depois de transcorrido o tempo de sedimentação (12 h). O volume de 1,8 L foi filtrado em membranas conforme descreve o Método 1 e posteriormente, 10mL de amostra foram transferidos a um TLP e processado em IMS.

A amostra de resíduo sedimentado em jarro do Jarteste foi analisada de maneira divergente ao que estava sendo realizado. Primeiramente, transferiu-se a amostra para uma proveta graduada de 200 mL. O jarro foi lavado duas vezes com água deionizada e o material foi adicionado à proveta. O volume medido foi de aproximadamente 100 mL, o qual foi transferido para um béquer de 300 mL. A proveta foi lavada mais duas vezes, cada qual com 10 mL de água deionizada e o material resultante da lavagem foi adicionado ao béquer. Desta forma, verificou-se que o volume total da amostra de resíduos sedimentados era de 120 mL.

A amostra foi mantida em homogeneização por 10min em agitador magnético, e uma alíquota de 5 mL foi coletada e transferida para um TLP. Vale ressaltar a prévia lavagem dos materiais com *Tween* 80 a 0,1%. Ainda foi adicionado ao TLP, 5 mL de

Extran a 1%, entretanto não foi realizada homogeneização em mixer rotatório, como descrito nos procedimentos anteriores.

Os dois TLPs contendo as amostras foram processados em IMS. Não houve fator de multiplicação para o caso da amostra filtrada, porém para a amostra de resíduos sedimentados foi calculado FM = 24, já que apenas 5 mL de 120 mL foram analisados.

4.4.3.9. Método 9 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste e Uso de *Extran*

Os inóculos das cepas da Waterborne foram realizados na água de estudo e foi feito o ensaio de tratabilidade em Jarteste. A água que seria filtrada, foi descartada de forma semelhante ao descrito no Método 5.

A amostra de resíduo sedimentado foi obtida de forma semelhante ao Método 8, portanto, os resíduos, depois de sedimentados no jarro, foram transferidos para uma proveta. Depois de anotado o volume, transferiu-se 5mL de amostra para um TLP. O tubo ainda recebeu 5mL de *Extran* a 1% e foi homogeneizado em mixer rotatório por 30min a 20rpm. Ao final, o procedimento de IMS foi realizado e o cálculo da recuperação foi efetuado incluindo-se o fator de multiplicação, já que grande parte da amostra não foi purificada e analisada em microscópio.

4.4.3.10. Método 10 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro do Jarteste e Uso de ICN 7X

Este método foi praticamente todo realizado conforme estabelecido no método anterior, porém, a única diferença foi a utilização do detergente ICN 7X. Segundo Boni de Oliveira (2012), o detergente ICN 7X a 1%, quando adicionado à amostra que

contêm sólidos, contribui de maneira eficiente na recuperação de protozoários se comparado a outras soluções detergentes. Desta forma, a solução de *Extran* a 1% foi substituída por este detergente e depois de efetuada a purificação da amostra por IMS, foi feita a avaliação da recuperação dos (oo)cistos.

4.4.3.11. Método 11 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no TLP e Uso de *Extran*

O ensaio de tratabilidade foi realizado sem inocular as cepas na água de estudo. O ensaio em Jarteste foi processado normalmente, gerando os resíduos a serem testados. A água, que seria filtrada, foi descartada de forma semelhante à descrita no Método 5.

Depois de transcorrido o tempo necessário para que fossem sedimentados os resíduos em jarro de Jarteste, a amostra de sobrenadante ao resíduo sedimentado foi sifonada e descartada. Neste Método 11, não foi necessário medir o volume de amostra, já que não haviam sido inoculados os protozoários. Portanto, transferiu-se a amostra para um béquer e depois de ser efetuada a etapa de homogeneização em agitador magnético por 10min, efetuou-se a coleta e transferência de 5 mL de amostra para um TLP.

O tubo contendo a amostra, recebeu, além dos inóculos da Waterborne, o volume de 5 mL do detergente *Extran* a 1%. A mistura foi feita por meio do mixer rotatório, mantido em agitação por 30 min à 20 rpm. Posteriormente, efetuou-se a etapa de IMS.

O fator de multiplicação não existiu neste método, já que foi realizado o inóculo diretamente no TLP, portanto, todos os (oo)cistos inoculados foram processados em IMS e as decorrentes perdas ocorreram em vista do método avaliado e não no próprio descarte de amostra contendo protozoários.

4.4.3.12. Método 12 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no TLP e Uso de ICN 7X

Este método foi praticamente todo realizado conforme descrito no Método 11, porém, a única diferença foi a substituição do detergente *Extran* a 1% pelo detergente ICN 7X a 1%.

4.4.3.13. Método 13 – Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro do Jarteste

Esta metodologia foi primeiramente desenvolvida por Vesey *et al.* (1993), modificada por Feng *et al.* (2011) e adaptada para esta pesquisa.

Os inóculos das cepas da Waterborne foram realizados diretamente na água de estudo e o ensaio de tratabilidade foi realizado. Assim como descrito nos últimos métodos, não foi selecionada a amostra de ALF. Depois de decorrido o tempo de sedimentação (12 h), neste Método 13, não foi feita a separação da amostra de resíduo sedimentado da amostra de sobrenadante ao resíduo, ou seja, os resíduos sedimentados foram mantidos no jarro de Jarteste juntamente com o sobrenadante.

As etapas do método de FCCa foram enumeradas, facilitando a compreensão do procedimento e, podem ser observadas na sequência:

1. A amostra era homogeneizada em agitador magnético por 20 min;
2. Ainda em agitação, 10 mL de cloreto de cálcio (CaCl_2) a 1M e 10 mL de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 1M eram adicionados, e a mistura era mantida por mais 10 min;

3. Ainda em homogeneização, era adicionado hidróxido de sódio (NaOH) a 5M até que o valor do pH se igualasse a 10. A adição era feita gota a gota pelo uso de uma pipeta *Pasteur* de 3 mL;
4. A amostra era mantida em repouso e a temperatura ambiente em *overnight* ou por no mínimo 4 h, conforme descrito por Feng *et al.* (2011). Padronizou-se deixar a amostra em *overnight*;
5. Após repouso, ficava evidente a distinção de fases e removia-se o sobrenadante por sifonamento em ambas as amostras até a marcação de 100 mL no jarro do Jarteste;
6. A amostra residual era misturada em agitador magnético por 10 min;
7. Decorrido o tempo estipulado e sem interromper a agitação, 20 mL de ácido sulfâmico a 10,0% eram adicionados enquanto a agitação mantida por mais 5min;
8. Sem cessar a homogeneização a amostra era transferida para três tubos de centrífuga de 50 mL. Com uma pipeta automática de 10 mL, procurava-se efetuar a transferência de forma igualitária. Como a amostra apresentava cerca de 100 mL, eram efetuadas 9 transferências, sendo que depois era feita a lavagem do jarro;
9. O jarro era lavado com *Tween* 80 a 0,1% de forma que o material obtido nas lavagens era transferido igualmente para os tubos de centrífuga que continha as amostras. Os tubos eram completados até a marcação de 50 mL;
10. Os tubos eram devidamente posicionados na centrífuga. Nesta pesquisa, a força centrífuga foi reduzida para 1500 g e o tempo foi aumentado para 20 min;
11. Após a centrifugação, era verificado que o volume de *pellet* nos tubos era aproximadamente o mesmo, em torno de 0,5 mL, ou seja, o volume de *pellet* estava no limite para se efetuar o procedimento de IMS de acordo com o Método 1623.1. Para que o custo de análise não fosse aumentado, um dos tubos era selecionado aleatoriamente, enquanto que os outros dois eram descartados. Portanto o fator de multiplicação ao final do cálculo de recuperação para esta amostra era de $FM = 3$;
12. Sem perturbar o *pellet* da amostra selecionada, era verificada a neutralidade do pH. Caso não estivesse neutro, corrigia-se o pH pela adição de DPBS. A neutralização do valor de pH era assim realizada:

- a. Com uma pipeta *Pasteur*, o sobrenadante ao *pellet* era descartado até a marcação de 5 mL e a amostra era homogeneizada;
  - b. Com uma pipeta automática, adicionava-se DPBS de 5 em 5 mL até que fosse obtido um valor de pH igual a 7,0 e a amostra era homogeneizada com a pipeta *Pasteur*.
13. O tubo era reposicionado na centrífuga e era realizada a segunda centrifugação conforme descrito na etapa 10;
  14. A neutralidade era novamente verificada. Caso não estivesse neutra, as etapas 12 e 13 eram repetidas até o momento em que o pH estivesse neutro;
  15. Sem perturbar o *pellet*, o sobrenadante era aspirado até a marcação de 5 mL do tubo. Depois era realizada a homogeneização da amostra e sua transferência para o TLP;
  16. O tubo de centrífuga era lavado duas vezes com 2,5 mL e o material era transferido para o TLP contendo a amostra.

A amostra era então purificada via separação imunomagnética (IMS).

4.4.3.14. Método 14 – Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste sem Descarte de Amostras

O procedimento da FCCa descrito no Método 13 foi novamente realizado neste Método 14, entretanto não foram realizados descartes de amostras, de forma a avaliar a recuperação em toda a amostra de resíduos gerados. A purificação por IMS foi realizada três vezes, desta forma, toda a amostra de resíduos gerada no ensaio de Jarteste pode ser analisada, não havendo necessidade do FM.

4.4.3.15. Método 15 – Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste Incluindo Análise de Protozoários na ALF

O método de FCCa foi novamente realizado de forma semelhante ao procedimento descrito no Método 13, entretanto, além de ser analisada a amostra de resíduo sedimentado foi incluída a análise da detecção de (oo)cistos na amostra de ALF.

Depois de finalizado o ensaio de tratabilidade contendo os inóculos, a amostra de 1 L de ALF armazenada em um béquer foi submetida à flocculação em carbonato de cálcio de forma semelhante ao procedimento anterior, exceto por alguns detalhes. Na décima primeira etapa descrita no Método 13, os volumes de *pellets* formados nos três tubos de centrífuga depois de executada a primeira centrifugação foram ínfimos. Portanto, não foi realizado descarte de amostra e sim o reagrupamento para um tubo de centrífuga, excluindo-se o fator de multiplicação (FM = 1), já que toda a amostra foi purificada em IMS.

Em razão do reagrupamento, houve revolvimento do *pellet* e, desta maneira, foi necessário realizar outra centrifugação antes de dar continuidade ao procedimento.

Ao final do método, foi realizada a purificação em IMS das amostras obtidas nos respectivos TLPs. É importante enfatizar que o FM para a amostra de resíduo sedimentado foi mantido em 3, já que para esta amostra, somente 1 de 3 tubos foi processado em IMS.

4.4.3.16. Método 16 – Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos de Suspensão Comercial (AccuSpike^{TM} da Waterborne) no Jarro de Jarteste

O método de FCCa foi novamente realizado de forma semelhante ao Método 13, ou seja, excluindo-se a análise de (oo)cistos na amostra de ALF. A principal alteração deste método foi a substituição das cepas de suspensão comercial da Waterborne

contendo elevada quantidade de oocistos de *C. parvum* e da cepa de suspensão purificada da UNICAMP contendo cistos de *Giardia* spp. pelos inóculos AccuSpike™. contendo 100 cistos de *Giardia* spp. e 100 oocistos de *Cryptosporidium* spp. com desvio padrão de $\pm 1,6$ (oo)cisto. Logo, não foi necessário seguir o procedimento descrito no item 4.4.2 para determinar a quantidade de protozoários a ser inoculada. O protocolo de inoculação fornecido pelo *kit* AccuSpike™ foi seguido de forma a garantir o inóculo na água de estudo. Depois de finalizado o ensaio de Jarteste, foi realizada a FCCa na amostra de resíduo sedimentado, assim como está descrito no Método 13.

4.4.3.17. Método 17 – Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos de Suspensão Comercial (AccuSpike™ da Waterborne) no Jarro de Jarteste sem Descarte de Amostra

Neste método, o procedimento de FCCa foi repetido conforme descrito no Método 16, ou seja, com inóculo AccuSpike™ e análise somente na amostra de resíduo sedimentado. Entretanto, não houve descarte de amostra, assim, toda a amostra foi analisada, não havendo fator de multiplicação, ou seja, foram realizados três ensaios de IMS, correspondentes aos três tubos de centrífuga resultantes.

4.4.3.18. Método 18 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste, Uso de ICN 7X e Incluindo a Concentração de Amostra

O ensaio de tratabilidade da água de estudo foi realizado depois de efetuados os inóculos das cepas da Waterborne. A análise da recuperação de protozoários restringiu-se à amostra de resíduo sedimentado, não sendo gerada a amostra de ALF.

Depois de selecionada a amostra em questão, sua transferência foi realizada para três tubos de centrífuga assim como descrito no procedimento de FCCa. Depois de centrifugar as amostras a 1500 g por 15 min, observaram-se *pellets* com volumes próximos a 0,5 mL e apenas um tubo de centrífuga foi selecionado, portanto, o FM foi igual a 3.

Sem realizar uma segunda concentração, o sobrenadante ao *pellet* foi descartado até a marcação de 5 mL do tubo por meio de uma pipeta *Pasteur*. O volume residual no tubo de centrífuga foi homogeneizado e transferido para um TLP. Duas lavagens de 1 mL de água Milli-Q foram realizadas e o material foi transferido ao mesmo TLP. Por fim, foram adicionados 5 mL de ICN 7X a 1% ao TLP.

O tubo contendo a amostra e o detergente foi mantido em agitação no mixer rotatório por 30 min a 20 rpm. Decorrido o tempo estipulado, a purificação da amostra em IMS foi realizada e, posteriormente, foi feito o cálculo de recuperação depois da contagem dos (oo)cistos.

4.4.3.19. Método 19 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012)

Utilizando ICN 7X com Homogeneização por 1 Hora e Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste e Incluindo Concentração de Amostra

A diferença deste Método 19 para o Método 18 foi o aumento do período de homogeneização de 30 minutos para 1 hora.

4.4.3.20. Método 20 – Adaptação do Método de Keegan *et al.* (2008) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste

O ensaio de tratabilidade da água de estudo foi realizado depois de serem feitos os inóculos das cepas da Waterborne. Finalizado o Jarteste, a amostra de ALF foi armazenada e, depois de passadas 12 h de sedimentação dos resíduos o sifonamento foi executado com descarte do sobrenadante, restando no jarro apenas a amostra de resíduo sedimentado.

A amostra foi dividida em três tubos de centrífuga de 50 mL, assim como descrito no Método 19. Após a centrifugação (1500 g por 15 min), um tubo contendo a amostra foi selecionado e os outros dois foram descartados (FM = 3).

Enquanto a amostra de resíduo sedimentado era mantida em repouso para início da aplicação e adaptação do método de Keegan *et al.* (2008), a amostra de ALF foi transferida do béquer para 4 tubos de centrífuga de 250 mL que foram previamente marcados com o volume de 10 mL. Duas lavagens do béquer foram realizadas com água Milli-Q e o material resultante das lavagens foi transferido aos tubos de centrífuga.

Os tubos de centrífuga de 250 mL foram centrifugados por 15 min a 1500 g. Terminada a centrifugação, 240 mL do sobrenadante foram aspirados em cada tubo por meio de uma pipeta automática de 10 mL. O volume de 10 mL residual em cada tubo foi homogeneizado e as transferências foram realizadas para um tubo de centrífuga de 50 mL. Duas lavagens com 1 mL de água Milli-Q foram realizadas em cada tubo de 250 mL, e o material de ALF concentrado foi transferido para o tubo de centrífuga de 50 mL. Por fim, uma nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições anteriores.

Os sobrenadantes aos *pellets* de cada amostra foram aspirados e descartados até a marcação de 10mL. Sem promover agitação, foi adicionado ácido sulfúrico a 0,0149N gota a gota em cada amostra até atingir o valor de pH igual a 3. O volume foi homogeneizado por meio das respectivas pipetas *Pasteur* e as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente.

Após a centrifugação, os sobrenadantes aos *pellets* foram descartados e os valores de pHs foram neutralizados por meio da adição de DPBS. As amostras foram novamente homogeneizadas com as respectivas pipetas *Pasteur* e mais uma vez foram centrifugadas.

A neutralidade da amostra era verificada. Caso houvesse necessidade, a etapa descrita no parágrafo anterior era repetida até que o pH estivesse próximo do valor neutro. Assim, o sobrenadante era descartado até a marcação de 5 mL e as transferências eram realizadas para os respectivos TLPs. Duas lavagens em cada tubo de centrífuga eram realizadas, de forma que, o volume resultante das lavagens era

transferido cada qual para seu respectivo TLP. Ao final, as amostras contidas nos TLPs eram processadas em IMS.

4.4.4. Purificação Mediante Separação Imunomagnética (IMS)

O Procedimento 2 – Purificação das Amostras por Separação Imunomagnética (IMS) está ilustrado na Figura 4.17. Tal procedimento segue as instruções do *kit Dynabeads® Life Technologies™* e foi aplicado à todas as amostras contendo protozoários.

Figura 4.17 - Esquema simplificado das etapas do procedimento de IMS.
Fonte: MACIEL, 2014

Todos os materiais que entrassem em contato com amostras contendo protozoários eram previamente enxaguadas com solução de eluição *Tween* 80 a 0,1%. Os materiais eram nomeados conforme as respectivas amostras avaliadas.

Antes de iniciar o procedimento, o kit *Dynabeads® Invitrogen* era removido da geladeira e os produtos ficavam em *stand by* até atingirem a temperatura ambiente (Figura 4.18). É relevante destacar o cuidado ao manusear o kit, principalmente em relação às soluções *Dynabeads® Anti-Giardia* e *Dynabeads® Anti-Cryptosporidium*, que representam um elevado custo. Ambas eram mantidas voltadas para cima, até no momento de se efetuar as devidas homogeneizações. Agitações incorretas poderiam representar perdas dos valiosos produtos em suas tampas.

Figura 4.18 - Kit *Dynabeads® Invitrogen*.

A Figura 4.19 apresenta uma série de imagens que facilitam a compreensão do procedimento de purificação por IMS.

Legenda: A – Tubo de lado plano (TLP); B – Adição de *dynabeads* à amostra; C – Mixer rotatório (Invitrogen Dynabeads® Sample Mixer); D – Concentrador de partículas magnéticas 1 (MPC-1); E – Homogeneização do complexo “*dynabeads* + amostra”; F – Concentrador de partículas magnéticas 2 (MPC – S); G – Dissociação ácida da amostra; H – Adição de base ao poço; I – Adição da amostra ao poço.

Figura 4.19 - Acessórios, equipamentos e procedimentos necessários à purificação por IMS.

A seguir os passos do Procedimento 2 para purificar as amostras por separação imunomagnética (IMS):

1. Em cada TLP (Figura 4.19-A), era adicionado 1 mL de solução tampão SL-A 10X e 1 mL de solução tampão SL-B, ambos fornecidos pelo *kit*. Posteriormente, eram adicionados os anticorpos, conjugados às microesferas magnéticas, específicos para os antígenos das paredes dos cistos de *Giardia* spp. e dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., complexos estes denominados

Dynabeads® Anti-Giardia e *Dynabeads® Anti-Cryptosporidium* respectivamente (Figura 4.19-B). Para tal adição, era realizada a homogeneização da solução de *Dynabeads® Anti-Giardia* em vórtex, sempre com muita cautela, evitando que a solução fosse perdida pela adesão na tampa do recipiente. Também com seguidas aspirações e dispensas da solução com uma micropipeta automática de 100 µL finalizava-se a homogeneização e 100 µL da solução eram adicionados em cada TLP. O procedimento era repetido para a solução de *Dynabeads® Anti-Cryptosporidium*;

2. Os TLPs eram fixados ao mixer rotatório e os tubos eram agitados a 18 rpm por no mínimo uma hora à temperatura ambiente (Figura 4.19-C). Utilizando um cronômetro, a rotação de 18 rpm era verificada, caso contrário, modificava-se a rotação do aparelho até obter a rotação desejada;
3. Enquanto as amostras eram homogeneizadas, a solução tampão SL-A 10X do *kit* era diluída para a concentração de 1X. Para cada TLP era utilizado 1,4 mL de solução diluída em 1X. Desta forma, era preparado um volume de solução diluída um pouco acima do volume necessário. Por exemplo, se houvessem 3 TLPs, era preparado 5 mL de solução diluída em 1X. Portanto, do volume de 5 mL preparado, 500 µL seriam representados pela solução tampão SL-A 10X e 4500 µL seriam de água reagentes Milli-Q.

Após preparo de solução tampão SL-A 1X, todos os produtos do *kit* IMS eram cuidadosamente recolocados na caixa e retornavam à geladeira. O procedimento era prosseguido conforme descrito:

4. Após o período de agitação, um dos TLPs era removido do mixer rotatório e era acoplado ao primeiro concentrador de partículas magnéticas (MPC-1). É de extrema importância destacar que o TLP era sempre conectado ao primeiro concentrador de partículas de forma que, o lado plano do tubo era mantido em contato com a parte que contém o ímã e a tampa do tubo ficava voltada para cima (Figura 4.19-D). Os outros TLPs eram mantidos em mistura no mixer rotatório garantindo que nenhuma amostra permanecesse em repouso. No TLP aderido ao MPC-1, eram realizados movimentos manuais em um ângulo de 90°, inclinando a extremidade da tampa do tubo para cima e para baixo, sendo que o lado plano do ímã deve permanecer em contato com o líquido tanto na posição horizontal como na vertical. Um movimento completo deve ser de 1 s por um

curto período de 2 min. Desta forma, eram realizados cerca de 120 movimentos completos;

5. Sem remover o TLP do concentrador de partículas, o conjunto era retornado à posição vertical (com a tampa voltada para cima) e o descarte da amostra era realizado com o lado plano do tubo voltado para cima;

As duas etapas anteriores eram repetidas para os outros TLPs contendo as demais amostras.

Antes de iniciada a próxima etapa, os microtubos de 1,5 mL das respectivas amostras eram enxaguados com *Tween* 80 a 0,1%, devidamente marcados e colocados no segundo concentrador de partículas (MPC-S) sem a fita magnética;

6. Com uma pipeta automática de 1 mL, 0,4 mL da solução tampão SL-A X diluído em 1X era adicionada somente na parte plana do TLP, de forma a evitar atingir os resíduos aderidos nas outras paredes do tubo. A amostra era suavemente misturada com o tampão diluído através de movimentos horizontais (Figura 4.19-E). A mistura era feita sem que a solução “amostra + tampão diluído” não ultrapassasse o limite do lado plano do tubo, evitando tocar outras partes do tubo e carrear sujidades indesejadas;
7. Quando a solução adquiria aspecto homogêneo, era feita a transferência da amostra para o respectivo microtubo de 1,5 mL. Para tanto, era utilizada uma pipeta *Pasteur* de vidro de 230 mm previamente enxaguada com *Tween* 80 a 0,1%;
8. As etapas 5 e 6 eram repetidas para a mesma amostra, ou seja, o mesmo TLP recebia os volumes de solução tampão diluída e o material resultante era transferido para o respectivo microtubo, totalizando 1,2 mL. O tubo era então conectado ao segundo concentrador de partículas MPC-S (Figura 4.19-F) sem a fita magnética;
9. O mesmo procedimento (etapas 5, 6 e 7) era repetido para as outras amostras;
10. Com os microtubos acoplados ao 2º concentrador de partículas, a fita magnética removível era inserida e iniciavam-se os movimentos manuais. Cada movimento era feito em um ângulo de 180° por 1 s, evitando que as tampas dos microtubos ficassem direcionadas para baixo. Durante 1min, os movimentos eram repetidos, ou seja, ao todo eram realizados cerca de 60 movimentos completos;

11. O segundo concentrador de partículas, juntamente com os microtubos, eram retornados à posição original. Com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* de vidro de 230 mm previamente enxaguada com *Tween* 80 a 0,1%, aspirava-se e descartava-se o material que não estava aderido à parede do tubo, sendo que, primeiramente era efetuado o descarte do material na tampa do microtubo, e posteriormente o material restante. É importante salientar que tal procedimento era realizado evitando encostar a ponta da pipeta *Pasteur* no material aderido à parede do microtubo. A etapa era repetida para as outras amostras com as respectivas pipetas *Pasteur*;

Os microtubos contendo o complexo “*Dynabeads* + amostra” eram removidos do MPC-S e, posteriormente, fita magnética era também removida.

Finalizada as etapas de concentração, era preciso separar as microesferas das respectivas amostras. O procedimento que caracteriza essa separação é conhecido por dissociação, havendo a possibilidade de ser ácida ou térmica. Nesta pesquisa, foi utilizada somente a dissociação ácida, descrita em seguida.

12. Para realizar a dissociação ácida era preciso enxaguar o microtubo contendo a amostra com solução de ácido clorídrico 0,1N. O procedimento era realizado duas vezes, sendo, portanto, efetuadas duas dissociações ácidas. A primeira dissociação ácida era iniciada com a inserção de 50 µL de ácido exatamente sobre a amostra anexada à parede do microtubo por meio de uma micropipeta automática de 100 µL. A adição ácida era efetuada de forma cautelosa, gota a gota, objetivando atingir diretamente a amostra e não a parede do microtubo;
13. Depois de inserido o ácido, com muito cuidado, o material contido no microtubo era homogeneizado em vórtex por aproximadamente 1 min. Caso fosse misturado de maneira incorreta, o material contido no fundo do microtubo poderia novamente aderir à parede do recipiente;
14. O microtubo era retornado ao segundo concentrador de partículas sem a fita magnética onde era mantido em repouso por no máximo 10 min;
15. Decorrido o tempo de 10 min de repouso, a amostra, que apresentava nítida distinção entre as fases (Figura 4.19-G), era cuidadosamente homogeneizada em vórtex e recolocada no mesmo concentrador de partículas MPC-S, agora com a fita magnética. As microesferas (*Dynabeads*) eram rapidamente aderidas à parede do microtubo próxima ao ímã, assim, aguardava-se o tempo mínimo de

10 s para que fosse efetuada a etapa de transferência da amostra dissociada acidamente;

As três etapas anteriores eram repetidas para as outras amostras. Lembrando que o tempo máximo em que as amostras permaneciam em contato com o ácido era de 10 min.

Enquanto os microtubos eram mantidos em repouso, a solução de hidróxido de sódio 1N e as lâminas do *kit* Merifluor® eram colocadas nas proximidades do segundo concentrador de partículas. As lâminas eram marcadas, sendo que, cada lâmina representava uma única amostra. Desta maneira, o poço localizado próximo à parte fosca da lâmina recebia a amostra da primeira dissociação ácida e o poço na outra extremidade, a amostra da segunda dissociação ácida.

16. Enquanto os *Dynabeads* eram aderidos à parede do microtubo, 5 µL de hidróxido de sódio padrão 1N eram adicionados ao poço que iria receber a amostra com o uso de uma micropipeta de 10 µL. Vale ressaltar que a base era espalhada pelo poço por meio da própria pipeta que havia sido usada para inserir a base (Figura 4.19-H);

17. Sem remover o microtubo do segundo concentrador de partículas, 50 µL de amostra sobrenadante eram coletados com uma micropipeta automática previamente enxaguada com *Tween* 80 a 0,1%, e o material era depositado no poço contendo a solução de hidróxido de sódio adicionado na etapa anterior (Figura 4.19-I);

As etapas 14, 15 e 16, eram realizadas para as outras amostras que estavam em repouso por 10 min em contato com o ácido.

18. A segunda dissociação ácida e a transferência das amostras dissociadas eram realizadas devido à repetição das etapas 12 à 17 para os poços correspondentes à segunda dissociação ácida.

As amostras eram mantidas em repouso até secarem. Em média, era necessário aguardar 3 horas, contudo, foi padronizado aguardar em *overnight*, já que o período de secagem era variado. Cabe ressaltar que o ambiente climatizado do laboratório favorecia a secagem dos poços.

A montagem das lâminas utilizando o *kit* Merifluor® era iniciada somente depois de observada a completa secagem dos poços. Segundo o Método 1623.1, o limite de preparo das lâminas é de até 72 horas.

4.4.5. Preparo das Lâminas de Acordo com o *kit* Merifluor®

Para preparar as lâminas com as amostras era necessário executar uma série de etapas. Assim, como descrito nos procedimentos anteriores, foi elaborado o *Procedimento 3 – Preparo das Lâminas de acordo com o Kit Merifluor®*. Muitas das etapas descritas neste procedimento se assemelham às etapas do *Procedimento 1 – Determinação da concentração de protozoários em cepas para posterior inóculo* (item 4.4.2). Contudo, alguns detalhes diferem do primeiro procedimento e, por este motivo, foram aqui relatados.

Na Figura 4.20, podem ser observados os produtos do *kit* Merifluor®.

Figura 4.20 - *Kit* Merifluor®.

Os passos do Procedimento 3 são descritos a seguir:

1. O *kit* Merifluor® e a solução de corante vital DAPI (4',6-diamidino-2fenil-indol da *Sigma-Aldrich*®) eram removidos da geladeira e eram utilizados depois de atingirem a temperatura ambiente. A remoção dos produtos da caixa do *kit* Merifluor® acelerava o processo;
2. A solução-mãe do corante vital DAPI era preparada pela adição de 2 mg de DAPI para cada mililitro de metanol. A concentração final do DAPI era de aproximadamente 1:2500 em PBS;
3. As câmaras escuras e úmidas eram preparadas e recebiam os nomes conforme as amostras geradas nas etapas anteriores. O preparo das câmaras consistia no envolvimento de placas de *Petri* em papel alumínio, tanto na tampa como na parte inferior. Dentro de cada placa dispunha-se de um pequeno pedaço de papel absorvente dobrado e umedecido com água deionizada;
4. As amostras secas eram cobertas pela adição de metanol objetivando fixar a amostra ao poço da lâmina. Inicialmente eram utilizados 10 µL de metanol para cada poço. Caso houvesse necessidade, mais metanol era adicionado e aguardava-se a secagem das amostras por pelo menos 10min;
5. A lâmina era transferida para a placa de *Petri*. Na ausência de luz, uma gota do reagente de detecção do *kit* Merifluor® (frasco de tampa azul) era pingado no centro de cada poço contendo a amostra. Logo em seguida, uma gota do contra corante *kit* Merifluor® (frasco de tampa verde) também era pingada no centro de cada poço com amostra. Por fim, a placa de *Petri* era tampada e aguardava-se 30 min, conforme recomendações do *kit* Merifluor®. A etapa era repetida para as outras amostras;
6. A solução tampão do *kit* Merifluor® de 20X era diluída para 1X utilizando água reagente Milli-Q. O volume de solução tampão diluída era preparado de acordo com a necessidade. Em cada poço são necessários 300 µL de solução tampão diluída, desta forma, atentava-se à quantidade de poços, e desta forma, o volume de solução a ser preparada era calculado. Sempre era preparado um volume superior ao calculado, garantindo que não faltaria produto;
7. Decorrido o tempo estipulado na etapa 5 e ainda na ausência de luz, as lâminas eram removidas das placas de *Petri*. Uma das lâminas era inclinada em um ângulo de aproximadamente 30° em relação à mesa de forma a garantir que o líquido escorresse pela lâmina. Posteriormente, era realizada a lavagem dos dois poços contendo as amostras com 50 µL de solução tampão diluída. O

- procedimento era repetido para as outras lâminas. Depois de finalizada a primeira lavagem em cada poço, mais duas lavagens eram realizadas, executando, ao final, três lavagens por poço;
8. Com cautela, os resquícios das lavagens ao redor de cada poço eram removidos utilizando um pequeno pedaço de papel absorvente;
  9. Em seguida, as lâminas eram recolocadas nas respectivas câmaras escuras e úmidas. Cada poço recebia 50 µL da solução de corante vital DAPI (1:2500 em PBS). As placas de *Petri* eram tampadas e as amostras eram mantidas com o corante por no máximo 10 min;
  10. As lâminas eram novamente removidas das câmaras úmidas e escuras e, ainda na ausência de luz, era realizada a lavagem dos poços com solução tampão diluída. A lavagem era feita de forma idêntica à etapa 7 e os resquícios das lavagens ao redor dos poços eram removidos com um novo papel absorvente;
  11. 10 µL de água reagente Milli-Q era colocado no centro de cada poço e após 1 min, as lâminas eram inclinadas, como descrito anteriormente, e o excesso de água escorria pela lâmina. Ao redor dos poços, era utilizado um novo papel absorvente para enxugar e remover o excesso de água reagente;
  12. Uma gota do meio de montagem do *kit* Merifluor® (frasco de tampa cinza) era aplicada no centro do poço. Uma lamínula era colocada sobre o poço, sempre em inclinação próxima a 45° em relação à mesa evitando a formação de bolhas, que poderiam dificultar a posterior visualização dos (oo)cistos. A etapa era repetida para os outros poços;
  13. As bordas da lamínula eram seladas aplicando uma gota do selante CoverSlip em cada canto da lamínula. Para tanto, era preciso pressionar manualmente um canto da lamínula contra a lâmina, evitando que, no momento da selagem, ocorresse perda de amostra. A etapa era repetida para os outros poços;
  14. As lâminas eram transferidas para as respectivas câmaras úmidas e escuras, a qual eram tampadas e mantidas em refrigeração, entre 2 e 8°C.
  15. Ao final, a leitura dos poços e contagem dos (oo)cistos eram realizadas. Segundo o Método 1623.1, a leitura da lâmina pode ser efetuada em um prazo máximo de sete dias.

4.4.6. Identificação e Contagem de Protozoários Utilizando Microscopia de Imunofluorescência

A identificação, as análises confirmatórias e a contagem dos (oo)cistos eram realizadas tanto no momento da determinação do inóculo (item 4.4.2.) quanto ao final de cada método, sempre pelo uso do microscópio.

No início de cada método era realizada a contagem dos (oo)cistos em triplicata. As três contagens eram realizadas em fluorescência FITC (isotiocianato de fluoresceína) e, quando necessário, a confirmação em fluorescência DIC (microscopia de contraste interferencial diferencial) era efetuada. A confirmação em microscopia na fluorescência DAPI (4',6-diamino-2fenil-indol) não era realizada por não ter sido incluído o corante no momento da montagem da lâmina. Na contagem final, ou seja, depois de ser processado o método, a contagem em fluorescência FITC era realizada. Entretanto, as confirmações eram realizadas primeiramente em fluorescência DAPI e posteriormente em fluorescência DIC.

Geralmente a identificação e contagem dos (oo)cistos era feita no aumento de 400 vezes e, em alguns momentos, quando necessário, era feita a análise confirmatória no aumento de 800 vezes.

A contagem era feita poço a poço. E vale frisar que, em primeiro lugar, era realizada a contagem de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e, somente depois de contabilizados todos os oocistos era iniciada a contagem dos cistos de *Giardia* spp. Isto porque a perda de coloração maçã-verde fluorescente era mais acentuada nos oocistos do que nos cistos. Assim, na segunda leitura do poço, ainda era possível contabilizar os cistos enquanto que os oocistos ficavam quase que imperceptíveis à leitura.

Outro fator importante era a rapidez para realização da confirmação dos protozoários quando utilizada a fluorescência em DAPI. A leitura era realizada rapidamente se comparada com a leitura em fluorescência em FITC. Desta forma, a perda da coloração maçã-verde fluorescente não ocorria de forma acentuada, podendo assim, continuar a contagem em fluorescência FITC.

De forma equivalente à perda de coloração maçã-verde fluorescente nos protozoários, a perda de coloração azul, devido ao uso do DAPI, ainda era mais

acelerada. Assim, efetuava-se a análise em DAPI de maneira relativamente rápida, se comparada à análise em FITC.

A Tabela 4.4 descreve quais eram as análises confirmatórias primordiais dos (oo)cistos segundo os critérios da USEPA (2012).

Tabela 4.4 - Análises confirmatórias dos (oo)cistos em microscópio

FITC	DAPI	DIC	<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Giardia spp. ou Giardia lamblia</i>
Coloração maçã-verde fluorescente	-	-	Sim	Sim
Membrana mais corada que o centro	-	-	Sim	Sim
Formato	-	-	Esférico	Ovalado
Dimensões	-	-	De 3 a 8 µm de diâmetro	De 8 a 18 µm de comprimento; e de 5 a 15 µm de largura
Sutura	-	-	Sim	-
-	Coloração azul intenso	-	Sim	Sim
-	Até 4 núcleos distintos em coloração azul	-	Sim	Sim
-	Núcleos de 1,2 µm e pareados	-	-	Sim
-	-	Relevo	Sim	Sim

Após a identificação e contabilização, o número de (oo)cistos era calculado e se podia estimar a porcentagem de recuperação do método testado, assim como descreve o Método 1623.1.

Os cálculos eram feitos separadamente, ou seja, primeiro era feita a recuperação de um gênero de protozoário e depois de outro. A Equação 8 apresenta as variáveis envolvidas no cálculo.

Equação 8

$$R = \frac{(C_1 + C_2) \times FM}{Protoz.inoculados} \times 100\%$$

Em que:

R = Porcentagem de recuperação do método (%);

C_1 = Contagem de (oo)cistos na 1ª dissociação ácida;

C_2 = Contagem de (oo)cistos na 2ª dissociação ácida;

FM = Fator de multiplicação;

$Protoz.inoculados$ = número de protozoários inoculados no método.

Depois de efetuado o cálculo de recuperação, cada método era avaliado conforme o controle de qualidade do Método 1623.1, em que estabelece que a média de recuperação deva estar entre 8 – 100% para cistos de *Giardia* spp. e 32 – 100% para oocistos de *Cryptosporidium* spp.

4.5. Análise Estatística dos Métodos Mais Eficientes

Os métodos que apresentaram melhores recuperações conforme estabelece o Método 1623.1 da USEPA foram selecionados e avaliados estatisticamente com auxílio do software Minitab 17.

Para verificação da existência de diferenças entre as médias, com nível de significância de 5%, foi utilizado o Teste F pelo quadro da ANOVA. Em seguida, compararam-se as médias através do Teste de Tukey, também com 5% de nível de significância.

Com base nos resultados apontados pela análise estatística, foi selecionado o melhor método e avaliado no controle de qualidade do método.

4.6. Controle de Qualidade do Melhor Método

Os ensaios de controle de qualidade analítica do método foram realizados com algumas adaptações se comparado com o Método 1623.1 da USEPA. A substituição dos inóculos AccuSpike™ da Waterborne pelos inóculos de suspensão comercial (Waterborne) com oocistos de *Cryptosporidium parvum* e da suspensão purificada (UNICAMP) com cistos de *Giardia* spp., representa a principal alteração, pois foi inoculada uma quantidade média de (oo)cistos e não um número exato de protozoários, como determina o Método 1623.1.

A média da porcentagem de recuperação e o desvio padrão relativo à média (coeficiente de variação), foram avaliados através de 4 resultados, conforme estipula o Método 1623.1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Preparo da Água de Estudo

A Tabela 5.1 apresenta os resultados obtidos na caracterização físico-química da água coletada no poço da EESC/USP e armazenada na caixa d'água de 3000 L.

Tabela 5.1 - Caracterização físico-química da água do poço da EESC/USP

Variáveis	Unidade	Valor
Alcalinidade total	mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$	28,57
Condutividade elétrica	$\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$	46,90
Cor aparente	Pt-Co	0,0
Dureza	mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$	9,6
pH	-	6,57
Temperatura	°C	24
Turbidez	uT	0,152

Os resultados obtidos com a adição de caulinita à água do poço estão descritos na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Turbidez obtida após a adição de caulinita

Jarros	Concentração de caulinita ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Análise da turbidez nos ensaios (uT)			Média da turbidez (uT)
		Ensaio 01	Ensaio 02	Ensaio 03	
01	0,10	67,8	59,0	69,6	65,5
02	0,12	72,1	78,6	81,3	77,3
03	0,14	77,9	82,2	88,4	82,8
04	0,16	100	105	101	102,0
05	0,18	118	126	112	118,7
06	0,20	123	145	143	137,0

O valor da concentração de caulinita de 0,16 g.L⁻¹ foi selecionado para preparar a água de estudo nos ensaios de tratamento de água posteriores. Esta concentração apresentou valores de turbidez mais próximos à 100 uT, diferentemente do valor descrito por Maciel (2014), onde foi necessário apenas 0,1 g.L⁻¹ para atingir o mesmo valor de turbidez. O fato pode estar relacionado à variação da qualidade da água do poço da EESC/USP e às características da caulinita. Neste contexto, o ensaio supracitado não pode ser generalizado em outros estudos.

A qualidade da água de estudo é apresentada na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Caracterização físico-química e microbiológica da água de estudo

Variáveis	Unidade	Valor
Alcalinidade total	mg CaCO ₃ .L ⁻¹	9,6
Alumínio total	mg Al.L ⁻¹	1,32
Chumbo total	mg Pb.L ⁻¹	0,03
Cádmio total	mg Cd.L ⁻¹	< 0,002
Cálcio	mg Ca.L ⁻¹	7,93
Coliformes totais	UFC.100mL ⁻¹	6,13
Condutividade elétrica	µS.cm ⁻¹	52,95
Cor aparente	Pt-Co	947
<i>Escherichia coli</i>	UFC.100mL ⁻¹	Ausente
Dureza	mg CaCO ₃ .L ⁻¹	22,36
Ferro total	mg Fe.L ⁻¹	0,323
Manganês total	mg Mn.L ⁻¹	0,017
Magnésio total	mg Mg.L ⁻¹	1,246
Mercúrio total	mg Hg.L ⁻¹	< 0,0001
pH	-	7,02
Turbidez	uT	133

Destaque para a concentração de metais. O teor de ferro dissolvido na água, por exemplo, pode afetar nas recuperações de (oo)cistos conforme indicado por Yakub e Stadterman-Knauer (2000).

5.2. Ensaio de Tratabilidade em Jarreste

Os ensaios permitiram determinar as melhores condições do tratamento antes da realização do inóculo de protozoários. Os resultados estão descritos a seguir.

5.2.1. Diagrama de Coagulação

Os ensaios de tratabilidade preliminares foram realizados de forma a obter um ponto ótimo de dosagem do coagulante PAC conforme o valor de pH. A análise dos resultados obtidos por Pavanelli (2001), Corrêa *et al.* (2005), De Julio, Fioravante e Graham *et al.* (2010) e Ferrari, De Julio e De Julio (2011) permitiu adotar os parâmetros de mistura (rápida e lenta) para três velocidades de sedimentação com diferentes dosagens de coagulante PAC e de alcalinizante (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 - Parâmetros utilizados nos ensaios preliminares

Parâmetro	Sigla	Unidade	Valores adotados
Gradiente de velocidade na mistura rápida	G_{mr}	s^{-1}	1000
Tempo de mistura rápida	T_{mr}	s	15
Gradiente de velocidade na mistura lenta	G_{ml}	s^{-1}	25
Tempo de mistura lenta	T_{ml}	min	20
Velocidades de sedimentação	V_s	$cm.min^{-1}$	2,5; 2,0 e 1,5
Dosagem de PAC	-	$mg.L^{-1}$	5 – 65
Dosagem de alcalinizante	-	$mg.L^{-1}$	0 – 15
pH de coagulação	-	-	5,0 – 9,0

A água de estudo utilizada nos ensaios de tratabilidade foi primeiramente homogeneizada de forma manual e, posteriormente, de forma mecânica. A variação da turbidez medida após a homogeneização manual foi o principal motivo para alteração da forma de mistura. Nos primeiros sete ensaios, por exemplo, a turbidez variou entre 124 e 152 uT. Além da turbidez, os valores de cor aparente, temperatura, alcalinidade e pH

foram medidos à cada ensaio, contudo não apresentaram grandes alterações (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 - Características da água de estudo nos ensaios de tratabilidade iniciais

Ensaio de tratabilidade	Turbidez (uT)	pH	Cor aparente (Pt-Co)	Alcalinidade (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	Temperatura (°C)
1	133	7,02	947	9,60	24
2	152	7,19	1250	24,26	24
3	144	7,37	1044	23,80	26
4	126	7,82	996	NM	24
5	130	7,36	1016	24,03	25
6	127	7,55	1044	25,56	24
7	124	7,36	1024	24,03	25
Média ± Desv. padrão	134 ± 10	7,38 ± 0,2	1046 ± 89	21,88 ± 5,52	25 ± 0,7

Legenda: NM – não medido

A variação da turbidez mediante homogeneização manual provavelmente pode ter ocorrido devido à alta velocidade de sedimentação da caulinita presente na água de estudo. Diante desta dificuldade, acredita-se que diferentes concentrações de caulinita na água de estudo possam ter sido coletadas a cada ensaio realizado, o que proporcionou um aumento no valor da turbidez da água de estudo armazenada na bombona. Desta forma, o valor da turbidez da água de estudo (água bruta) passou a ser de 130 uT e não mais de 100 uT, como estabelecido no início da pesquisa.

Depois de realizados os ensaios preliminares, foi construído o diagrama de coagulação (pH versus dosagem de coagulante, com e sem alcalinizante) em função dos valores de turbidez final obtidos na velocidade de sedimentação de 1,5 cm.min⁻¹ (Figura 5.1).

A área delimitada pela linha pontilhada, representa, de forma aproximada, a região em que os valores de turbidez provavelmente são menores ou iguais a 5,0 uT (DI BERNARDO; SABOGAL PAZ, 2008).

Dois pontos “ótimos” de coagulação foram selecionados em função do melhor desempenho na remoção de turbidez e estão indicados no diagrama. A seta vermelha corresponde ao ponto “ótimo” para o tratamento com PAC e alcalinizante e, a seta

amarela indica o ponto “ótimo” para o tratamento somente com PAC, ou seja, sem alcalinizante.

Os resultados de Maciel (2014), que utilizou PAC no tratamento de uma água de estudo similar (turbidez próxima à 100 uT), indicaram que as melhores recuperações de protozoários foram obtidas sem o uso de alcalinizante. Portanto, para otimizar os parâmetros nos ensaios posteriores, foi selecionada a dosagem de 25 mg.L⁻¹ de coagulante que corresponde à 2,2 mg.L⁻¹ de Al⁺³, sem uso de alcalinizante e com pH de coagulação próximo a 6,7. O valor de pH de coagulação atendeu ao padrão de potabilidade brasileiro ($6,0 \leq \text{pH} \leq 9,0$), segundo Brasil (2011).

O ponto ótimo selecionado por De Julio *et al.* (2010) foi de 40 mg.L⁻¹ de coagulante que correspondeu a 2,27 mg.L⁻¹ de Al⁺³ e com pH de coagulação de 6,47. A dosagem de coagulante encontrada pelos autores foi superior à dosagem selecionada na presente pesquisa, entretanto, os valores de alumínio e o pH de coagulação foram relativamente próximos. A diferença nos dados pode estar associada às características do coagulante (teor de Al₂O₃ = 7,5%), características da água de estudo (turbidez = 11,15 uT; pH = 7,09; e cor aparente = 158 Pt-Co) e condições do ensaio de tratabilidade (características das misturas rápida e lenta, velocidade de sedimentação e taxa de filtração).

Figura 5.1 - Diagrama de coagulação para a água de estudo com turbidez próxima a 130 uT, em função da turbidez final, para dosagens de PAC entre 0 (zero) e 65 mg.L⁻¹ nas seguintes condições: $G_{mr} = 1000 \text{ s}^{-1}$; $T_{mr} = 20 \text{ s}$; $G_f = 25 \text{ s}^{-1}$; $T_f = 20 \text{ min}$; e $V_c = 1.5 \text{ cm.min}^{-1}$.

5.2.2. Otimização dos Parâmetros de Tratamento

A metodologia de Di Bernardo, Dantas e Voltan (2011) foi utilizada para otimizar os parâmetros. Para a mistura rápida (G_{mr} : gradiente de velocidade de mistura rápida e t_{mr} : tempo de mistura rápida) foram avaliadas as seguintes condições: i) $G_{mr} = 800, 900$ e 1000 s^{-1} ; e ii) $t_{mr} = 5, 10, 15, 20, 25$ e 30 s . A velocidade de sedimentação foram de $V_s = 2,5; 2,0$; e $1,5 \text{ cm.min}^{-1}$ (Figura 5.2).

Os ensaios seguintes visaram otimizar a mistura lenta (G_{ml} : gradiente de mistura lenta e t_{ml} : tempo de mistura lenta). As condições avaliadas foram: i) $G_{ml} = 20, 25, 30$ e 40 s^{-1} ; e ii) $t_{ml} = 10, 15, 20, 25, 30$ e 35 min . A velocidade de sedimentação foram mantidos em $V_s = 2,5; 2,0$; e $1,5 \text{ cm.min}^{-1}$ (Figura 5.3).

Após a definição das melhores condições de mistura rápida e lenta, otimizou-se a V_s , assim, os valores testados foram de $5,0; 3,0; 2,5; 2,0; 1,5$ e $1,0 \text{ cm.min}^{-1}$ (Figura 5.4). A Tabela 5.6 sintetiza os parâmetros indicados pelas setas nas Figura 5.2 a Figura 5.4.

Figura 5.2 - Otimização da mistura rápida – Turbidez remanescente em função das condições da aplicação de 25mg.L^{-1} de PAC, $G_{ml} = 20 \text{ s}^{-1}$ e $t_{ml} = 20 \text{ min}$. As velocidades de sedimentação foram de a) $V_s = 2,5 \text{ cm.min}^{-1}$; em b) $V_s = 2,0 \text{ cm.min}^{-1}$; e em c) $V_s = 1,5 \text{ cm.min}^{-1}$.

Figura 5.3 - Otimização da mistura lenta – Turbidez remanescente em função das condições da aplicação de 25 mg.L^{-1} de PAC. $G_{mr} = 1000 \text{ s}^{-1}$ e $t_{mr} = 10 \text{ s}$ em todos os gráficos sendo que as velocidades de sedimentação foram de a) $V_s = 2,5 \text{ cm.min}^{-1}$; em b) $V_s = 2,0 \text{ cm.min}^{-1}$; e em c) $V_s = 1,5 \text{ cm.min}^{-1}$.

Figura 5.4 - Otimização da velocidade de sedimentação – Turbidez remanescente em função das condições da aplicação de 25 mg.L⁻¹ de PAC adotando $G_{mr} = 1000 \text{ s}^{-1}$; $t_{mr} = 10 \text{ s}$; $G_{ml} = 25 \text{ s}^{-1}$ e $t_{ml} = 30 \text{ min}$.

Tabela 5.6 - Parâmetros definidos após otimização do tratamento

Parâmetros	Sigla	Unidade	Valor
Concentração de caulinita na água de estudo	-	mg.L ⁻¹	160
Dosagem de coagulante	-	mg.L ⁻¹	25
Gradiente de mistura rápida	G_{mr}	s ⁻¹	1000
Tempo de mistura rápida	T_{mr}	s	10
Gradiente de mistura lenta	G_{ml}	s ⁻¹	25
Tempo de mistura lenta	T_{ml}	min	30
Velocidade de sedimentação	V_s	cm.min ⁻¹	1,5

Um último ensaio de tratabilidade da água de estudo foi realizado para avaliar a capacidade dos filtros (FLA) em reduzir a turbidez. Os resultados atenderam as condições estabelecidas pela Portaria MS nº 2914/2011 e estão na Tabela 5.7. As características físico-químicas e microbiológicas da água filtrada estão na Tabela 5.8.

Tabela 5.7 - Qualidade da água filtrada

Filtro	Turbidez inicial da água de estudo (uT)	Turbidez efluente aos filtros (uT)	Eficiência de remoção de turbidez (%)
1	126	0,303	99,76
2	124	0,456	99,63
3	125	0,333	99,73
4	125	0,439	99,65
5	124	0,372	99,70
6	123	0,288	99,77

Tabela 5.8 - Características físico-químicas e microbiológicas da água filtrada

Variáveis	Unidade	Valor	Variáveis	Unidade	Valor
Alcalinidade total	mg CaCO ₃ .L ⁻¹	20	Dureza	mg CaCO ₃ .L ⁻¹	15
Alumínio total	mg Al.L ⁻¹	< 0,001	Ferro total	mg Fe.L ⁻¹	<0,005
Cádmio total	mg Cd.L ⁻¹	< 0,0006	Magnésio total	mg Mg.L ⁻¹	1,23
Cálcio	mg Ca.L ⁻¹	6,1	Manganês total	mg Mn.L ⁻¹	0,005
Chumbo total	mg Pb.L ⁻¹	< 0,01	Mercúrio total	mg Hg.L ⁻¹	<0,0001
Coliformes totais	UFC.100.mL ⁻¹	Ausente	Nitrogênio (nitrato)	mg N-NO ₃ .L ⁻¹	<0,001
Condutividade elétrica	μS.cm ⁻¹	69,8	Nitrogênio (nitrito)	mg N-NO ₂ .L ⁻¹	<0,0001
Cor	Pt-Co	0,0	Turbidez	uT	0,188

Os resultados da água filtrada descritos na Tabela 5.7 apresentaram remoções de turbidez superiores a 2-log₁₀ e condizem com os resultados encontrados por De Julio, Fioravante e Graham (2010).

Definidos os parâmetros de tratamento e verificadas as características da água de estudo e da água filtrada, o aparelho de Jarteste, com kit de filtros, estava pronto para uso. No entanto, foi realizada uma avaliação do comportamento dos FLA através de ensaios hidrodinâmicos, descritos a seguir.

5.3. Ensaios Hidrodinâmicos nos Filtros de Laboratório

Seis ensaios hidrodinâmicos foram realizados conforme as variáveis descritas na Tabela 5.9.

Tabela 5.9 - Valores calculados, medidos e estabelecidos antes do início do ensaio hidrodinâmico

Variáveis	Unidades	Valores
Diâmetro interno do filtro	cm	1,9
Altura da coluna de água	cm	17,0
Volume teórico	mL	48,2
Volume medido	mL	50,0
Vazão	mL.min ⁻¹	20,0
Tempo de detenção hidráulico teórico - TDH _{teórico}	min	2,5
Concentração do pulso	mg.L ⁻¹	50.000

Na Tabela 5.9, pode-se verificar que o volume teórico de água calculado foi praticamente o mesmo do volume medido na prática, assim, não foi necessário realizar o cálculo de volume de água entre os poros.

Após realização dos ensaios hidrodinâmicos foram selecionados dois resultados que demonstraram comportamentos divergentes dos filtros. O comportamento insatisfatório está representado na Figura 5.5 com diversos picos de concentrações de sal. Segundo Levenspiel (2000), a anomalia observada assemelha-se à recirculação do fluido ou à formação de caminhos preferencias, não sendo possível fazer observações mais detalhadas a partir deste comportamento. Após realização do ensaio, foi verificada a presença de bolsões de ar (Figura 4.5-B) no filtro, o que pode ter influenciado negativamente o ensaio. Isto indica que a adequada preparação do filtro influencia diretamente o comportamento do mesmo.

Figura 5.5 - Ensaio hidrodinâmico insatisfatório com 100 mg.mL⁻¹ de concentração de sal e 4 min de ensaio.

O ensaio satisfatório selecionado está representado na Figura 5.6. O tempo de detenção hidráulica prático encontrado foi de 3,71 min, diferentemente do tempo teórico, estabelecido em 2,5 min. O aumento do tempo de detenção hidráulica medido em relação ao tempo de detenção hidráulica teórico ocorreu devido à longa cauda gerada no gráfico. Segundo Levenspiel (2000), este comportamento pode ocorrer quando o traçador utilizado (no caso o sal) possui afinidade com o material utilizado no filtro (areia) ou com as paredes do reator, podendo adsorver concentrações de sal, que ao longo do tempo, são liberadas constantemente pela passagem de água. A presença de curtos-circuitos hidráulicos também pode ser um dos motivos para a ocorrência deste fenômeno.

Figura 5.6 - Ensaio hidrodinâmico satisfatório com 100 mg.mL^{-1} de concentração de sal e 10min de ensaio.

Cota (2011), que também utilizou NaCl como traçador em forma de pulso, também verificou a presença de elevada assimetria e a longa cauda nos ensaios hidrodinâmicos. O autor acredita que este fenômeno indica uma elevada dispersão dos dados e que o lento decaimento da condutividade ao longo do tempo pode ter ocorrido em virtude de fenômenos de difusão em zonas mortas ao longo do filtro. Ele também acredita que o traçador possa ter se difundido nestas áreas sendo aos poucos liberado, provocando atraso em sua resposta na saída da unidade.

Costa *et al.* (2012) apesar de utilizar eosina Y como traçador novamente verificou a cauda longa nos ensaios realizados em filtro lento feito de PVC com 10 mm de diâmetro, 50 cm de altura, preenchido com carvão ativado e areia. O filtro operava com vazão de aproximadamente 3 L.h^{-1} , taxa de aplicação superficial de $3 \text{ m}^3.\text{m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ e TDH de 1,2 h. Os autores acreditam que o fenômeno da cauda é resultante da adsorção do traçador no meio filtrante e de sua lenta liberação no efluente dos filtros. Eles também acreditaram que o filtro apresentava caminhos preferenciais em vista do adiantamento do pico de concentração máxima do traçador.

Tonetti *et al.* (2011) igualmente realizaram o ensaio hidrodinâmico utilizando sal na forma de pulso, entretanto, foi avaliado o comportamento do filtro em fluxo ascendente. Eles concluíram que o reator não apresentava zonas mortas e estava atuando de maneira próxima à pistonada, portanto, a realização de ensaios hidrodinâmicos com fluxo ascensional é indicada.

Portanto, a partir do resultado obtido na Figura 5.6, foram aplicados os modelos hidrodinâmicos e os resultados estão na Figura 5.7 e na Tabela 5.10.

Figura 5.7 - Aplicação dos modelos hidrodinâmicos em função da curva DTR real

O modelo N-CSTR indica ser o melhor a ser aplicado, conforme a Figura 5.7. A partir da Figura 5.6, foi realizado o rebatimento da curva DTR obtida, de forma a avaliar um melhor desempenho do filtro evitando o encaudamento. O tempo de detenção hidráulico praticamente igualou-se ao tempo de detenção hidráulica teórico sendo de 2,6 min. O resultado está na Figura 5.8.

Figura 5.8 - Ajuste da curva DTR conforme modelo N-CSTR

Os modelos foram aplicados nesta curva e os resultados encontram-se na Figura 5.9. Os parâmetros dos modelos ajustados estão descritos na Tabela 5.10.

Figura 5.9 - Aplicação dos modelos hidrodinâmicos em função da curva DTR ajustada

Tabela 5.10 - Parâmetros dos modelos ajustados

	Modelos aplicados					
	N-CSTRs em série		Pequena dispersão		Grande dispersão	
	N	R^2	D/uL	R^2	D/uL	R^2
Curvas DTR						
Real	6	0,88	0,082	0,71	0,089	0,59
Ajustada	35	0,94	0,014	0,95	0,014	0,93

A análise da Tabela 5.10 comprova a escolha do modelo CSTR de acordo com o coeficiente de determinação (R^2) gerado, sendo de 0,88 para o modelo CSTR, e de 0,71 e 0,59 para os modelos de pequena e grande dispersão, respectivamente. A quantidade reatores em série obtida foi de $N = 6$ para o ajuste do modelo CSTR na curva real e de $N = 35$ excluindo-se a cauda. Segundo Levenspiel (2000), para $N > 30$ o equacionamento do sistema pode ser feito seguindo-se o modelo de fluxo em pistão ideal. Conclui-se que o filtro pode trabalhar de maneira pistonada variando entre 6 e 35 reatores em série, conforme demonstraram os resultados.

Jimenez *et al.* (1988) avaliou 5 traçadores em ensaios de filtros submersos e concluiu que o corante azul *Dextran 2000* não produz o efeito da cauda. Os autores recomendam a aplicação deste produto em outros reatores de forma a comprovar sua eficiência, especialmente quando existem baixas vazões. Neste contexto, mais estudos

devem ser realizados visando testar outros traçadores nos FLA. Destaca-se que o uso de sal, como traçador, em unidades de estações de tratamento de água, é fundamental pela não toxicidade, contudo, observam-se suas limitações.

5.4. Potencial Zeta

Os resultados da medição de potencial zeta (pZ) estão na Tabela 5.11. As amostras, indicadas na Tabela 5.11, foram coletadas nos ensaios de tratabilidade da água de estudo e não coincidem com os ensaios realizados nos métodos de detecção testados nesta pesquisa.

Tabela 5.11 - Análise do potencial zeta em relação ao pH de coagulação

Amostra *	Água bruta		Água coagulada	
	pH	pZ (mV)	pH	pZ (mV)
1	7,56	-22,2	6,82	6,09
2	7,58	-22,2	6,80	3,02
3	7,58	-22,2	6,79	-2,42
4	7,58	-22,2	6,87	-2,23
5	7,46	-22,8	6,81	2,30
6	7,57	-21,4	6,88	1,79
7	7,54	-22,6	6,92	-3,15
8	7,45	-22,2	6,77	-0,127
9	7,64	-23,0	6,89	2,97
10	7,63	-23,9	6,72	2,75
11	7,44	-22,6	6,82	-1,14
12	NM	-22,1	NM	3,36
13	7,82	-21,8	6,82	3,38
14	7,69	NM	6,96	1,66
15	NM	NM	6,89	-2,86
16	NM	NM	6,85	-0,354
17	7,43	-22,2	6,67	1,51
18	7,59	-24,3	6,85	0,861
19	7,58	-22,1	6,84	3,50
20	7,62	-22,3	6,76	0,206

Legenda: * – Amostras coletadas nos ensaios de tratabilidade da água de estudo. NM – Não medido.

Na Tabela 5.11, o valor de potencial zeta na água bruta apresenta valores próximos de $pZ = -22,0$ mV. Já para a água coagulada, os valores de pZ aproximaram-se de zero, tanto positiva como negativamente, não havendo um valor numérico constante. De Julio *et al.* (2006) avaliaram o tratamento de águas por meio da tecnologia de ciclo completo com flotação por ar dissolvido (FAD) e verificaram ótimas condições de tratamento mesmo com valores do potencial zeta distantes do ponto isoelétrico, portanto, o pZ não foi um fator determinante no tratamento. Entretanto, como destacado por Bustamante *et al.* (2001) e Hsu, Huang e Pan (2001), os valores de pZ podem

influenciar na carga elétrica dos (oo)cistos, sendo assim, tal parâmetro deve ser considerado na pesquisa.

5.5. Análise dos Resíduos Sólidos

A Tabela 5.12 demonstra a variação dos valores de pH, sólidos sedimentáveis e DQO em lodos de algumas ETA.

Tabela 5.12 - Características do lodo de ETA (adaptado de De Julio, Santos e Oroski (2009))

ETA	Coagulante	pH	Sol. Sed. (mL.L ⁻¹)	DQO (mg.L ⁻¹)
Iguaçu	PAC/ Sulfato de alumínio	6,7	220	51
Saí-Guaçu	PAC	6,1	400	<5
Guarapuava	Sulfato de alumínio	6,3	260	<5
Pitangui	PAC/ Sulfato de alumínio	6,7	180	29
Tibagi	Cloreto férrico	7,2	100	270
Medianeira	Sulfato de alumínio granulado	7,6	42	107
União da Vitória	Sulfato de alumínio	6,4	210	76
São Mateus	PAC	-	-	<5
Maringá	Sulfato de alumínio	6,6	-	74
Cascavel	PAC	7,6	43	167

Fonte: Weber e Torres (2007)

Dentre as diversas características que compõem os resíduos sólidos gerados em estações de tratamento de água, algumas foram abordadas e os resultados estão descritos nos tópicos que seguem.

5.5.1. Sólidos Sedimentáveis em Cone *Imhoff*

Conforme, observado na Figura 4.9, não foi possível visualizar a sedimentação de sólidos na amostra de ALF no ensaio de cone *Imhoff*, apesar de que na literatura há registro de diversas medições de sólidos sedimentáveis para esta amostra, como por exemplo, entre 1,1 e 3,3 mL.L⁻¹ (FREITAS *et al.*, 2010) como também entre 15 e 90 mL.L⁻¹ (SOUZA FILHO; DI BERNARDO, 1999).

Desta forma, a análise de sólidos sedimentáveis somente foi realizada para a amostra de resíduo sedimentado (lodo). A Figura 5.10 mostra o resultado obtido.

Figura 5.10 - Análise de sólidos sedimentáveis em cone *Imhoff* da amostra de lodo.

Os valores destacados no gráfico facilitam a visualização do volume de sólidos sedimentados. Após 12 horas, o volume permaneceu praticamente constante (28 mL), assim, adotou-se que, depois de finalizado o ensaio em Jarreste – coagulação, floculação, sedimentação e filtração – os jarros deveriam permanecer imóveis por este período, garantindo uma completa sedimentação dos resíduos simulando, assim, um decantador de alta taxa hipotético.

Barroso (2007) avaliou os sólidos sedimentáveis em lodos de ETA e verificou que a aplicação de PAC gerou menor teor de sólidos sedimentáveis quando comparado ao lodo gerado sistemas que empregaram sulfato de alumínio, sendo de 470 mL.L⁻¹ e 550 mL.L⁻¹, respectivamente. Na Tabela 5.12, também são exibidos alguns valores de

sólidos sedimentáveis em diferentes ETA, todos superiores ao encontrado na presente pesquisa. Evidentemente as características da água de estudo e do coagulante, além dos resultados dos ensaios de tratabilidade, são responsáveis pelas variações de sólidos sedimentáveis reportados na literatura.

5.5.2. Sólidos Totais

Os resultados obtidos na análise de sólidos totais estão descritos na Tabela 5.13.

Tabela 5.13 - Análise de sólidos totais

Amostras	Cadinho (g)	Amostra + Cadinho (g)	Volume (mL)	Sólidos Totais - ST (mg.L ⁻¹)	Média ST (mg.L ⁻¹)	Desv. Pad. (mg.L ⁻¹)
Água filtrada	105,3478	105,3528	50	100	111	8
	98,6048	98,6107	50	118		
	103,784	103,7898	50	116		
Sobrenadante ao resíduo sedimentado	108,5084	108,5138	50	108	141	57
	104,1854	104,1965	50	222		
	107,0803	107,0849	50	92		
Água de lavagem dos filtros (ALF)	108,6879	108,6937	50	116	90	35
	107,6686	107,6743	50	114		
	105,1476	105,1496	50	40		
Resíduo sedimentado	108,5064	108,799	100	2926	2916	13
	109,0151	109,3076	100	2925		
	104,1909	104,4806	100	2897		

Analisando a Tabela 5.13, o teor de sólidos totais da ALF foi ligeiramente inferior ao valor encontrado na água filtrada. Entretanto, desconsiderando o valor de 40 mg.L⁻¹ do teor de sólidos medido na amostra de ALF, a média desta amostra eleva de 90 ± 35 mg.L⁻¹ para 115 ± 1 mg.L⁻¹, o que condiz com um resultado mais coerente, já

que o teor de sólidos totais da água filtrada, teoricamente, deve ser inferior ao da ALF. Esses valores, são inferiores ao encontrado por Freitas *et al.* (2010) que encontraram médias entre 47 e 62 mg.L⁻¹, porém, superiores ao encontrado por Souza Filho e Di Bernardo (1999) que encontraram valores entre 367 e 710 mg.L⁻¹. A divergência de valores de sólidos totais pode ocorrer devido às características da água bruta e de acordo com a qualidade e quantidade de água utilizada na lavagem dos filtros em cada ETA (ACHON; BARROSO; CORDEIRO, 2013).

O valor de sólidos totais para a amostra de resíduo sedimentado (cerca de 3000 mg.L⁻¹) apresentou-se dentro dos valores encontrado na literatura, como descreve Cordeiro (1999).

5.6. Análises Complementares

5.6.1. DQO

Segundo a Tabela 5.14, o valor de DQO médio para ALF foi de 6,7 mg.L⁻¹ e está abaixo dos valores medidos por Freitas *et al.*, (2010), em que a variação foi de 30,7 à 49,1 mg.L⁻¹, em média.

O valor de DQO medido para amostra de resíduo sedimentado foi de 15,3 mg.L⁻¹ e está entre os valores medidos nas ETA da Tabela 5.12, porém, abaixo dos valores descritos em Cordeiro (1999) e Reis *et al.*, (2004). As características da água de estudo e do coagulante, além dos resultados dos ensaios de tratabilidade, são responsáveis pela oscilação dos resultados.

Tabela 5.14 - Análise de DQO

Amostra	DQO (mg.L ⁻¹) em			Média	Desv. Pad.
	triplicata			(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)
Água de estudo	6,0	4,0	7,0	5,7	1,2
Água filtrada	4,0	1,0	2,0	2,3	1,2
Água de lavagem dos filtros (ALF)	7,0	5,0	8,0	6,7	1,2
Resíduo sedimentado	16,0	20,0	10,0	15,3	4,1

5.6.2. Turbidez e pH

Os baixos valores de turbidez do sobrenadante aos resíduos e da ALF, descritos na Tabela 5.15, contribuem para a realização dos métodos de detecção de protozoários, diferentemente da elevada turbidez observada nos resíduos sedimentados (aproximadamente 4000 uT), podendo ser um fator interferente na realização da separação imunomagnética (IMS), conforme descreve Francy *et al.* (2004).

Tabela 5.15 - Turbidez e pH das amostras geradas no tratamento

Amostras	Turbidez (uT)	pH
Água de estudo	139	7,56
Água filtrada	0,386	7,11
Sobrenadante ao resíduo	0,706	7,35
Água de lavagem dos filtros (ALF)	6,51	7,01
Resíduo sedimentado	3780	7,28

Conforme observado na literatura, a turbidez para a amostra de ALF pode variar muito. Para a amostra de ALF, por exemplo, Souza Filho e Di Bernardo (1999) registraram uma oscilação entre 130 e 240 uT e, Freitas *et al.* (2010) mediu valores entre 49,6 e 58,4 uT. Assim, o valor de 6,51 uT é baixo, se comparado aos trabalhos consultados. Para a amostra de resíduo sedimentado, não foram encontradas medições de turbidez, sendo mais usual avaliar o teor de sólidos.

Os valores de pH mudam pouco se comparado com os valores de turbidez, como observado por Barroso (2007) e também na Tabela 5.12.

Os valores de pH apresentados na Tabela 5.15 estão próximos da neutralidade, fator importante para realização dos ensaios com IMS, conforme descreve USEPA (2012).

5.7. Recuperação de Protozoários nos Métodos Testados

Na presente pesquisa foram avaliados 20 protocolos de detecção de (oo)cistos nos resíduos (sedimentado e ALF). Múltiplos ensaios em Jarteste, com diferentes inóculos, foram realizados visando estabelecer o protocolo mais adequado segundo os padrões de recuperação estabelecidos pelo Método 1623.1 (USEPA, 2012).

Os ensaios de tratabilidade foram realizados utilizando-se os parâmetros otimizados descritos na Tabela 5.6. Os métodos testados foram enumerados e apresentados de forma sucinta na Tabela 5.16.

Tabela 5.16 - Recuperações obtidas nos métodos avaliados

Método	Média de (oo)cistos inoculados		Amostras	(Oo)cistos contados		FM	Recuperação (%)	
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.		<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.		<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.
1	1304 ^W	1412 ^W	S	36	0	-	-	-
			RS	14	7	12	15,80	5,95
			ALF	2	0	-	-	-
2	6018 ^W	6276 ^W	RS	37	38	15	9,22	9,08
			ALF	22	1	-	-	-
3	1093 ^W	1042 ^W	RS	32	48	4	11,71	18,43
			ALF	0	0	-	-	-
4	3569 ^{C+}	437 ^{C+}	RS	4	17	3	0,34	11,68
			ALF	0	0	-	-	-
5	993 ^W	989 ^W	RS + Tw	51	66	1	6,67	5,14
6	1016 ^W	1043 ^W	RS + Ex-TLP	1934	23	1	190,42	2,20
			RS+Tw-TLP	1711	17	1	168,46	1,63
7	1866 ^{C+}	211 ^{C+}	RS + Ex-TLP	2189	28	1	117,33	13,25
	999 ^W	939 ^W	RS + Ex-TLP	1871	335	1	187,29	35,66
8	874 ^W	2734 ^U	RS + Ex	18	2	24	5,49	15,80
			S	0	0	1	0,00	0,00
9	802 ^W	1301 ^U	RS + Ex	6	2	23,4	17,50	3,60
10			RS + ICN7X	10	9	23,2	28,92	16,05
11			RS + Ex-TLP	805	357	1	100,33	27,45
12			RS + ICN7X-TLP	1005	489	1	125,26	37,60
13			RS + S+ FCCa	244	135	3	91,23	31,14
13 - Rep. 1	605 ^W	1319 ^U	RS + S+ FCCa	44	65	3	21,81	14,78

13 - Rep. 2	737 ^W	689 ^U	RS + S+ FCCa	2	88	3	0,81	38,32
13 - Rep. 3	664 ^W	656 ^U	RS + S+ FCCa	1	6	3	0,45 ^{Dyn}	2,74 ^{Dyn}
14	574 ^W	626 ^U	RS + S+ FCCa	523	142	1	91,17	22,70
15 Triplicata	859 ^W	1356 ^U	RS + S + FCCa	141	208	3	49,26	46,02
			ALF + FCCa	5	1	-	-	-
			RS + S + FCCa	224	198	3	78,26	43,81
			ALF + FCCa	0	1	-	-	-
			RS + S + FCCa	152	219	3	53,11	48,45
			ALF + FCCa	5	2	-	-	-
16	100 ^{Ac}	100 ^{Ac}	RS + S + FCCa	0	5	3	0,00	15,00
17	100 ^{Ac}	100 ^{Ac}	RS + S + FCCa	8	19	1	8,00	19,00
18	811 ^W	1388 ^U	RS+ICN 7X	0	30	3	0,00	6,49
19			RS	0	77	3	0	16,65
ALF			0	0	1	0,00	0,00	
19 Triplicata	741 ^W	619 ^U	RS+ICN 7X	136	13	3	55,09	6,30
			RS+ICN 7X	117	47	3	47,39	22,78
			RS+ICN 7X	52	11	3	21,06	5,33
20 Triplicata			RS	148	61	3	59,95	29,56
RS			51	44	3	20,66	21,32	
RS			82	56	3	33,21	27,14	

Siglas e observações:

^W: inóculo da Waterborne;

^{C+}: inóculo do controle positivo do *kit* Merifluor®;

^U: inóculo da UNICAMP;

^{Ac}: inóculo AccuSpike^{TM};

^{Dyn}: novo *Dynabeads*

FM: Fator de multiplicação;

S: Sobrenadante ao resíduo sedimentado;

RS: Resíduo sedimentado;
ALF: Água de lavagem dos filtros;
TLP: Tubo de lado plano do IMS;
RS + Tw: Resíduos sedimentados com *Tween* 80 e inóculo diretamente no resíduo;
RS + Ex-TLP: Resíduo sedimentado com *Extran* e inóculo diretamente no TLP;
RS + Tw-TLP: Resíduo sedimentado com *Tween* 80 e inóculo diretamente no TLP;
FCCa: Floculação em carbonato de cálcio;
RS + ICN 7X: Resíduo sedimentado com detergente ICN7X;
RS + ICN 7X-TLP: Resíduo sedimentado com detergente ICN7X e inóculo diretamente no TLP;
ALF + FCCa: Água de lavagem dos filtros com floculação em carbonato de cálcio.

Métodos:

- 1 a 4: Filtração em membranas de Franco, Rocha-Eberhardt e Cantusio Neto (2001), com adaptações;
  - 5: Inóculos da Waterborne direto na amostra e uso de *Tween* 80 para desagregação dos protozoários;
  - 6: Adaptação do método de Boni de Oliveira (2012) com inóculos da Waterborne Direto nos TLPs e Uso de *Tween* 80 e *Extran*;
  - 7: Adaptação do método de Boni de Oliveira (2012) com inóculos da Waterborne e do controle positivo do *kit* Merifluor® diretamente nos TLPs com uso de *Extran*;
  - 8: Filtração em membranas com adaptações do método de Boni de Oliveira (2012) utilizando *Extran* (sem homogeneização em mixer rotatório) e inóculos da Waterborne e da UNICAMP;
  - 9: Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos da Waterborne e da UNICAMP no Jarro de Jarteste e Uso de *Extran*;
  - 10: Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos da Waterborne e da UNICAMP no Jarro do Jarteste e Uso de ICN 7X;
  - 11: Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos da Waterborne e da UNICAMP no TLP e Uso de *Extran*;
  - 12: Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos da Waterborne e da UNICAMP no TLP e Uso de ICN 7X;
  - 13 a 17: Floculação em carbonato de cálcio (FCCa), com adaptações de Vesey *et al.*, (1993) e Feng *et al.*, (2011);
  - 18: Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos da Waterborne e da UNICAMP no Jarro de Jarteste, Uso de ICN 7X e Incluindo a Concentração de Amostra;
  - 19: Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) Utilizando ICN 7X com Homogeneização por 1 Hora e Inóculos da Waterborne e da UNICAMP no Jarro de Jarteste e Posterior Concentração de Amostra;
  - 20: Adaptação do Método de Keegan et al. (2008) com Inóculos da Waterborne e da UNICAMP no Jarro de Jarteste.
-

Para a amostra de ALF, poucos (oo)cistos foram recuperados, como pode ser observado na Tabela 5.16. O valor mais expressivo foi obtido no método 2, onde foram visualizados 22 oocistos de *C. parvum* e 1 cisto de *Giardia*, entretanto, neste método foram inoculados, em média, 6000 (oo)cistos, maior valor inoculado na pesquisa. Freitas *et al*, (2010) igualmente relataram dificuldades de detecção dos (oo)cistos em amostras de ALF, porém, comprovaram que a amostra apresenta potencial risco microbiológico, assim como constatado na presente pesquisa.

A escolha, portanto, dos melhores métodos de detecção, está atrelada às porcentagens de recuperações obtidas na amostra de resíduos sedimentados. As melhores recuperações foram destacas em negrito na Tabela 5.16.

A contagem dos (oo)cistos em todos os métodos testados permitiu comparar a quantidade de (oo)cistos recuperados de acordo com a dissociação ácida, na Tabela 5.17.

Tabela 5.17 - Comparação entre as dissociações ácidas em relação à contagem de (oo)cistos na amostra de resíduo sedimentado

Dissociação ácida/ Métodos	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
	Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.		Cistos de <i>Giardia</i> spp.	
1	6	8	7	0
2	28	9	26	12
3	20	12	1	47
4	0	4	9	8
5	46	5	45	21
6	1560	374	3	20
	1523	188	3	14
7	1210	979	5	23
	1635	236	76	259
8	0	2	8	10
9	6	0	2	0
10	9	1	5	4
11	655	150	103	254
12	884	121	224	265
13	195	49	17	118
13 – Rep. 1	25	19	14	51
13 – Rep. 2	2	0	26	62
13 – Rep. 3	1	0	4	2

	133	76	34	28
14	23	122	11	30
	128	41	13	26
	125	16	99	109
15	213	11	108	90
	140	12	124	95
16	0	0	1	4
	0	1	1	8
17	2	2	2	4
	3	0	1	3
18	0	0	30	0
19	0	0	40	37
	76	60	1	12
19 (triplicata)	106	11	34	13
	37	15	6	5
	116	32	17	44
20	43	8	24	20
	73	9	33	23
Total de análises	36			
Vezes em que a dissociação ácida foi superior	28	5	16	20
Vezes em que a dissociação ácida foi superior (%)	78	14	44	56

Legenda: - Quantidade maior de oocistos de *Cryptosporidium* spp. contabilizados.

- Quantidade maior de cistos de *Giardia* spp. contabilizados;

Na Tabela 5.17, um maior número de oocistos de *Cryptosporidium* spp. é observado na primeira dissociação ácida (78%) quando comprado à segunda (14%). No caso de cistos de *Giardia* spp. a maioria dos cistos pode ser observada na segunda dissociação (56%), com uma diferença menos expressiva. Resultados similares foram obtidos por Maciel (2014), que relatou que a segunda dissociação ácida é imprescindível para obter maiores recuperações de (oo)cistos. Deste modo, talvez uma terceira dissociação ácida, poderia aumentar a porcentagem de recuperação de (oo)cistos, assim, recomenda-se que esse fato seja investigado em futuras pesquisas.

5.7.1. Interferentes dos Métodos de Detecção de Protozoários

Durante os ensaios de Jarteste envolvendo protozoários, constatou-se que uma série de fatores pode influenciar positiva ou negativamente o protocolo que está sendo testado. Dentre os fatores observados podem-se destacar: i) o inóculo, incluindo as características dos (oo)cistos na cepa, o volume e o ponto de aplicação; ii) a seleção das amostras de resíduos (volume da amostra e forma de coleta); iii) a purificação da amostra por IMS (fator de multiplicação); e iv) o cálculo da porcentagem de recuperação. Os tópicos abaixo abordam esses interferentes.

5.7.1.1. Contagem do Inóculo

A contagem do inóculo depende do tipo de cepa utilizada no método. As cepas de suspensão comercial da Waterborne contendo elevado número de (oo)cistos, do controle positivo do *kit* Merifluor® e a purificada pelo laboratório da UNICAMP foram avaliadas as condições de inóculo durante a pesquisa. Já a cepa AccuSpike™ também da Waterborne, por possuir um número conhecido de protozoários, não foi avaliada devido a quantidade de 100 (oo)cistos ser delimitada pela empresa americana.

A primeira dificuldade encontrada foi a formação de aglomerados de (oo)cistos. Neste aspecto, a cepa da Waterborne contendo cistos de *Giardia lamblia* (utilizada no início da pesquisa) juntamente com a cepa da mesma empresa contendo oocistos de *Cryptosporidium parvum* (utilizada em toda a pesquisa) - ambas conservadas em PBS com penicilina, estreptomicina, gentamicina e 0,01% de *Tween* 20 - apresentaram tal problema. No primeiro caso, os aglomerados de cistos observados na Figura 5.11 dificultaram a contagem – fenômeno que pode gerar subestimação ou superestimação de inóculo. A formação do aglomerado pode ser uma estratégia de sobrevivência dos cistos viáveis (ou vivos).

Figura 5.11 - Aglomerados de cistos de *Giardia lamblia* da cepa da Waterborne (>400x).

A cepa da Waterborne contendo oocistos de *C. parvum*, conservados em formalina 5% com PBS e 0,01% de *Tween* 20, não teve tal problema. A Figura 5.12 é um exemplo do que habitualmente ocorria durante a contagem desses oocistos. Destaca-se que nesta condição os oocistos estão inativados (ou mortos) não gerando as condições necessárias para a formação de aglomerados.

Figura 5.12 - Sete oocistos de *C. parvum* da cepa da Waterborne (200x).

O controle positivo do *kit* Merifluor® também foi utilizado como inóculo na realização dos métodos, principalmente devido às baixas recuperações obtidas com o uso das cepas da Waterborne no início da pesquisa. Poucos aglomerados foram observados e não prejudicaram a contagem (Figura 5.13). Porém, seu uso não é recomendado já que em um pequeno volume (5 µL) existem muitos oocistos (>1000) o que dificulta a contagem do patógeno caso seja preciso contabilizar um volume maior de inóculo. Além disso, a quantidade de cistos (<100) é praticamente 10 vezes inferior à quantidade de oocistos. Esta diferença é um problema, em vista de que cistos e oocistos estão armazenados em um mesmo recipiente. As Figura 5.13 e Figura 5.14 evidenciam tais problemas. Segundo a bula do *kit* Merifluor®, o controle positivo é uma amostra formalinizada com (oo)cistos contendo 0,09% de timerosal. Neste contexto, os (oo)cistos estão inviáveis (ou mortos), talvez isto impeça a formação dos indesejados aglomerados.

Figura 5.13 - Aglomerado de (oo)cistos observado no controle positivo do *kit* Merifluor® (>400x).

Figura 5.14 - Diferença de concentração de (oo)cistos do controle positivo do *kit* Merifluor® (400x).

A cepa purificada pela UNICAMP contendo cistos de *Giardia* spp. substituiu a cepa da Waterborne contendo cistos de *Giardia lamblia*. A não existência de aglomerados foi o principal motivo da troca (Figura 5.15).

Figura 5.15 - Contagem de cistos de *Giardia* spp. (<200x)

Ao final da pesquisa as recuperações de *Cryptosporidium parvum* diminuíram drasticamente, mesmo utilizando a técnica de Floculação em Carbonato de Cálcio (FCCa), em que apresentou elevadas recuperações para ambos os patógenos. Desta forma, procurou-se substituir a cepa da Waterborne por uma nova cepa de mesmas características, entretanto, a presença de aglomerados inviabilizou seu uso (Figura 5.16).

Legenda: A – Maior aglomerado de oocistos encontrado; B – Aglomerado de oocistos comumente observado.

Figura 5.16 - Aglomerados de oocistos de *Cryptosporidium parvum* na nova cepa da Waterborne (>400x).

Em suma, de uma forma ou outra, as cepas citadas foram testadas na pesquisa. Neste contexto, a contagem da quantidade de (oo)cistos presente nas três alíquotas das cepas, contendo ou não aglomerados, era realizada de forma a determinar a média de (oo)cistos a ser inoculada. A contagem em triplicata representava grande variabilidade

como pode ser observado na Tabela 5.18. A variação da contagem comprova que apesar da rigorosa homogeneização das cepas, não seria possível coletar alíquotas com concentrações ou quantidades iguais de (oo)cistos. Assim, existe sempre um erro na determinação da quantidade exata de (oo)cistos inoculados.

Tabela 5.18 - Determinação de inóculo conforme contagem dos (oo)cistos em 5 µL das cepas

Método	Alíquota das cepas (µL)		Contagem (oo)cistos		Média (oo)cistos ± Desvio padrão		Volume de inóculo (µL)		Provável quantidade de (oo)cistos inoculados		Quantidade de (oo)cistos recuperados ¹	
	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G
2	5 ^W	5 ^W	132	155	59 ± 54	174 ± 27	85	30	6018*	6276*	37	38
			4	155								
			41	213								
3	5 ^W	5 ^W	89	312	109 ± 38	174 ± 98	50	30	1093	1042	32	48
			77	109								
			162	100								
4	5 ^{C+}		1586	231	1785 ± 144	218 ± 19	10		3569	437	4	17
			1925	192								
			1843	232								
7	5 ^{C+}		1882	222	1866 ± 184	211 ± 14	5		1866	211	2189	28
			2083	220								
			1632	192								
	5 ^W	5 ^U	135	472	111 ± 18	470 ± 48	45	10	999	939	1871	335
			106	410								
			92	527								

Síglas e observações: C: *Cryptosporidium* spp.; G: *Giardia* spp.; ^W: inóculo da Waterborne; ^{C+}: inóculo do controle positivo do kit Merifluor®; ^U: inóculo purificado na UNICAMP; ¹: apenas para a amostra de resíduos sedimentados; e *: total de (oo)cistos inoculados nos 6 jarros do Jarteste.

A média de (oo)cistos, em muitas vezes, variou significativamente dos valores observados nas alíquotas. No Método 2, por exemplo, foram contabilizados 4, 41 e 132 oocistos de *Cryptosporidium parvum* nas três alíquotas de 5 µL, sendo a média de 59 oocistos. Portanto, a quantidade de protozoários a ser inoculada, poderia variar significativamente.

Analisando o Método 7, em que foi determinada uma média de 1866 oocistos de *Cryptosporidium* em 5 µL do controle positivo do *kit* Merifluor® e, este mesmo volume (5µL) foi utilizado como inóculo, foram recuperados 2189 oocistos. Este resultado demonstra que a quantidade de protozoários inoculada poderia ser maior ou menor ao valor estimado. Por esse motivo, a recuperação de oocistos do Método 7, foi de 117,33%, valor impraticável porque o Método não possuía fator de multiplicação.

Com o objetivo de diminuir a variabilidade no procedimento, foi estabelecido que o volume de inóculo seria igual ao volume da alíquota utilizada na contagem. Na Tabela 5.19, pode ser observado que a alíquota, antes fixa em 5 µL, passou a ser de 20 µL. O aumento na alíquota diminuiu a variabilidade na contagem do inóculo. Apesar da mudança, em alguns casos a quantidade de oocistos de *Cryptosporidium parvum* recuperados continuou sendo maior que a inoculada, como observado nos Métodos 11 e 12.

Tabela 5.19 - Volume de inóculo conforme volume utilizado na contagem dos (oo)cistos das cepas

Método	Alíquota das cepas e volume de inóculo (µL)		Contagem (oo)cistos na alíquota		Média de (oo)cistos ± Desvio padrão		Quantidade de (oo)cistos recuperados ¹	
	<i>C</i>	<i>G</i>	<i>C</i>	<i>G</i>	<i>C</i>	<i>G</i>	<i>C</i>	<i>G</i>
8	20 ^W	20 ^U	809	2699	874 ± 50	2734 ± 77	18	2
			930	2841				
			884	2663				
9	20 ^W	20 ^U	798	1406	802 ± 54	1301 ± 88	6	2
10							10	9
11			738	1191			805	357
12							1005	489
13			871	1305			244	135

Siglas e observações: *C*: *Cryptosporidium* spp.; *G*: *Giardia* spp.; ^W: inóculo da Waterborne; ^U: inóculo da UNICAMP; ¹: apenas para a amostra de resíduos sedimentados.

Outro resultado interessante pode ser constatado quando se compara a Tabela 5.18 com a Tabela 5.19. No Método 7, descrito na Tabela 5.18, por exemplo, foi calculado uma média de 111 oocistos em apenas 5 µL e, com o intuito de elevar a quantidade de protozoários inoculados, foi utilizado um volume de 45 µL de inóculo, o que representaria, segundo os cálculos, 999 oocistos. Contudo, 1871 organismos foram

recuperados, fazendo com que as recuperações superassem o limite de 100%. Já no Método 8, na Tabela 5.19, foram contabilizados uma média de 874 oocistos na alíquota de 20 μ L, valor próximo ao estipulado para 45 μ L. Desta forma, verifica-se que não há uma proporcionalidade na concentração de (oo)cistos, assim, o cálculo que determina o volume de inóculo em função da quantidade de (oo)cistos contabilizados na alíquota precisa ser revisto.

Neste contexto, o uso de AccuSpike™ ou EasySeed® ou ColorSeed® podem ser uma ótima alternativa, entretanto, o custo e a validade dos produtos precisam ser avaliados criteriosamente. No Brasil, o custo médio dessas suspensões é de US\$ 1.500,00 ou R\$ 4.500,00 (cotação de junho de 2015), suficientes para somente 10 a 12 ensaios. Além disso, por ser um produto importado, os tramites podem chegar a 60 dias, assim, essas suspensões chegam ao laboratório faltando menos de 20 dias para atingirem o prazo de validade. Destaca-se que a validade dessas suspensões é de apenas 3 meses e após esse período, o IMS não pode ser utilizado, pois a recuperação pode cair subitamente.

O cálculo descrito foi adotado nos sete primeiros Métodos, portanto, acredita-se que tenha sido inoculado um maior número de protozoários, o que reduziria ainda mais as porcentagens de recuperações obtidas.

A consequência de se elevar o volume da alíquota na análise do inóculo repercutiu em menores variações da contagem em triplicata, fazendo com que a média de (oo)cistos inoculados fosse mais próxima da realidade. Em contrapartida, a mudança demandou mais tempo e esforço humano para realização da contagem de elevadas quantidades de (oo)cistos, o que poderia também implicar em erros de leitura. Além disso, foram observados protozoários ao redor do poço da lâmina que também faziam parte da alíquota removida da cepa, portanto, foram contabilizados.

Figura 5.17 – Aspectos do campo de microscópio e dificuldades da contagem do inóculo (100x).

5.7.1.2. Ponto de Aplicação do Inóculo

Devido às baixas recuperações dos primeiros quatro Métodos, optou-se por testar o inóculo em amostras que representassem menores perdas, diferentemente da água de estudo no jarro de Jarteste. Assim, no Método 5, os protozoários foram inoculados diretamente na amostra de resíduo sedimentado. Apesar da alteração, não foram obtidas recuperações elevadas. O inóculo também foi avaliado quando feito diretamente no tubo de lado plano (TLP) nos Métodos 6, 7, 11 e 12. Para este caso, as porcentagens de recuperações foram superiores a 100% para oocistos de *Cryptosporidium parvum* nos quatro Métodos e ficou acima do estipulado pelo Método 1623.1 para cistos de *Giardia* spp., com exceção do Método 6. Essas recuperações de oocistos superiores a 100% comprovaram que a quantidade de protozoários inoculados era maior do que a média estimada para o inóculo, principalmente por não haver fator de multiplicação (FM) nos métodos em que o inóculo foi realizado no TLP. Desta

forma, o ponto onde é realizado o inóculo também é um interferente a ser considerado nos protocolos avaliados.

A realização do inóculo diretamente nas amostras de resíduo sedimentado e no TLP diminui a probabilidade de perdas de protozoários durante a realização dos Métodos. Apesar da vantagem operacional para detecção dos (oo)cistos, tal procedimento não condiz com a realidade, já que os patógenos não participam dos processos de coagulação e floculação e, podem não ser aderidos aos flocos, o que pode facilitar sua remoção na etapa de purificação da amostra via IMS. Assim, foi estabelecido que o inóculo deveria ser sempre realizado na amostra de água de estudo, no início do ensaio de Jarteste.

5.7.1.3. Volume de *Pellet*

O elevado volume de *pellet* formado após a etapa de centrifugação é outro interferente dos métodos de detecção. O Método 1623.1 recomenda que seja purificado um volume máximo de *pellet* de 0,5 mL. Para a amostra de ALF não foram registrados volumes superiores à este limite, sendo assim, a amostra era analisada integralmente. Já para a amostra de resíduo sedimentado, o volume de *pellet* sempre superava o volume de 0,5 mL, desta forma, era analisada somente uma parcela da amostra gerada no tratamento devido, principalmente, a otimização do processo laboratorial em vista das dificuldades operacionais e do próprio preço dos produtos. Portanto, um fator de multiplicação (FM) era incluído ao cálculo da porcentagem de recuperação de (oo)cistos para a amostra de resíduo sedimentado.

Nos dois primeiros Métodos foram utilizados 6 jarros do jarteste (12 L de água de estudo) resultando em grande quantidade de resíduos sedimentados e elevado volume de *pellet*. Como o volume de amostra descartada era grande, consequentemente, foi preciso incrementar os valores de FM, como 12 e 15, para os Métodos 1 e 2, respectivamente. Estes elevados fatores de multiplicação representaram uma incerteza na recuperação dos métodos, já que o descarte de amostra contendo protozoários era grande. Portanto, o elevado FM pode ser considerado um interferente que deve ser evitado.

Nos métodos seguintes foi utilizado um único jarro do Jarteste nos ensaio de tratabilidade, assim, a geração de resíduos e os FM diminuíram, exceto para os Métodos 8, 9 e 10, em que foi preciso descartar uma elevada parcela de amostra devido à falta da centrífuga (encaminhada para reparos e manutenção). Portanto, os fatores de multiplicação para estes três métodos foram elevados, sendo de 24, 23,4 e 23,2, respectivamente.

5.7.1.4. Validade dos Kits *Dynabeads* e das Cepas

A validade do kit Merifluor®, dos kits *Dynabeads*® *Invitrogen*, das cepas da Waterborne (incluindo a cepa AccuSpike™) devem ser levadas em consideração no momento do planejamento da pesquisa. Estes produtos podem demorar de 2 a 3 meses para chegar aos laboratórios latino-americanos e a validade deles é de curto ou médio prazo.

Apesar dos produtos terem sido comprados com planejamento, alguns imprevistos durante a pesquisa, como, por exemplo, a impossibilidade de uso da centrífuga, ocasionou demora no uso da cepa AccuSpike™ e do kit *Dynabeads*® *Invitrogen*, podendo ter influenciado negativamente na recuperação de alguns métodos. O inóculo AccuSpike™ foi utilizado com 35 e 40 dias após a data de vencimento nos Métodos 16 e 17, respectivamente. Assim, acredita-se que as baixas recuperações obtidas, principalmente para oocistos de *Cryptosporidium parvum*, ocorreram em vista da validade da cepa. Este fato foi preocupante, pois era esperado um resultado positivo no controle da qualidade analítica do protocolo, pois haviam sido obtidas recuperações acima dos limites determinados pelo Método 1623.1 da USEPA em métodos anteriores, que também utilizaram a técnica de FCCa.

A idade dos oocistos de *Cryptosporidium parvum* na cepa da Waterborne também pode ter prejudicado as recuperações no final da pesquisa. A técnica de FCCa foi aplicada três vezes conforme o Método 13, entretanto, as recuperações foram baixas para o patógeno, mas relativamente altas para cistos de *Giardia* spp. Apesar da diminuição da quantidade de oocistos recuperados, não se pôde concluir se o problema decorreu da idade dos oocistos ou do produto comercial *Dynabeads*® *Invitrogen*, pois o

produto anti-Crypto estava no mês de vencimento, porém ainda não vencido, enquanto que o reagente anti-Giardia ainda poderia ser utilizado por três meses dentro do prazo de validade.

O *kit Dynabeads (Life Technologies)* também pode ter influenciado nas recuperações de (oo)cistos na terceira repetição do Método 13. As recuperações para oocistos de *C. parvum* continuaram baixas e para *Giardia* spp. foi reduzida, sendo de 0,45% e 2,74%, respectivamente. Assim, não foi possível estabelecer se o *kit* citado ou as cepas causaram tal resultado.

Para a cepa de *Giardia* spp., purificada pela UNICAMP, não foi verificada alteração significativa de recuperação durante a pesquisa, portanto, acredita-se que sua idade (6 meses) foi considerada um interferente nos métodos avaliados.

5.7.1.5. Sujidades no Poço, Tempo de Visualização e Outras Interferências na Leitura em Microscópio.

A leitura do poço também era afetada por alguns interferentes. Quando se suspeitava da presença do (oo)cisto era preciso realizar a confirmação do patógeno em aproximadamente 1 minuto. Caso o tempo fosse maior, algumas dificuldades ocorriam, tais como: i) gradual perda da tonalidade maçã-verde brilhante dos (oo)cistos; ii) gradual surgimento de mancha verde no fundo do poço; e iii) perda da coloração azul-brilhante dos (oo)cistos na leitura em DAPI. Estes efeitos prejudicavam a contagem dos protozoários, principalmente de oocistos de *C. parvum*, como pode ser observado na Figura 5.18.

Figura 5.18 - Dificuldades da contagem em decorrência da demora da confirmação dos (oo)cistos.

A diferença de tamanho dos (oo)cistos também poderia influenciar na contagem. Cistos de *Giardia* spp. são facilmente observados no aumento de 200x, entretanto, somente com o aumento de 400x é factível confirmar a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Na Figura 5.19, verifica-se que é possível realizar a contagem de oocistos com segurança, unicamente, no aumento de 400x. Neste contexto, a visualização em um aumento maior facilita a confirmação dos protozoários, principalmente para oocistos.

Figura 5.19 - Comparação entre a visualização de (oo)cistos em 200x e 400x.

Na Figura 5.19 também pode ser verificada a influência da demora na leitura do poço. A mancha esverdeada na Figura 5.19-B evidencia que esta imagem foi capturada logo após a imagem da Figura 5.19-A. Essa demora na leitura pouco afeta a contagem dos cistos de *Giardia* spp., mas influencia na contagem de oocistos de *C. parvum*. Assim, nesta pesquisa, padronizou-se a contagem primeiramente de oocistos e posteriormente de cistos, ambos em aumento de 400x.

A elevada quantidade de microesferas *Dynabeads*® Anti-*Giardia* e Anti-*Cryptosporidium* igualmente poderia representar um problema na recuperação de (oo)cistos (Figura 5.20), pois sua quantidade pode indicar problemas na dissociação ácida, mesmo com todo o rigor laboratorial envolvido durante a pesquisa.

Figura 5.20 - Elevada quantidade de microesferas *Dynabeads*® Anti-*Giardia* e Anti-*Cryptosporidium* (400x).

Os pequenos aglomerados de cistos de *Giardia lamblia* da cepa da Waterborne, observados na Figura 5.21, pouco interferiu na contagem. Entretanto, estes aglomerados demonstram a capacidade dos cistos em se manterem aglomerados mesmo depois de serem submetidos ao tratamento da água de estudo, das particularidades de cada método e da etapa de purificação da amostra.

Os pequenos aglomerados de cistos de *Giardia lamblia* da cepa da Waterborne, observados na Figura 5.21, pouco interferiu na contagem. Entretanto, esses aglomerados poderiam resistir mesmo depois de serem submetidos aos ensaios de tratabilidade em Jarteste com posterior aplicação dos métodos estudados. Esses protocolos envolviam mudanças drásticas de pH e, em alguns casos, filtração em membranas. O fato permite constatar a força de ligação existente entre os cistos, a qual deveria ser estudada como estratégia de tratamento.

Figura 5.21 - Aglomerado recuperado no método 3 (>400x).

As sujidades nos poços também interferiam na contagem dos (oo)cistos, como pode ser observado na Figura 5.22.

Legenda: A - Amostra de sobrenadante ao resíduo sedimentado (Método 1); B - Amostra de ALF e aplicação do método de FCCa (Método 15); C - Amostra de resíduo sedimentado com inóculo TLP e uso do detergente ICN 7X (Método 12); D - Amostra de resíduo sedimentado com inóculo na água de estudo e aplicação do método da FCCa (Método 13); E - Amostra de resíduo sedimentado com inóculo na água de estudo e aplicação do método da FCCa (Método 15); F - Amostra de resíduo sedimentado com inóculo na água de estudo e aplicação do método adaptado de Boni de Oliveira (2012) (Método 19); G - Amostra de resíduo sedimentado com inóculo na água de estudo (Método 20).

Figura 5.22 - Sujidades nas amostras de sobrenadante ao resíduo sedimentado, ALF e resíduo sedimentado em diferentes métodos (400x).

A comparação visual das imagens na Figura 5.22 demonstra a dificuldade da contagem em decorrência da sujidade nos diferentes Métodos. A Figura 5.22-E

demonstra que o Método 15 foi o que apresentou maiores dificuldades da leitura do poço. Em contrapartida, a Figura 5.22-F em que foi avaliado o método descrito em Boni de Oliveira (2012), com as devidas adaptações, observa-se um poço tão limpo quanto a visualização do poço no momento de se determinar o inóculo (cepa pura).

As sujidades provocavam dúvidas na confirmação dos (oo)cistos, principalmente em microscopia de fluorescência DAPI e em microscopia DIC (Figura 5.23).

Figura 5.23 - Dificuldade na confirmação de cisto de *Giardia* spp. e oocisto de *Cryptosporidium parvum* no Método 13 (400x).

Portanto, um poço límpido é extremamente importante na confirmação dos (oo)cistos, assim como pode ser observado na Figura 5.24.

Legenda: A - cisto de *Giardia* spp. em microscopia de fluorescência FITC; B - cisto de *Giardia* spp. em microscopia de fluorescência DAPI; C - cisto de *Giardia* spp. em microscopia DIC; D - oocisto *Cryptosporidium parvum* em microscopia de fluorescência FITC; E - oocisto *C. parvum* em microscopia de fluorescência DAPI; F - oocisto *C. parvum* em microscopia de DIC.

Figura 5.24 - Confirmação de cisto de *Giardia* spp. no Método 20 e oocisto de *Cryptosporidium parvum* no Método 6 em microscopia de fluorescência DAPI e microscopia DIC (400x).

5.7.2. Avaliação dos Métodos em Função da Recuperação de (Oo)cistos

Ao longo da pesquisa, adaptações foram realizadas para ajustar os Métodos testados, visando aumentar a recuperação conforme estabelece o Método 1623.1 da USEPA, em que devem ser recuperados ao menos 32 e 8% de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp., respectivamente. Após determinação de um Método eficiente, o inóculo AccuSpike^{TM} foi avaliado conforme estabelece o controle de qualidade do Método 1623.1. Entretanto, foi preciso utilizar os inóculos (cepa de com elevada concentração de oocistos de *C. parvum* da Waterborne e cepa com elevada concentração de cistos de *Giardia* spp. da UNICAMP) para avaliação de tal controle. Na sequência, estão descritos os resultados obtidos na aplicação de cada Método testado.

5.7.2.1. Método 1 – Filtração em Membranas Utilizando NaHMP como Eluidor e Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) nos 6 Jarros do Jarteste

Na sequência, podem ser observados os resultados da contagem do inóculo (Tabela 5.20) e da recuperação obtida no Método (Tabela 5.21).

Tabela 5.20 - Contagem do inóculo de (oo)cistos no Método 1

Cepas	Poço da lâmina	Alíquota (µL)	Contagem de (oo)cistos	Média de (oo)cistos ± Desv. padrão OU ± Coef. de Variação(%)	Volume de inóculo no jarro do Jarteste (µL)	Inóculo no jarro do Jarteste [(oo)cistos.L ⁻¹]	Total de (oo)cistos*
<i>C^W</i>	1	5	42	54 ± 12 ou ±22	20	109	1304
	2		50				
	3		71				
<i>G^W</i>	1	5	239	235 ± 21 ou ±9	5	118	1412
	2		208				
	3		259				

Legenda:

C^W - Cepa da Waterborne contendo oocistos de *Cryptosporidium parvum*

G^W - Cepa da Waterborne contendo cistos de *Giardia lamblia*

* - Total de (oo)cistos nos 6 jarros do Jarteste

Tabela 5.21 - Recuperação de (oo)cistos do Método 1

	Resíduo sedimentado				ALF				Sobrenadante ao resíduo			
Fator de multiplicação	12				1				1			
Protozoários	<i>C. parvum</i>		<i>G. lamblia</i>		<i>C. parvum</i>		<i>G. lamblia</i>		<i>C. parvum</i>		<i>G. lamblia</i>	
Inóculo no jarro	1304		1412		1304		1412		1304		1412	
Dissociação ácida	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Contagem por poço	6	8	7	0	2	0	0	0	18	18	0	0
Contagem total	14		7		2		0		36		0	
Recuperação (%)	12,88		5,95		-		-		-		-	

Legenda:

- : não calculado

Segundo a Tabela 5.20, não houve significativa variação na contagem para ambos os protozoários, entretanto, verificou-se que a cepa de *C. parvum* possuía menor concentração de oocistos em relação à cepa de *G. lamblia*. Desta forma, o volume de inóculo de oocistos foi maior, porém com quantidade de protozoários próxima (Tabela 5.21).

Para amostra de resíduo sedimentado foi observada uma quantidade menor de protozoários, 14 oocistos e 7 cistos, com recuperações de 12,88% e 5,95%, respectivamente. Essas porcentagens foram calculadas pelo uso do FM, ou seja, cada (oo)cistos contabilizado representaria 12 (oo)cistos na porcentagem de recuperação do presente Método. Apesar do elevado FM, as porcentagens de recuperação não atenderam ao padrão estabelecido pelo Método 1623.1.

Acredita-se que a reduzida recuperação de (oo)cistos decorreu da baixa quantidade de protozoários inoculados (apenas 118 cistos.L⁻¹ e 109 oocistos.L⁻¹).

A filtração em membranas indicou uma quantidade maior de oocistos (36) na amostra de sobrenadante aos resíduos, entretanto, não foram observados cistos. Este resultado pode ter ocorrido devido à perturbação do resíduo sedimentado no meio durante o reagrupamento das amostras. Já para a amostra de ALF, não foram observados protozoários.

Apesar do hexametáfostato de sódio (NaHMP) favorecer a dispersão de argila e exercer efeito dispersivo diminuindo a condutividade da amostra (Levy *et al*, 1991), tal produto não resultou em boas recuperações.

Neste método, pode-se concluir que a filtração em membranas de ésteres mistos, desenvolvida por Franco, Rocha-Eberhardt e Cantusio Neto (2001), para a amostra de ALF talvez não seja indicada, porém para a amostra de sobrenadante aos resíduos pôde ser viável para detectar oocistos de *C. parvum*. Verificou-se, igualmente, que o elevado volume de resíduo sedimentado implicou em um grande volume de *pellet* e, conseqüentemente, em elevado descarte de amostra pela impossibilidade de processamento (elevado custo e considerável tempo laboratorial). Portanto, estima-se que o Método 1 não seja indicado para recuperação de (oo)cistos na matriz testada.

5.7.2.2. Método 2 – Filtração em Membranas Utilizando NaHMP como Eluidor, Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) nos 6 Jarros do Jarteste e Maior Volume de ALF Gerado

Na sequência, podem ser observados os resultados da contagem do inóculo (Tabela 5.22) e da recuperação obtida no Método (Tabela 5.23).

Tabela 5.22 - Contagem do inóculo de (oo)cistos no Método 2

Cepas	Poço da lâmina	Alíquota (μL)	Contagem de (oo)cistos	Média de (oo)cistos ± Desv. padrão OU ± Coef. de Variação(%)	Volume de inóculo no jarro do Jarteste (μL)	Inóculo no jarro do Jarteste [(oo)cistos.L ⁻¹]	Total de (oo)cistos*
<i>C^W</i>	1	5	132	59 ± 54 ou ±92	85	502	6018
	2		4				
	3		41				
<i>G^W</i>	1	5	155	174 ± 27 ou ±16	30	523	6276
	2		155				
	3		213				

Legenda:

C^W - Cepa da Waterborne contendo oocistos de *Cryptosporidium parvum*

G^W - Cepa da Waterborne contendo cistos de *Giardia lamblia*

* - Total de (oo)cistos nos 6 jarros do Jarteste

Tabela 5.23 - Recuperação de (oo)cistos do Método 2

	Resíduo sedimentado				ALF			
Fator de multiplicação	15				1			
Protozoários	<i>C. parvum</i>		<i>G. lamblia</i>		<i>C. parvum</i>		<i>G. lamblia</i>	
Inóculo no jarro	6018		6276		6018		6276	
Dissociação ácida	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Contagem por poço	28	9	12	26	20	2	1	0
Contagem total	37		38		22		1	
Recuperação (%)	9,22		9,08		-		-	

Legenda:

- : não calculado

Conforme Tabela 5.22, houve uma grande variação na contagem de oocistos. Em média, foram contabilizados 59 oocistos, contudo, o desvio padrão e o coeficiente de variação em relação à média foram de 54 e 92%, respectivamente. Este resultado demonstra a variabilidade da quantidade de (oo)cistos em uma alíquota de mesmo volume. O volume de inóculo, a quantidade de (oo)cistos e a concentração de oocistos aumentaram em comparação com o Método 1 (Tabela 5.23).

Para a amostra de resíduo sedimentado a recuperação de cisto foi superior ao estipulado pelo Método 1623.1, porém não para oocisto. Vale ressaltar que o elevado volume de resíduo sedimentado gerado no ensaio provocou um elevado fator de multiplicação (FM =15).

O dobro de água foi utilizado na lavagem dos filtros neste Método. Apesar desse considerável aumento, a quantidade de (oo)cistos recuperados continuou baixa, com 22 oocistos e apenas 1 cisto. Destaque para o elevado número de oocistos observados na primeira dissociação ácida em comparação com a segunda demonstra a eficiência da recuperação de *C. parvum* na primeira dissociação. Segundo os resultados obtidos, o Método 2 não é indicado para as amostras testadas.

5.7.2.3. Método 3 – Filtração em Membranas com Adaptações da Metodologia de Medeiros (2013) Utilizando *Tween* 80 como Eluidor e Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) em um Único Jarro.

Na sequência, podem ser observados os resultados da contagem do inóculo (Tabela 5.24) e da recuperação obtida no Método (Tabela 5.25).

Tabela 5.24 - Contagem do inóculo de (oo)cistos no Método 3

Cepas	Poço da lâmina	Alíquota (μL)	Contagem de (oo)cistos	Média de (oo)cistos ± Desv. padrão OU ± Coef. de Variação(%)	Volume de inóculo no jarro do Jarteste (μL)	Inóculo no jarro do Jarteste [(oo)cistos.L ⁻¹]	Total de (oo)cistos
<i>C^W</i>	1	5	89	109 ± 38 ou ± 35	50	546	1093
	2		77				
	3		162				
<i>G^W</i>	1	5	312	174 ± 98 ou ± 56	30	524	1042
	2		109				
	3		100				

Legenda:

C^W - Cepa da Waterborne contendo oocistos de *Cryptosporidium parvum*

G^W - Cepa da Waterborne contendo cistos de *Giardia lamblia*

Tabela 5.25 - Recuperação de (oo)cistos do Método 3

	Resíduo sedimentado				ALF			
Fator de multiplicação	4				1			
Protozoários	<i>C. parvum</i>		<i>G. lamblia</i>		<i>C. parvum</i>		<i>G. lamblia</i>	
Inóculo no jarro	1093		1042		1093		1042	
Dissociação ácida	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Contagem por poço	20	12	1	47	0	0	0	0
Contagem total	32		48		0		0	
Recuperação (%)	11,71		18,43		-		-	

Legenda:

- : não calculado

A variabilidade da contagem em triplicata do inóculo persistiu neste Método para ambos os protozoários (Tabela 5.24). A concentração de protozoários foi mantida próxima de 500 (oo)cistos.L⁻¹ na água de estudo.

A redução de 6 jarros do Jarteste para apenas 1, implicou em vantagens tais como: i) redução do volume de inóculo retirado das cepas; ii) redução da quantidade de água de estudo; iii) utilização de um único filtro (FLA); iv) menor quantidade de resíduos gerados no tratamento; e v) diminuição do tempo para aplicação do método.

Outro ponto positivo do Método 3 foi a diminuição do fator de multiplicação. Desta forma, pôde-se analisar uma maior fração da amostra de resíduo sedimentado. As recuperações aumentaram para ambos os protozoários, entretanto, para *C. parvum* a

recuperação ainda estava longe da meta de 32%, conforme estabelecido pela USEPA. Destaca-se que foram detectados 48 cistos na segunda dissociação ácida e apenas 1 na primeira. Isto indica uma elevada eficiência de recuperação de *G. lamblia* na segunda dissociação ácida, como descrito anteriormente.

O uso de *Tween* 80 apesar de diminuir a carga superficial e neutralizar as cargas do meio, faz com que seja necessário um maior número de raspagens se comparado com o NaHMP, aumentando as chances de ocorrerem danos à membrana, sendo preferível o uso do hexametáfosfato de sódio. De qualquer forma, não foram detectados (oo)cistos na amostra de ALF.

No Método 3, apesar da mistura da amostra de resíduo sedimentado com o detergente *Tween* 80 ter proporcionado melhores recuperações em comparação com os outros métodos, os resultados obtidos ainda não estão de acordo com o padrão estabelecido pelo Método 1623.1.

5.7.2.4. Método 4 – Filtração em Membranas com Adaptações da Metodologia de Medeiros (2013) Utilizando NaHMP como Eluidor com Inóculos do Controle Positivo do *Kit* Merifluor®

Na sequência, podem ser observados os resultados da contagem do inóculo (Tabela 5.26) e da recuperação obtida no Método (Tabela 5.27).

Tabela 5.26 - Contagem do inóculo de (oo)cistos no Método 4

Cepas	Poço da lâmina	Alíquota (µL)	Contagem de (oo)cistos	Média de (oo)cistos ± Desv. padrão OU ± Coef. de Variação(%)	Volume de inóculo no jarro do Jarteste (µL)	Inóculo no jarro do Jarteste [(oo)cistos.L ⁻¹]	Total de (oo)cistos
C ^{C+}	1	5	1586	1785 ± 144 ou ±8	10	1785	3569
	2		1925				
	3		1843				
G ^{C+}	1	5	231	218 ± 19 ou ±9	10	218	437
	2		192				
	3		232				

Legenda:

C^{C+} - *Cryptosporidium* spp. do controle positivo do kit Merifluor®

G^{C+} - *Giardia* spp. do controle positivo do kit Merifluor®

Tabela 5.27 - Recuperação de (oo)cistos do Método 4

	Resíduo sedimentado				ALF			
Fator de multiplicação	3				1			
Protozoários	<i>Cryptosporidium</i> spp.		<i>Giardia</i> spp.		<i>Cryptosporidium</i> spp.		<i>Giardia</i> spp.	
Inóculo no jarro	3569		437		3569		437	
Dissociação ácida	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Contagem por poço	0	4	9	8	0	0	0	0
Contagem total	4		17		0		0	
Recuperação (%)	0,34		11,64		-		-	

Legenda:

- : não calculado

O controle positivo do *kit* Merifluor® possui praticamente 10 vezes mais oocistos do que cistos, não havendo possibilidade de elevar a quantidade de *Giardia* sem que se aumente o número de *Cryptosporidium*, desta forma, as concentrações dos protozoários na água de estudo foram muito distintas, quando comparados às praticadas nos Métodos 1 a 3 (Tabela 5.26). Assim, o inóculo utilizando o controle positivo do *kit* Merifluor® não é recomendado em vista desta diferença e da dificuldade de contagem dos oocistos presentes. Além disso, o controle positivo do *kit* Merifluor® são produtos formalinizados o que pode ter provocado alterações nas recuperações.

Para a amostra de resíduo sedimentado obteve-se menor valor do fator de multiplicação (FM = 3), ou seja, uma maior quantidade de amostra foi analisada. Porém,

a recuperação para *Giardia* spp. (11,64%) diminuiu se comparada com o Método 3 e pela primeira vez se aproximou de zero para *Cryptosporidium* spp., apesar da elevada concentração de oocistos.

A eluição foi novamente realizada com NaHMP por ter sido comprovado melhores recuperações (Método 3 versus Método 2) e também por não danificar a membrana no momento da raspagem, como foi observado com *Tween* 80 no Método 3. Apesar desta mudança, as recuperações de (oo)cistos para a amostra de ALF continuaram nulas optando-se, assim, por não realizar mais a análise de protozoários nessa amostra até o momento em que fossem obtidas elevadas recuperações na amostra de resíduo sedimentado.

5.7.2.5. Método 5 – Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) Direto na Amostra e Uso de *Tween* 80 para Desagregação dos Protozoários

Na sequência, podem ser observados os resultados da contagem do inóculo (Tabela 5.28) e da recuperação obtida no Método (Tabela 5.29).

Tabela 5.28 - Contagem do inóculo de (oo)cistos no Método 5

Cepas	Poço da lâmina	Alíquota (µL)	Contagem de (oo)cistos	Média de (oo)cistos ± Desv. padrão OU ± Coef. de Variação(%)	Volume de inóculo na amostra de resíduo sedimentado (µL)	Total de (oo)cistos
C^W	1	5	90	110 ± 14 ou ± 13	45	993
	2		120			
	3		121			
G^W	1	5	218	141 ± 54 ou ± 38	35	989
	2		108			
	3		98			

Legenda:

C^W - Cepa da Waterborne contendo oocistos de *Cryptosporidium parvum*

G^W - Cepa da Waterborne contendo cistos de *Giardia lamblia*

Tabela 5.29 - Recuperação de (oo)cistos do Método 5

	Resíduo sedimentado			
Fator de multiplicação	1			
Protozoários	<i>C. parvum</i>		<i>G. lamblia</i>	
Inóculo na amostra de resíduo sedimentado	993		989	
Dissociação ácida	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Contagem por poço	46	5	45	21
Contagem total	51		66	
Recuperação (%)	5,14		6,67	

No Método 5, a variabilidade da contagem do inóculo persistia. O inóculo foi realizado diretamente em 20 mL da amostra de resíduo sedimentado, fato que resultou em uma concentração de (oo)cistos por litro extremamente elevada (cerca de 50.000 (oo)cistos.L⁻¹), porém, foram inoculados aproximadamente 1000 (oo)cistos. O fator de multiplicação não interferiu na porcentagem de recuperação, já que a amostra contendo protozoários foi totalmente analisada. Mesmo assim, as recuperações continuaram baixas.

5.7.2.6. Método 6 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) Direto nos TLPs e Uso de Tween 80 e Extran

Na sequência, podem ser observados os resultados da contagem do inóculo (Tabela 5.30) e das recuperações obtidas no Método (Tabela 5.31).

Tabela 5.30 - Contagem do inóculo de (oo)cistos no Método 6

Cepas	Poço da lâmina	Alíquota (µL)	Contagem de (oo)cistos	Média de (oo)cistos ± Desv. padrão OU ± Coef. de Variação(%)	Volume de inóculo na amostra de resíduo sedimentado (µL)	Total de (oo)cistos
C^W	1	5	106	92 ± 20 ou ± 22	55	1016
	2		107			
	3		64			
G^W	1	5	410	209 ± 144 ou ± 69	25	1043
	2		85			
	3		131			

Legenda:

C^W - Cepa da Waterborne contendo oocistos de *Cryptosporidium parvum*

G^W - Cepa da Waterborne contendo cistos de *Giardia lamblia*

Tabela 5.31 - Recuperação de (oo)cistos do Método 6

	Resíduo sedimentado				Resíduo sedimentado			
Detergente	Tween 80				Extran			
Fator de multiplicação	1				1			
Protozoários	<i>C. parvum</i>		<i>G. lamblia</i>		<i>C. parvum</i>		<i>G. lamblia</i>	
Inóculo nas amostras de resíduo sedimentado	1016		1043		1016		1043	
Dissociação ácida	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Contagem por poço	1523	188	3	14	1560	374	3	20
Contagem total	1711		17		1934		23	
Recuperação (%)	168,46		1,63		190,42		2,20	

Ao analisar as Tabela 5.30 e Tabela 5.31, verifica-se que houve uma expressiva recuperação de oocistos, sendo contabilizados 1711 e 1934 oocistos de *C. parvum* quando utilizado *Tween 80* e *Extran*, respectivamente. Estes valores são superiores à quantidade que se esperava ter inoculado (1016). Diante deste fato, pode-se concluir que apesar de se determinar, aproximadamente, a quantidade média de (oo)cistos em um volume de 5 µL, não é possível estabelecer a quantidade de (oo)cistos em 55 µL através de uma simples regra de três.

Neste contexto, os cálculos das recuperações foram realizados com base em na quantidade de (oo)cistos inferior à que realmente havia sido inoculado, sendo este, o

principal motivo para obtenção de valores tão elevados: 168,46 e 190,42% em que foi utilizado *Tween* 80 e *Extran*, respectivamente.

A análise anterior não pôde ser realizada para cistos de *G. lamblia*, porque as recuperações foram baixas. Entretanto, uma conclusão interessante pode ser obtida quando se compara a quantidade de cistos contabilizados na dissociação ácida. Os resultados demonstram que foram observados mais cistos após ser realizada a segunda dissociação. Este fato indica que uma terceira dissociação ácida poderia resultar em uma maior recuperação, assim como foi descrito na Tabela 5.17.

Constatou-se que o *Extran* promoveu melhores recuperações do que o *Tween* 80. Entretanto, este método não pode ser considerado adequado, já que o inóculo não foi realizado na água de estudo e não simulava um tratamento real, onde (oo)cistos participam dos processos de coagulação e floculação.

5.7.2.7. Método 7 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos da Waterborne e do Controle Positivo do *Kit* Merifluor® Diretamente nos TLPs com Uso de *Extran*

A Tabela 5.32 apresenta os resultados da contagem do controle positivo do *kit* Merifluor® e das cepas da Waterborne e UNICAMP. A Tabela 5.33 mostra as recuperações do Método.

Tabela 5.32 - Contagem dos inóculos de (oo)cistos no Método 7

Cepas	Poço da lâmina	Alíquota (μL)	Contagem de (oo)cistos	Média de (oo)cistos ± Desv. padrão OU ± Coef. de Variação(%)	Volume de inóculo nos TLPs (μL)	Total de (oo)cistos
C^{C+}	1	5	1882	1866 ± 184 ou ± 10	5	1866
	2		2083			
	3		1632			
G^{C+}	1	5	222	211 ± 14 ou ± 7	5	211
	2		220			
	3		192			
C^W	1	5	135	111 ± 18 ou ± 16	45	999
	2		106			
	3		92			
G^U	1	5	472	470 ± 48 ou ± 10	10	939
	2		410			
	3		527			

Legenda: C^{C+} - *Cryptosporidium* spp. do controle positivo do kit Merifluor® G^{C+} - *Giardia* spp. do controle positivo do kit Merifluor® C^W - Cepa da Waterborne contendo oocistos de *Cryptosporidium parvum* G^U - Cepa da UNICAMP contendo cistos de *Giardia* spp.

Tabela 5.33 - Recuperação de (oo)cistos do Método 7

	Resíduo sedimentado				Resíduo sedimentado			
Fator de multiplicação	1				1			
Tipo de inóculo	Controle positivo do kit Merifluor®				Waterborne	UNICAMP		
Protozoários	<i>Cryptosporidium</i> spp.		<i>Giardia</i> spp.		<i>C. parvum</i>	<i>Giardia</i> spp.		
Inóculo nos TLPs	1866		211		999	939		
Dissociação ácida	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Contagem por poço	1210	979	5	23	1635	236	76	259
Contagem total	2189		28		1934		335	
Recuperação (%)	117,33		13,25		187,29		35,66	

A cepa da UNICAMP, em substituição da cepa da Waterborne contendo cistos de *Giardia lamblia*, foi vantajosa porque não foram observados aglomerados de cistos no momento da contagem, mesmo assim, a variabilidade do cálculo continuou presente Tabela 5.32.

Assim como no Método 6, pode-se observar que as recuperações para oocistos de *Cryptosporidium* spp. continuaram superiores a 100%, comprovando que estava

sendo inoculado um maior número de oocistos do que calculado na média. Porém, acredita-se que quanto maior o volume de inóculo maior pode ser esse erro. No inóculo de 45 µL da Waterborne foram recuperados 187,29% e no inóculo de 5 µL do controle positivo do *kit* Merifluor® foram recuperados 117,33%.

A segunda dissociação ácida continuou sendo mais eficiente do que a primeira, no caso de cistos de *Giardia* spp.

5.7.2.8. Método 8 – Filtração em Membranas Adaptado ao Método de Boni de Oliveira (2012) Utilizando *Extran* (sem Homogeneização em Mixer Rotatório) e Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste

Na sequência, podem ser observados os resultados da contagem do inóculo (Tabela 5.34) e das recuperações obtidas no método (Tabela 5.35).

Tabela 5.34 - Contagem dos inóculos de (oo)cistos no Método 8

Cepas	Poço da lâmina	Alíquota (µL)	Contagem de (oo)cistos	Média de (oo)cistos ± Desv. padrão OU ± Coef. de variação(%)	Volume de inóculo (µL)	Inóculo no jarro do Jarteste [(oo)cistos. L ⁻¹]	Total de (oo)cistos
<i>C^W</i>	1		809				
	2	20	930	874 ± 50 ou ±5	20	437	874
	3		884				
<i>G^U</i>	1		2699				
	2	20	2841	2734 ± 77 ou ±3	20	1367	2734
	3		2663				

Legenda:

C^W - Cepa da Waterborne contendo oocistos de *Cryptosporidium parvum*

G^U - Cepa da UNICAMP contendo cistos de *Giardia* spp.

Tabela 5.35 - Recuperação de (oo)cistos do Método 8

	Resíduo sedimentado				Sobrenadante aos resíduos			
Fator de multiplicação	24				1			
Protozoários	<i>C. parvum</i>		<i>Giardia</i> spp.		<i>C. parvum</i>		<i>Giardia</i> spp.	
Inóculo no jarro	874		2734		874		2734	
Dissociação ácida	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Contagem por poço	0	2	8	10	0	0	0	0
Contagem total	2		18		0		0	
Recuperação (%)	5,49		15,80		-		-	

Legenda:

- : não calculado

Como pode ser observado na Tabela 5.34, neste método, o volume de alíquota avaliado passou a ser superior à 5 µL e, também, optou-se por inocular o mesmo volume realizado na contagem, reduzindo os erros na recuperação. Assim, 20 µL foram contabilizados e inoculados. No caso de *C. parvum* a quantidade representou um inóculo aparentemente apropriado (437 oocistos.L⁻¹), mas ainda inadequado para *Giardia* spp. (1367 cistos.L⁻¹) estando acima do valor estimado inicialmente.

Comparando a contagem de protozoários em 20 µL (874 oocistos e 2734 cistos), com as contagens anteriores de 5 µL e com a quantidade estimada nos volumes de inóculos realizados em vários métodos anteriores, é possível comprovar que a quantidade de protozoários inoculados era realmente superior ao que se esperava. Assim, o correto seria contabilizar e inocular exatamente o mesmo volume da cepa.

Outro fato importante deste método é o elevado fator de multiplicação (FM = 24), já que foram analisados 5 mL de um total de 120 mL de resíduo sedimentado devido à falta da centrífuga. Para *Giardia* spp. foi obtida uma recuperação conforme estabelece o Método 1623.1, porém, está aquém do desejado para *C. parvum*.

Um resultado interessante pode ser observado analisando a amostra de sobrenadante ao resíduo. Não foi recuperado nenhum patógeno, podendo indicar elevada eficiência no ensaio de tratabilidade ou elevada dificuldade de detectar os patógenos nessa amostra.

5.7.2.9. Método 9 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste e Uso de *Extran*

Os Métodos 9, 10, 11, 12 e 13 foram realizados em conjunto, portanto, foi feita uma única contagem de inóculo e os resultados estão na Tabela 5.36. Os resultados das recuperações estão descritos na Tabela 5.37.

Tabela 5.36 - Determinação dos inóculos de (oo)cistos no Método 9, 10, 11, 12 e 13

Cepas	Poço da lâmina	Alíquota (μL)	Contagem de (oo)cistos	Média de (oo)cistos ± Desv. padrão OU ± Coef. de variação(%)	Volume de inóculo (μL)	Inóculo [(oo)cistos. L ⁻¹]	Total de (oo)cistos
<i>C^W</i>	1	20	798	802 ± 54 ou ±7	20	401	802
	2		738				
	3		871				
<i>G^U</i>	1	10	1406	1301 ± 88 ou ±7	10	650	1301
	2		1191				
	3		1305				

Legenda:

C^W - Cepa da Waterborne contendo oocistos de *Cryptosporidium parvum*

G^U - Cepa da UNICAMP contendo cistos de *Giardia* spp.

Tabela 5.37 - Recuperação de (oo)cistos do Método 9

Resíduo sedimentado				
Fator de multiplicação		23,4		
Protozoários		<i>C. parvum</i>		<i>Giardia</i> spp.
Inóculo no jarro		802		1301
Dissociação ácida		1 ^a	2 ^a	1 ^a 2 ^a
Contagem por poço		6	0	2 0
Contagem total		6		2
Recuperação (%)		17,50		3,60

Em comparação com o Método 8, o volume de inóculo e a quantidade de cistos foram diminuídos pela metade, atingindo, desta forma, a concentração desejada. O fator de multiplicação foi elevado (FM = 23,4), já que foram analisados apenas 5 mL do

resíduo sedimentado. A recuperação para *C. parvum* foi relativamente alta (17,50%), porém, fora dos critérios estabelecidos pela USEPA (2012).

5.7.2.10. Método 10 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos da Waterborne e da UNICAMP no Jarro do Jarteste e uso de ICN 7X

A contagem do inóculo está na Tabela 5.36. As recuperações são apresentadas na Tabela 5.38.

Tabela 5.38 - Recuperação de (oo)cistos do Método 10

Resíduo sedimentado				
Fator de multiplicação	23,2			
Protozoários	<i>C. parvum</i>		<i>Giardia</i> spp.	
Inóculo no jarro	802		1301	
Dissociação ácida	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Contagem por poço	9	1	5	4
Contagem total	10		9	
Recuperação (%)	28,92		16,05	

Uma melhora significativa de recuperação foi obtida neste Método, o fato pode ter acontecido pela substituição do detergente *Extran* pelo ICN 7X, de forma semelhante ao protocolo descrito por Boni de Oliveira (2012). Para cistos de *Giardia* spp., a meta estipulada no Método 1623.1 foi atingida, entretanto para oocistos de *C. parvum* não, apesar de próxima. Vale destacar que o fator de multiplicação continuou elevado (FM = 23,2).

5.7.2.11. Método 11 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no TLP e Uso de *Extran*

A contagem do inóculo está na Tabela 5.36 e as recuperações na Tabela 5.39.

Tabela 5.39 - Recuperação de (oo)cistos do Método 11

	Resíduo sedimentado			
Fator de multiplicação	1			
Protozoários	<i>C. parvum</i>		<i>Giardia</i> spp.	
Inóculo no TLP	802		1301	
Dissociação ácida	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Contagem por poço	655	150	103	254
Contagem total	805		357	
Recuperação (%)	100,33		27,45	

A realização do inóculo diretamente no TLP fez com o fator de multiplicação não interferisse no cálculo da porcentagem de recuperação, já que toda a amostra era processada via IMS. As recuperações superaram o mínimo estabelecido pela USEPA. Destaque para a elevada contagem dos patógenos, sendo de 805 oocistos e de 357 cistos.

Apesar das elevadas recuperações obtidas, este protocolo não foi selecionado entre os melhores, isto porque o inóculo foi realizado diretamente no TLP e não na água de estudo. Assim, acredita-se que os (oo)cistos foram facilmente capturados pelas esferas magnéticas (*beads*) por não estarem devidamente conjugados aos flocos formados durante a coagulação/floculação.

5.7.2.12. Método 12 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no TLP e Uso de ICN 7X

A contagem do inóculo está na Tabela 5.36 e as recuperações na Tabela 5.40.

Tabela 5.40 - Recuperação de (oo)cistos do Método 12

	Resíduo sedimentado			
Fator de multiplicação	1			
Protozoários	<i>C. parvum</i>		<i>Giardia</i> spp.	
Inóculo no TLP	802		1301	
Dissociação ácida	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Contagem por poço	884	121	224	265
Contagem total	1005		489	
Recuperação (%)	125,26		37,60	

A diferença entre os Métodos 12 e 11 foi a substituição do detergente *Extran* pelo ICN 7X que, demonstrou, novamente melhoras na eficiência de recuperação de (oo)cistos. Importante verificar que mesmo utilizando um volume de inóculo igual ao da alíquota na contagem do inóculo, a recuperação para oocistos de *C. parvum* foi superior a 100%, indicando que ainda assim, a quantidade de (oo)cistos inoculados era maior ao que definido pelo valor médio.

Assim como no Método 11, o protocolo não pode ser considerado o mais adequado devido ao inóculo ter sido realizado no TLP.

5.7.2.13. Método 13 – Floculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste

O inóculo neste Método foi realizado conforme a Tabela 5.36 e as recuperações obtidas estão na Tabela 5.41.

Tabela 5.41 - Recuperação de (oo)cistos do Método 13

Resíduo sedimentado				
Fator de multiplicação	3			
Protozoários	<i>C. parvum</i>		<i>Giardia</i> spp.	
Inóculo no jarro	802		1301	
Dissociação ácida	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Contagem por poço	195	49	17	118
Contagem total	244		135	
Recuperação (%)	91,23		31,14	

Em função da Tabela 5.41 e comparando as condições estabelecidas nos Métodos 1 a 12, o presente protocolo possuiu o melhor desempenho. Em primeiro lugar, o inóculo foi realizado diretamente na água de estudo, fazendo com que os (oo)cistos fossem removidos pelos processos de coagulação/floculação e sedimentação. Além disso, o fator de multiplicação (FM = 3) foi baixo. Também foram contabilizados uma expressiva quantidade de (oo)cistos. Todos estes fatores contribuíram para uma porcentagem de recuperação mais condizente com a realidade de uma amostra de resíduo sedimentado.

A principal desvantagem de se aplicar a floculação em carbonato de cálcio (FCCa) é a variação do pH provocada no meio (entre 3 e 10), o que pode interferir na viabilidade dos (oo)cistos, como descreve Bukhari *et al.*, (2000). Apesar deste problema, o presente método atendeu o padrão estabelecido pelo Método 1623.1, sendo um método promissor para avaliação de protozoários em resíduos de ETA, assim, é possível candidato aos ensaios de qualidade analítica do método utilizando suspensões do tipo AccuSpike^{TM}.

Por apresentar bons resultados, o Método 13 foi novamente realizado e os resultados obtidos estão nos itens que seguem.

5.7.2.13.1. Primeira Repetição do Método 13

Na sequência, podem ser observados os resultados da contagem do inóculo (Tabela 5.42) e das recuperações obtidas no Método (Tabela 5.43).

Tabela 5.42 - Contagem dos inóculos de (oo)cistos na primeira repetição do Método 13

Cepas	Poço da lâmina	Alíquota (μL)	Contagem de (oo)cistos	Média de (oo)cistos ± Desv. padrão OU ± Coef. de variação(%)	Volume de inóculo (μL)	Inóculo no jarro do Jarroteste [(oo)cistos. L ⁻¹]	Total de (oo)cistos
C ^W	1	20	465	605 ± 159 ou ±26	20	303	605
	2		523				
	3		828				
G ^U	1	10	1317	1319 ± 6 ou ±0,5	10	659	1319
	2		1327				
	3		1313				

Legenda:

C^W - Cepa da Waterborne contendo oocistos de *Cryptosporidium parvum*

G^U - Cepa da UNICAMP contendo cistos de *Giardia* spp.

Tabela 5.43 - Recuperação de (oo)cistos na primeira repetição do Método 13

Resíduo sedimentado				
Fator de multiplicação	3			
Protozoários	<i>C. parvum</i>		<i>Giardia</i> spp.	
Inóculo no jarro	605		1319	
Dissociação ácida	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Contagem por poço	25	19	14	51
Contagem total	44		65	
Recuperação (%)	21,81		14,78	

Apesar da baixa variabilidade (coeficiente de variação = 0,5) na contagem de cistos de *Giardia* spp. (Tabela 5.42), uma significativa diminuição das recuperações foi observada nesta primeira repetição se comparado com o Método 13 (Tabela 5.43), principalmente para oocistos de *C. parvum*. Acredita-se que a cepa da Waterborne estava “velha” (com 8 meses) ou também o *Dynabeads* Anti-Crypto tenha perdido seu potencial de captura por estar próximo à validade, diferentemente do *Dynabeads* Anti-*Giardia*.

5.7.2.13.2. Segunda Repetição do Método 13

Na sequência, podem ser observados os resultados da contagem do inóculo (Tabela 5.44) e das recuperações obtidas no Método (Tabela 5.45).

Tabela 5.44 - Contagem dos inóculos de (oo)cistos na segunda repetição do Método 13

Cepas	Poço da lâmina	Alíquota (µL)	Contagem de (oo)cistos	Média de (oo)cistos ± Desv. padrão OU ± Coef. de variação(%)	Volume de inóculo (µL)	Inóculo no jarro do Jarteste [(oo)cistos. L ⁻¹]	Total de (oo)cistos
<i>C^W</i>	1	20	719	737 ± 82 ou ±11	20	368	737
	2		646				
	3		845				
<i>G^U</i>	1	5	705	689 ± 19 ou ±3	5	344	689
	2		699				
	3		663				

Legenda:

C^W - Cepa da Waterborne contendo oocistos de *Cryptosporidium parvum*

G^U - Cepa da UNICAMP contendo cistos de *Giardia* spp.

Tabela 5.45 - Recuperação de (oo)cistos na segunda repetição do Método 13

	Resíduo sedimentado			
Fator de multiplicação	3			
Protozoários	<i>C. parvum</i>		<i>Giardia</i> spp.	
Inóculo no jarro	737		689	
Dissociação ácida	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Contagem por poço	2	0	26	62
Contagem total	2		88	
Recuperação (%)	0,81		38,32	

O volume de inóculo da cepa de *Giardia* spp. da UNICAMP foi diminuído para 5 µL de forma a facilitar a contagem e aproximar-se da quantidade de cistos inoculados, como pode ser observado na Tabela 5.44.

Analisando as recuperações observa-se baixa para *C. parvum* (0,81%) e alta para *Giardia* spp. (38,32%). A reduzida recuperação de oocistos pode ter ocorrido pelo fato do produto *Dynabeads* Anti-Crypto ter sido utilizado no mês de vencimento, ou seja, as microesferas poderiam estar perdendo a capacidade de retenção dos oocistos. Este fato pode ser importante, pois houve elevada quantidade de cistos de *Giardia* spp recuperados com o *Dynabeads* Anti-Giardia, o qual ainda tinha 3 meses de validade. Destaca-se que os dois reagentes fazem parte do mesmo *kit*. Neste contexto, é fundamental sugerir aos fabricantes que os reagentes em questão possuam a mesma validade.

5.7.2.13.3. Terceira Repetição do Método 13

Na sequência, podem ser observados os resultados da contagem do inóculo (Tabela 5.46) e das recuperações obtidas no Método (Tabela 5.47).

Tabela 5.46 - Contagem dos inóculos de (oo)cistos na terceira repetição do Método 13

Cepas	Poço da lâmina	Alíquota (µL)	Contagem de (oo)cistos	Média de (oo)cistos ± Desv. padrão OU ± Coef. de variação(%)	Volume de inóculo (µL)	Inóculo no jarro do Jarteste [(oo)cistos. L ⁻¹]	Total de (oo)cistos
<i>C^W</i>	1	20	663	737 ± 37 ou ±5	20	332	664
	2		619				
	3		710				
<i>G^U</i>	1	5	600	689 ± 43 ou ±6	5	328	656
	2		665				
	3		704				

Legenda:

C^W - Cepa da Waterborne contendo oocistos de *Cryptosporidium parvum*

G^U - Cepa da UNICAMP contendo cistos de *Giardia* spp.

Tabela 5.47 - Recuperação de (oo)cistos na terceira repetição do Método 13

Resíduo sedimentado				
Fator de multiplicação	3			
Protozoários	<i>C. parvum</i>		<i>Giardia</i> spp.	
Inóculo no jarro	664		656	
Dissociação ácida	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Contagem por poço	1	0	4	2
Contagem total	1		6	
Recuperação (%)	0,45		2,74	

Nesta terceira aplicação do Método 13, substituiu-se o *kit Dynabeads® Invitrogen* utilizado no início da pesquisa por um novo *kit* de mesmas características, na tentativa de obter melhores recuperações. Contudo, não houve sucesso. Neste contexto, estima-se que a idade da cepa de *C. parvum* (com 8 meses) influenciou o desempenho da IMS. O fenômeno deve ser pesquisado, pois nos mananciais é difícil saber a idade dos (oo)cistos presentes. Portanto, mesmo com todo o rigor laboratorial, amostras podem ser negativas para (oo)cistos, porém, existe a possibilidade de ter (oo)cistos na amostra avaliada, os quais não foram detectados pelo protocolo aplicado.

5.7.2.14. Método 14 – Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste sem Descarte de Amostras

Este Método 14 foi realizado com o objetivo de avaliar se a divisão das amostras estava influenciando o Método 13. Assim, as amostras geradas no jarro não foram descartadas, portanto, a amostra de resíduo sedimentado foi analisada por inteiro, não havendo necessidade de se aplicar o fator de multiplicação no cálculo da recuperação.

Na sequência, podem ser observados os resultados da contagem do inóculo (Tabela 5.48) e das recuperações obtidas (Tabela 5.49).

Tabela 5.48 - Contagem dos inóculos de (oo)cistos do Método 14

Cepas	Poço da lâmina	Alíquota (μL)	Contagem de (oo)cistos	Média de (oo)cistos ± Desv. padrão OU ± Coef. de variação(%)	Volume de inóculo (μL)	Inóculo no jarro do Jarteste [(oo)cistos. L ⁻¹]	Total de (oo)cistos
C ^W	1		539				
	2	20	646	574 ± 51 ou ±9	20	287	574
	3		536				
G ^U	1		644				
	2	5	635	626 ± 20 ou ±3	5	313	626
	3		598				

Legenda:

C^W - Cepa da Waterborne contendo oocistos de *Cryptosporidium parvum*

G^U - Cepa da UNICAMP contendo cistos de *Giardia* spp.

Tabela 5.49 - Recuperação de (oo)cistos no Método 14

Tubo Falcon	1				2				3				TOTAL			
Protozoários	C.		Giardia		C.		Giardia		C.		Giardia		C.		Giardia	
	parvum	spp.	parvum	spp.	parvum	spp.	parvum	spp.	parvum	spp.	parvum	spp.	parvum	spp.	parvum	spp.
Inóculo no jarro	664		626		664		626		664		626		664		626	
Dissociação ácida	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Contagem por poço	133	76	34	28	23	122	11	30	128	41	13	26	284	239	58	84
Contagem total	209		62		145		41		169		39		523		142	
Recuperação (%)	36,41		9,90		25,26		6,56		29,44		6,23		91,11		22,70	
Recuperação (%) com FM=3 (*)	109,23		29,7		75,78		19,68		88,32		18,69		-		-	

Legenda:

FM: Fator de multiplicação

* Recuperação conforme cálculo efetuado no Método 13

- não calculado

Os valores destacados em negrito na Tabela 5.49 representam a contagem e recuperação obtidas no Método 14. O cálculo da porcentagem de recuperação, caso fosse utilizado FM = 3, também está na tabela anterior.

Duas análises podem ser feitas observando a Tabela 5.49. A primeira diz respeito à variação na contagem dos protozoários entre amostras (contidas em 3 tubos Falcon). Por exemplo, no primeiro tubo foram recuperados mais oocistos na primeira dissociação ácida (133) do que na segunda (76) e o contrário ocorreu no segundo tubo Falcon, em que foram recuperados mais oocistos na segunda dissociação ácida. Outra observação do ensaio envolve o uso do fator de multiplicação para obtenção da porcentagem de recuperação. O FM = 3, caso tivesse sido utilizado, poderia representar um resultado diferente, demonstrando a necessidade de ponderar, em futuras pesquisas, a pertinência do FM. Destaca-se que a avaliação integral da amostra envolve alto custo de reagentes e elevado tempo laboratorial.

Acredita-se que esta imprecisão possa ter ocorrido devido à dificuldade em se dividir as amostras nos tubos Falcon e, conseqüentemente, ocorreu uma distribuição desigual de protozoários.

O Método 14 apresentou recuperações superiores ao estipulado pelo Método 1623.1, entretanto, os custos envolvidos foram três vezes superiores quando comparados ao Método 13.

5.7.2.15. Método 15 – Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste Incluindo Análise de Protozoários na ALF

Neste Método, voltou-se a avaliar a recuperação de protozoários na amostra de água de lavagem de filtros (ALF) devido às promissoras recuperações obtidas na aplicação do Método 13. O protocolo foi realizado em triplicata, tanto para a amostra de ALF quanto para a amostra de resíduo sedimentado.

Os resultados da contagem do inóculo (Tabela 5.50) e das recuperações de protozoários na amostra de resíduo sedimentado (Tabela 5.51) e ALF (Tabela 5.52) estão descritos na sequência.

Tabela 5.50 - Contagem dos inóculos de (oo)cistos do Método 15

Cepas	Poço da lâmina	Alíquota (µL)	Contagem de (oo)cistos	Média de (oo)cistos ± Desv. padrão OU ± Coef. de variação(%)	Volume de inóculo (µL)	Inóculo no jarro do Jarteste [(oo)cistos. L ⁻¹]	Total de (oo)cistos
C ^W	1	20	805	859 ± 58 ou ±7	20	429	859
	2		939				
	3		832				
G ^U	1	10	1331	1356 ± 20 ou ±1	10	678	1356
	2		1380				
	3		1357				

Legenda:

C^W - Cepa da Waterborne contendo oocistos de *Cryptosporidium parvum*

G^U - Cepa da UNICAMP contendo cistos de *Giardia* spp.

Tabela 5.51 - Recuperação de (oo)cistos do Método 15 na amostra de resíduo sedimentado

Ensaio em triplicata	1				2				3			
Fator de multiplicação	3				3				3			
Protozoários	<i>C. parvum</i>		<i>Giardia</i> spp.		<i>C. parvum</i>		<i>Giardia</i> spp.		<i>C. parvum</i>		<i>Giardia</i> spp.	
Inóculo no jarro	859		1356		859		1356		859		1356	
Dissociação ácida	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Contagem por poço	125	16	99	109	213	11	108	90	140	12	124	95
Contagem total	141		208		224		298		152		219	
Recuperação (%)	49,26		46,02		43,81		78,26		53,11		48,45	

Tabela 5.52 – Total de (oo)cistos recuperados no Método 15 na amostra de ALF

Ensaio em triplicata	1				2				3			
Protozoários	<i>C. parvum</i>		<i>Giardia</i> spp.		<i>C. parvum</i>		<i>Giardia</i> spp.		<i>C. parvum</i>		<i>Giardia</i> spp.	
Inóculo no jarro	859		1356		859		1356		859		1356	
Dissociação ácida	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Contagem por poço	5	0	1	0	0	0	1	0	4	1	0	2
Contagem total	5		1		0		1		5		2	

A variabilidade na contagem do inóculo da cepa da *Giardia* spp. foi menor quando comparada à cepa da Waterborne (Tabela 5.50).

Para a amostra de resíduo sedimentado, as porcentagens de recuperação de (oo)cistos foram superiores aos valores estipulados pelo Método 1623.1. Assim, o Método 15 é promissor para avaliar (oo)cistos em resíduos de ETA. No caso da amostra de ALF, a quantidade de (oo)cistos recuperados continuou baixa.

5.7.2.16. Método 16 – Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos de Suspensão Comercial (AccuSpike™ da Waterborne) no Jarro de Jarreste

O protocolo foi realizado conforme o Método 13, porém, foram inoculados exatamente 100 cistos de *Giardia lamblia* e 100 oocistos de *Cryptosporidium parvum* com o objetivo de ponderar, preliminarmente, a recuperação utilizando a cepa AccuSpike™. Os resultados estão na Tabela 5.53.

Tabela 5.53 - Recuperação de (oo)cistos na terceira repetição do Método 16

	Resíduo sedimentado			
Fator de multiplicação	3			
Protozoários	<i>C. parvum</i>		<i>G. lamblia</i>	
Inóculo no jarro	100		100	
Dissociação ácida	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Contagem por poço	0	0	1	4
Contagem total	0		5	
Recuperação (%)	0,00		15,00	

No ensaio não foram encontrados oocistos de *C. parvum*, contudo 5 cistos de *G. lamblia* foram recuperados, sendo observados mais cistos na segunda dissociação ácida (4) do que na primeira (1). A recuperação para *G. lamblia* foi superior ao estabelecido no Método 1623.1, entretanto, a recuperação para *C. parvum* foi insatisfatória.

As baixas recuperações obtidas podem ter sido resultado da utilização do AccuSpike™ vencido em praticamente um mês. Conforme DiGiorgio, Gonzalez e Huitt (2002), verificaram que além da baixa qualidade dos cistos de *Giardia* utilizados na pesquisa, os cistos podem ter sido degradados durante o processo de amostragem e tratamento influenciando negativamente nas recuperações.

O descarte de amostras igualmente pode ser um motivo para a não captura dos patógenos, já que a quantidade de protozoários inoculados foi pequena (100 (oo)cistos).

5.7.2.17. Método 17 – Floculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos de Suspensão Comercial (AccuSpike™ da Waterborne) no Jarro de Jarteste sem Descarte de Amostra

O inóculo AccuSpike™ foi testado novamente, após 40 dias de validade, porém não houve descarte de amostra. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.54.

Tabela 5.54 - Recuperação de (oo)cistos no Método 17

Tubo Falcon	1		2		3		TOTAL	
Protozoários	<i>C. parvum</i>	<i>G. lamblia</i>	<i>C. parvum</i>	<i>G. lamblia</i>	<i>C. parvum</i>	<i>G. lamblia</i>	<i>C. parvum</i>	<i>G. lamblia</i>
Inóculo no jarro	100	100	100	100	100	100	100	100
Dissociação ácida	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Contagem por poço	0	1	1	8	2	2	2	4
Contagem total	1	9	4	6	3	4	8	19
Recuperação (%)	1,00	9,00	4,00	6,00	3,00	4,00	8,00	19,00
Recuperação (%) com FM=3 (*)	3,00	18,00	12,00	18,00	9,00	12,00	-	-

Legenda:

FM: Fator de multiplicação

* Recuperação conforme cálculo efetuado no Método 16

- não calculado

As porcentagens de recuperações para cistos de *G. lamblia* foram superiores ao estipulado pelo Método 1623.1. Entretanto, para *C. parvum* não foi atingido o objetivo mesmo utilizando o FM = 3 do Método 16.

Para os três tubos Falcon, a contagem de cistos de *G. lamblia* foi maior na segunda dissociação ácida do que na primeira. Isso indica que, possivelmente, uma terceira dissociação ácida poderia elevar a porcentagem de recuperação.

5.7.2.18. Método 18 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste, Uso de ICN 7X e Incluindo a Concentração de Amostra

Na sequência, podem ser observados os resultados da contagem do inóculo (Tabela 5.55) e das recuperações obtidas no Método (Tabela 5.56).

Tabela 5.55 - Contagem dos inóculos de (oo)cistos do Método 18

Cepas	Poço da lâmina	Alíquota (µL)	Contagem de (oo)cistos	Média de (oo)cistos ± Desv. padrão OU ± Coef. de variação(%)	Volume de inóculo (µL)	Inóculo no jarro do Jarteste [(oo)cistos. L ⁻¹]	Total de (oo)cistos
<i>C^W</i>	1	20	772	811 ± 69 ou ±9	20	405	811
	2		753				
	3		907				
<i>G^U</i>	1	10	1328	1388 ± 45 ou ±3	10	694	1388
	2		1397				
	3		1438				

Legenda:

C^W - Cepa da Waterborne contendo oocistos de *Cryptosporidium parvum*

G^U - Cepa da UNICAMP contendo cistos de *Giardia* spp.

Tabela 5.56 - Recuperação de (oo)cistos do Método 18

Resíduo sedimentado				
Fator de multiplicação	3			
Protozoários	<i>C. parvum</i>		<i>Giardia</i> spp.	
Inóculo no jarro	811		1388	
Dissociação ácida	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Contagem por poço	0	0	30	0
Contagem total	0		30	
Recuperação (%)	0,00		6,49	

O Método 18 assemelha-se ao Método 10, com inóculo de (oo)cistos na água de estudo e uso do detergente ICN 7X na amostra de resíduo sedimentado. A diferença entre eles é o uso da centrífuga, ou seja, menor FM. Mesmo assim, não foram obtidos

bons resultados conforme estipula o Método 1623.1. Boni de Oliveira (2012) recuperou, em média, $33,20 \pm 10,48\%$ e $37,60 \pm 9,19\%$ cistos de *Giardia* spp. quando 500 e 1000 cistos foram inoculados, respectivamente.

5.7.2.19. Método 19 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012)

Utilizando ICN 7X com Homogeneização por 1 Hora e Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste e Incluindo Concentração de Amostra

Os resultados da contagem do inóculo são apresentados na Tabela 5.57 e as recuperações na Tabela 5.58.

Tabela 5.57 - Contagem dos inóculos de (oo)cistos do Método 19 e 20

Cepas	Poço da lâmina	Alíquota (μL)	Contagem de (oo)cistos	Média de (oo)cistos ± Desv. padrão OU ± Coef. de variação(%)	Volume de inóculo (μL)	Inóculo no jarro do Jarteste [(oo)cistos. L ⁻¹]	Total de (oo)cistos
<i>C^W</i>	1	20	842	741 ± 194 ou ± 26	20	370	741
	2		469				
	3		911				
<i>G^U</i>	1	5	710	619 ± 87 ou ± 14	10	310	619
	2		501				
	3		646				

Legenda:

C^W - Cepa da Waterborne contendo oocistos de *Cryptosporidium parvum*

G^U - Cepa da UNICAMP contendo cistos de *Giardia* spp.

Tabela 5.58 - Recuperação de (oo)cistos do Método 19 na amostra de resíduo sedimentado

Ensaio em triplicata	1		2		3	
Fator de multiplicação	3		3		3	
Protozoários	<i>C. parvum</i>		<i>Giardia</i> spp.		<i>C. parvum</i>	
Inóculo no jarro	741		619		619	
Dissociação ácida	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Contagem por poço	76	60	1	12	106	11
Contagem total	136		13		117	
Recuperação (%)	55,09		6,30		47,39	

As recuperações para *C. parvum* foram superiores ao estabelecido pelo Método 1623.1 no primeiro e segundo ensaio com 55,09% e 47,39%, respectivamente. Para *Giardia* spp. apenas o ensaio 2 foi responsável por superar o limite de 8,0% estabelecido pela USEPA. Verificou-se, no Método, que a contagem de (oo)cistos foi facilitada devido à limpeza do poço, principalmente para cistos de *Giardia* spp. (Figura 5.25). Desta forma, este método pode ser viável para detecção de (oo)cistos em resíduos de ETA após mais estudos visando otimizar a técnica.

Figura 5.25 – Aspecto de limpeza do poço no Método 19 (400x).

Apesar da elevada recuperação de oocistos de *C. parvum*, poucos cistos de *Giardia* spp. foram recuperados. Segundo Boni de Oliveira (2012), a homogeneização

por 30min com o detergente ICN 7X repercutiu em recuperações de cistos de *Giardia* spp. superiores à 30%, tanto para amostras que receberam inóculos de 500 cistos quanto para amostras que receberam 1000 cistos do patógeno.

5.7.2.20. Método 20 – Adaptação do Método de Keegan *et al.* (2008) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste

O Método 20 foi realizado em conjunto com o Método 19, assim, a contagem de (oo)cistos foi a mesma indicada na Tabela 5.57. Os resultados da recuperação deste Método estão descritos na Tabela 5.59.

Tabela 5.59 - Recuperação de (oo)cistos do Método 20 na amostra de resíduo sedimentado

Ensaio em triplicata	1				2				3			
Fator de multiplicação	3				3				3			
Protozoários	<i>C. parvum</i>		<i>Giardia</i> spp.		<i>C. parvum</i>		<i>Giardia</i> spp.		<i>C. parvum</i>		<i>Giardia</i> spp.	
Inóculo no jarro	741		619		741		619		741		619	
Dissociação ácida	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Contagem por poço	116	32	17	44	43	8	24	20	73	9	33	23
Contagem total	148		61		51		44		82		56	
Recuperação (%)	59,95		29,56		20,66		21,32		33,21		27,14	

A recuperação mínima estabelecida pelo Método 1623.1, para oocistos de *C. parvum*, foi superada nos ensaios 1 e 3 (Tabela 5.59). Para cistos de *Giardia* spp. as recuperações atenderam o padrão internacional nos três ensaios. Além disso, a contagem foi facilitada devido à limpeza do poço (Figura 5.26). Portanto, este método pode ser viável para detecção de (oo)cistos em resíduos de ETA, contudo, mais estudos devem ser realizados visando otimizar o protocolo em questão.

A necessidade de se variar o pH (3-7) pode alterar a viabilidade dos cistos. Desta forma, este fator deve ser ponderado no momento de selecionar o protocolo.

Figura 5.26 - 4 cistos de *Giardia* spp. facilmente visualizados no Método 20 (200x).

Keegan *et al.* (2008) não avaliaram a recuperação de (oo)cistos na amostra de resíduo sedimentado, porém verificaram em ensaios de Jarrestes (coagulação, floculação e sedimentação) elevadas remoções de *Cryptosporidium parvum* (>90%) na água tratada, sendo que foram inoculados cerca de 100.000 oocistos. Portanto, grande quantidade dos (oo)cistos removidos no tratamento possivelmente estão junto com as partículas sedimentadas.

5.7.3. Coeficiente de Variação do Inóculo

O coeficiente de variação resultante da contagem de inóculo em todos os métodos testados, exceto pelos Métodos 16 e 17 que utilizaram o inóculo AccuSpike™, podem ser observados na Tabela 5.60.

Tabela 5.60 - Coeficiente de variação da contagem de inóculo

Métodos	Coeficiente de variação		Métodos	Coeficiente de variação	
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.		<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.
1	22 ^W	9 ^W	9, 10, 11, 12 e 13	7 ^W	7 ^U
2	92 ^W	16 ^W	13.1	26 ^W	0,5 ^U
3	35 ^W	56 ^W	13.2	11 ^W	3 ^U
4	8 ^{C+}	9 ^{C+}	13.3	5 ^W	6 ^U
5	13 ^W	38 ^W	14	9 ^W	3 ^U
6	22 ^W	69 ^W	15	7 ^W	1 ^U
7	10 ^{C+} e 16 ^W	7 ^{C+} e 10 ^U	18	9 ^W	3 ^U
8	5 ^W	3 ^U	19 e 20	26 ^W	14 ^U

Legenda:

^W - Cepa da Waterborne

^{C+} - Controle positivo do *kit* Merifluor®

^U - Cepa da UNICAMP

Pode ser observado na Tabela 5.60, que o uso da cepa da UNICAMP diminuiu o coeficiente de variação se comparado com o uso da cepa da Waterborne contendo cistos de *Giardia lamblia*. Portanto, as contagens de inóculos para cistos de *Giardia* spp. variaram menos a partir do Método 7, desta forma, o cálculo de recuperação de para cistos foi mais fidedigno se comparado com os primeiros métodos. Para oocistos de *Cryptosporidium* spp. o coeficiente de variação também diminuiu ao longo dos métodos, mas voltou a oscilar nas repetições do Método 13 e nos Métodos 19 e 20, o que pode ter influenciado em uma subestimação ou superestimação das recuperações de oocistos.

5.8. Análise Estatística dos Melhores Métodos

Os métodos que tiveram as melhores recuperações foram:

- Métodos 13 - Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos da Waterborne e da UNICAMP no Jarro de Jarreste;
- Método 14 - Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos da Waterborne e da UNICAMP no Jarro de Jarreste sem Descarte de Amostras;
- Método 15 - Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos da Waterborne e da UNICAMP no Jarro de Jarreste Incluindo Análise de Protozoários na ALF;
- Método 19 - Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) Utilizando ICN 7X com Homogeneização por 1 Hora e Inóculos da Waterborne e da UNICAMP no Jarro de Jarreste e Incluindo Concentração de Amostra;
- Método 20 - Adaptação do Método de Keegan *et al.* (2008) com Inóculos da Waterborne e da UNICAMP no Jarro de Jarreste.

Os resultados estão resumidos na Tabela 5.61.

Tabela 5.61 - Protocolos que atenderam aos padrões do Método 1623.1

Método	Média de (oo)cistos inoculados		Amostras	(Oo)cistos contabilizados		FM	Recuperação (%)	
	<i>C. parvum</i>	<i>Giardia spp.</i>		<i>C. parvum</i>	<i>Giardia spp.</i>		<i>C. parvum</i>	<i>Giardia spp.</i>
13	802 ^W	1301 ^U	RS + S+ FCCa	244	135	3	91,23	31,14
14	574 ^W	626 ^U	RS + S+ FCCa	523	142	1	91,17	22,70
15 Triplicata	859 ^W	1356 ^U	RS + S + FCCa	141	208	3	49,26	46,02
			ALF + FCCa	5	1	-	-	-
			RS + S + FCCa	224	198	3	78,26	43,81
			ALF + FCCa	0	1	-	-	-
			RS + S + FCCa	152	219	3	53,11	48,45
			ALF + FCCa	5	2	-	-	-
19 Triplicata	741 ^W	619 ^U	RS+ICN7X	136	13	3	55,09	6,30
			RS+ICN7X	117	47	3	47,39	22,78
			RS+ICN7X	52	11	3	21,06	5,33
20 Triplicata			RS	148	61	3	59,95	29,56
			RS	51	44	3	20,66	21,32
			RS	82	56	3	33,21	27,14

Siglas e observações:

^W: inóculo da Waterborne;

^U: inóculo purificado na UNICAMP;

FM: Fator de multiplicação;

RS: Resíduo sedimentado;

S: Sobrenadante ao resíduo sedimentado;

ALF: Água de lavagem dos filtros;

FCCa: Floculação em carbonato de cálcio;

RS + ICN 7X: Resíduo sedimentado com detergente ICN7X;

ALF + FCCa: Água de lavagem dos filtros com floculação em carbonato de cálcio

RS + S + FCCa: Resíduo sedimentado e sobrenadante ao resíduo com floculação em carbonato de cálcio.

- : não calculado;

Métodos:

13: Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos da Waterborne e da UNICAMP no Jarro de Jarteste;

14: Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos da Waterborne e da UNICAMP no Jarro de Jarteste sem Descarte de Amostras;

15: Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos da Waterborne e da UNICAMP no Jarro de Jarteste Incluindo Análise de Protozoários na ALF;

19: Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) Utilizando ICN 7X com Homogeneização por 1 Hora e Inóculos da Waterborne e da UNICAMP no Jarro de Jarteste e Incluindo Concentração de Amostra;

20: Adaptação do Método de Keegan *et al.* (2008) com Inóculos da Waterborne e da UNICAMP no Jarro de Jarteste.

Apesar dos Métodos 13 e 14 apresentarem bons resultados somente foram selecionados os Métodos 15, 19 e 20 para análise estatística. Destaca-se que o Método 15 já envolve os Protocolos 13 e 14, ao avaliar a floculação em carbonato de cálcio.

Como os tamanhos amostrais são menores do que 15, a normalidade pode ser um problema. Se os dados não forem normalmente distribuídos, o p-valor pode ser inexato com amostras pequenas e deve-se ter cuidado ao interpretar os resultados deste teste.

De acordo com o teste F pela ANOVA seguido do teste Tukey para comparação de média em nível de significância de 5%, foi verificado que não há diferença significativa entre os Métodos 15, 19 e 20 quando analisada somente as recuperações de oocistos de *Cryptosporidium parvum*. Portanto, não se pode concluir, estatisticamente, qual deles foi melhor (Figura 5.27).

Figura 5.27 - Médias de recuperação para oocistos de *Cryptosporidium parvum*. dos Métodos 15, 19 e 20. As médias representadas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo método de Tukey.

Entretanto, a aplicação do mesmo teste estatístico nas mesmas condições descritas, indicou que as recuperações de cistos de *Giardia* spp. tiveram diferença significativa entre as médias. Portanto, foi possível concluir, que o Método 15 era o melhor (Figura 5.28).

Figura 5.28 - Médias de recuperação para cistos de *Giardia* spp. dos Métodos 15, 19 e 20. As médias representadas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo método de Tukey.

Ao final da análise estatística, é possível concluir que o Método 15, baseado na floculação em carbonato de cálcio (FCCa) foi estatisticamente melhor do que os outros. Portanto, recomenda-se uma avaliação desse protocolo na detecção de (oo)cistos em resíduos de estações de tratamento de água.

A adaptação dos métodos de Boni de Oliveira (2012) e Keegan *et al.* (2008) também repercutiram em porcentagens de recuperação expressivas para a amostra de resíduo sedimentado, sendo de: $41 \pm 35\%$ para oocisto de *C. parvum* e $11 \pm 70\%$ para cisto de *Giardia* spp., e $38 \pm 26\%$ para oocisto de *C. parvum* e $26 \pm 13\%$ para cisto de *Giardia* spp., respectivamente. Entretanto, não demonstraram ser estatisticamente melhores do que o Método 15.

5.9. Controle de Qualidade do Melhor Método

Segundo o Método 1623.1, o controle de qualidade analítica do método somente pode ser validado caso sejam realizados 4 ensaios (quadruplicata) com quantidade exata de (oo)cistos inoculados, como é o caso do inóculo AccuSpike™. Todavia, o inóculo da por estar vencido (40 dias) foi substituído pelos inóculos contendo elevadas

concentrações/quantidades de oocistos da Waterborne e de cistos da UNICAMP, assim sendo, não foi possível validar, com precisão, o método em questão.

Para avaliação do controle de qualidade do método, o Método 15, realizado em triplicada, foi selecionado com o auxílio da análise estatística. Devido à necessidade de outro ensaio para avaliação em quadruplicata, os resultados obtidos no Método 13 (ensaio único), realizado nas mesmas condições do Método 15 e que também se baseou na FCCa, foi adicionado à avaliação do controle de qualidade do método. Desta forma, foi feita a avaliação do método da FCCa (Métodos 15 e 13) e os resultados estão descritos na Tabela 5.62.

Tabela 5.62 - Controle de qualidade do método da floculação em carbonato de cálcio (Métodos 15 e 13)

<i>Cryptosporidium parvum</i>				
Ensaio	Método	Recuperação (%)	Média ± Desvio padrão	Coefficiente de variação
1	15	49,26	68 ± 17	25
2	15	78,26		
3	15	53,11		
4	13	91,23	0	0
5 (negativo)	13	0		
<i>Giardia spp.</i>				
1	15	46,02	42 ± 7	15
2	15	43,81		
3	15	48,45		
4	13	31,14	0	0
5 (negativo)	13	0		

As médias de recuperações e os coeficientes de variação (desvio padrão relativo à média) estão dentro dos valores descritos pelo Método 1623.1 para ambos os protozoários. Entretanto, como indicado anteriormente, a substituição do inóculo AccuSpike™ pelos inóculos da Waterborne e da UNICAMP, impossibilitou a validação, com precisão, do método da FCCa, conforme estabelece a agência americana. Destaca-se que o AccuSpike™ tem validade de 3 meses e demora 2 meses

para chegar ao Brasil, assim, a aquisição da suspensão citada deve ser planejada criteriosamente.

6. CONCLUSÕES

Em relação aos ensaios de tratabilidade sem inóculo de protozoários:

- O PAC (cloreto de polialumínio) gerou 99% de remoção de turbidez, portanto, considerou-se um coagulante eficiente;
- Os valores de potencial zeta aproximaram-se de zero tanto positiva como negativamente e não foi verificado um valor numérico constante;
- O filtro pode trabalhar de maneira pistonada;

Em relação aos métodos de detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium parvum* testados:

- Há interferência da variabilidade do inóculo nas recuperações;
- Houve menor detecção de (oo)cistos na amostra de ALF se comparado com a detecção na amostra de resíduo sedimentado;
- A segunda dissociação ácida foi indispensável na recuperação, principalmente, dos cistos de *Giardia* spp.;
- A idade dos (oo)cistos pode ter afetado nas recuperações dos métodos testados;
- Somente o Método 15 demonstrou diferença estatística dentre os métodos de elevada recuperação;
- A limpeza dos poços da lâmina facilita a contagem dos (oo)cistos, portanto, é vantajosa a aplicação do Método 19;
- Nos Métodos 15 e 20, a variação de pH do meio pode interferir na viabilidade dos protozoários;
- Dos 20 Métodos testados, somente cinco atenderam aos padrões estabelecidos pelo Método 1623.1, em termos de porcentagem de recuperação, estes foram:
  - Método 13 – Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste;
  - Método 14 – Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste sem Descarte de Amostras;

- Método 15 – Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste Incluindo Análise de Protozoários na ALF;
  - Método 19 – Adaptação do Método de Boni de Oliveira (2012) Utilizando ICN 7X com Homogeneização por 1 Hora e Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste e Incluindo Concentração de Amostra;
  - Método 20 – Adaptação do Método de Keegan *et al.* (2008) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste.
- A ineficiência das recuperações de (oo)cistos pode estar relacionada com: i) a contagem equivocada de inóculos (cistos aglomerados); ii) o elevado descarte de amostras e (oo)cistos devido ao grande volume de *pellet*; iii) dificuldade de divisão das amostras e de (oo)cistos; iv) escolha inadequada de cepa (controle positivo do *kit* Merifluor®) e local inadequado de inóculo (TLP e amostras).

Em relação ao estudo estatístico:

- O Método 15 (Flocculação em Carbonato de Cálcio (FCCa) com Inóculos de Suspensão Comercial (Waterborne) e de Suspensão Purificada (UNICAMP) no Jarro de Jarteste Incluindo Análise de Protozoários na ALF) foi o protocolo mais indicado para detectar cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em resíduos de estações de tratamento de água.

Em relação ao resultado do controle de qualidade analítica:

- As médias e os coeficientes de variação obtidos com as recuperações do controle de qualidade do método da flocculação em carbonato de cálcio (FCCa) com devidas adaptações (Métodos 13 e 15), foram de $68 \pm 17\%$ e $42 \pm 7\%$ para oocistos de *Cryptosporidium parvum* e cistos de *Giardia* spp., respectivamente. Apesar das elevadas recuperações, é indispensável utilizar os inóculos com número conhecido de protozoários, como o AccuSpike^{TM} por exemplo, visando assim, atender o padrão internacional - Método 1623.1 da USEPA (2012).

7. RECOMENDAÇÕES

1. Utilizar inóculos validados pelo Método 1623.1 no controle de qualidade analítica do método de floculação com carbonato de cálcio de Vesey *et al*, (1993) adaptado por Feng *et al*. (2011);
2. Avaliar os métodos que obtiveram as melhores recuperações em resíduos de estações de tratamento de água reais;
3. Avaliar a recuperação de protozoários utilizando uma matriz real contendo (oo)cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium*, desta forma, não será mais preciso realizar a etapa de inóculo de protozoários;
4. Avaliar o desempenho de uma terceira dissociação ácida nos protocolos de detecção de (oo)cistos com separação imunomagnética;
5. Estudar, com mais detalhes, a presença de (oo)cistos na água de lavagem dos filtros de estações de tratamento reais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. **Associação Brasileira de Normas Técnicas (2004)**. NBR 10.004: 2004. Rio de Janeiro, 48 p.

ACHON, C. L. **Ecoeficiência de sistemas de tratamento de água à luz dos conceitos da ISO 14.001**. Tese (doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo – EESC/USP. Brasil, 2008.

ACHON, C. L.; BARROSO, M. M.; CORDEIRO, J. S. Resíduos de estações de tratamento de água e a ISO 24512: desafio do saneamento brasileiro. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.18, n. 2, p. 115-122, 2013.

ADAM, R. D. The *Giardia lamblia* genome. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 4, p. 475-84, 2000.

ALDOM, J. E.; CHAGLA, A. M. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water by a membrane filter dissolution method. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 186-187, 1995.

ALI, S. A; HILL, D. R. *Giardia intestinalis*. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 453–60, 2003.

APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Washington. 22º Ed. EUA, 2012.

ASSAVASILAVASUKUL, P. et al. Effect of pathogen concentrations on removal of *Cryptosporidium* and *Giardia* by conventional drinking water treatment. **Water Research**, v. 42, n. 10, p. 2678-2690, 2008.

BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. **Water Research**. v. 45, p. 6603-6614, 2011.

BARBOSA, A. B. D.; MENDES, M. J.; BAYLÃO, T. W. S. Emprego do policloreto de alumínio em uma estação de filtração direta com água proveniente de manancial em processo de eutrofização. 2003. **Anais Eletrônicos**: I-148. Joinville – SC.

BARWICK, R. S. et al. Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris* in soil sample. **Biology and Fertility Soils**, v.31, p. 385-390, 2000.

BELL, K. et al. Enhanced and optimized coagulation for particulate and microbial removal. **Water Research Foundation**, Denver, 2000.

BETANCOURT, W. Q. ; PEELE, E. R.; ROSE, J. B. *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayentanensis*: A review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. **Journal of Microbiological Methods**, v. 49, n. 3, p. 209–224, 2002.

BETANCOURT, W. Q.; ROSE, J. B. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1-2 SPEC.ISS., p. 219–234, 2004.

BIDONE, F. et al. 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.

BRAGA, M. D. et al. Caracterização microbiológica da água de lavagem de filtros e avaliação de diferentes cenários de recirculação. In: Congresso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental Anais Eletrônicos, 2006. **Anais Eletrônicos**. Punta del Este, Montevideo, Uruguai.

BRANCO, N. **Avaliação da Presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp em Águas Naturais de Nascentes e Enteroparasitoses em duas Comunidades rurais da Cidade de Campos do Jordão, SP, Brasil**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

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). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo - EESC/USP, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. **Guia de vigilância epidemiológica**. 5 ed. Brasília, 2005.

BRASIL. Lei nº 12.305 de 02 de agosto de 2010. Política Nacional de Resíduos Sólidos. Brasília, DF: Congresso Nacional.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de Dezembro de 2011. Publicada no **D.O.U. Nº 239**, Seção 1, página 39 de 14/12/2011. Brasília.

BUKHARI, Z.; SMITH, H. V. Effect of three concentration techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from bovine feces. **Clinical Microbiology**, v. 33, n. 10, p. 2592-2595, 1995.

BUKHARI, Z. et al. Comparison of *Cryptosporidium parvum* viability and infectivity assays following ozone treatment of oocysts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 2972-2980, Jul 2000. ISSN 0099-2240

BUSTAMANTE, H. A. et al. Interaction between *Cryptosporidium* oocysts and water treatment coagulants. **Water Research**, v. 35, n. 13, p. 3179-3189, Sep 2001. ISSN 0043-1354.

BUTKUS, M. A.; BAYS, J. T.; LABARE M. P. Influence of surface characteristics on the stability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 3819-3825, 2003.

CACCIÒ, S.M. et al. *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 3393-3398, 2003.

CACCIÒ, S.M. et al. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology**, v. 21 n. 9, p. 430-437, 2005.

CACCIÒ, S.M.; RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. **Molecular Biochemical Parasitology** v. 160, p. 75-80, 2008.

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

CACCIÒ, S.; PUTIGNANI, L. Epidemiology of human *Cryptosporidiosis* in CACCIÒ, S. M.; WIDMER, G. editors, 2014. ***Cryptosporidium: parasite and disease***. Springer, 2014.

CANTUSIO NETO, R. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em diferentes pontos do processo de tratamento de água, em

Campinas, São Paulo, Brasil. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

CANTUSIO NETO, R. et al. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in surface water supply of Campinas, Southeast Brazil. **Water Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 217-222, 2010. ISSN 0273-1223.

CAMPOS, M. C. D. **Influência da recirculação de água de lavagem de filtros na qualidade da água para consumo humano.** Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Brasil, 2014.

CARVALHO-ALMEIDA, et al. Detection of *Cryptosporidium* spp. in non diarrheal faeces from children, in a day care center in the city of São Paulo, Brazil. **Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 1, p. 27-32, 2006.

CHALMERS, R. M. *Cryptosporidium*. Second Edition ed. Elsevier, 2014.

CLANCY, J. L.; HARDY, M. M.; DYKSEN, E. L. UV light inactivation of *Cryptosporidium* oocysts. **American Water Works Association**. v. 90, n. 9, p. 92-102, 1998.

CLANCY, J. L. (Ed). **New Approaches for Isolation of *Cryptosporidium* and *Giardia*.** American Water Works Association, 2000.

COOK, N. et al. Development of a method for detection of *Giardia duodenalis* cysts on lettuce and for simultaneous analysis of salad products for the presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 22, p. 7388-7389, 2007.

CORDEIRO, J. S. **O problema dos lodos gerados nos decantadores em estações de tratamento de águas.** Tese (doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo - EESC/USP, 1993.

CORDEIRO, J. S. Importância do tratamento e disposição adequada dos lodos 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: ABES, 1999.

CORSO, P. S. et al. Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. 426-431, 2003.

COSTA, J. O. et al. Avaliação da eficiência de filtro lento no tratamento de água da chuva no centro de integração Iar Paraná. II Seminário de Extensão e Inovação da UTFPR, 2012, **Anais eletrônicos**, Curitiba, PR.

COTA, R. S. **Hidrodinâmica e desempenho de filtros verticais com alimentação em pulso, plantados e não plantados, empregados no tratamento de esgoto sanitário bruto**. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Brasil, 2011.

CUNHA, M. V. P. O. **Importância da frequência de descarte de lodo na eficiência dos decantadores de estações de tratamento de água em ciclo completo**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Pará – UFPA. Brasil, 2004.

DAI, X.; BOLL, J. Settling velocity of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia*. **Water Research**, v. 40, n. 6, p. 1321-1325, 2006.

DALSASSO, R. L.; SENS, M. L. Filtração direta com pré-floculação e coagulação com sulfato de alumínio e hidroxicloreto de alumínio: estudo com água de manancial eutrofizado. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 11, n. 3, p. 241–249, 2006.

DIAS JUNIOR, O. **Ocorrência de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp. em águas superficiais e esgoto no município de Araras/SP**. Dissertação de Mestrado – Universidade Presbiteriana Mackenzie, p. 110, 1999.

DIAS, G. M. F. et al. *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em água de manancial superficial de abastecimento contaminada por dejetos humano e animal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1291, ISSN 01020935, 2008.

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, p. 5952–5955, 2002.

DI BERNARDO, L. (Coord.). **Tratamento de Água para Abastecimento por Filtração Direta**. PROSAB 3. Rio de Janeiro: ABES, RiMA, p. 498, 2003

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A. D. B. **Métodos e Técnicas de Tratamento de Água**. São Carlos, RiMa, 2ed. v. 2, p. 1565, 2005.

DI BERNARDO, L.; SABOGAL PAZ, L. P. **Seleção de Tecnologias de Tratamento de Água**. Editora LDiBe. v. 1 e v. 2. p. 1560, 2008.

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

DE JULIO, M. et al. Emprego do reagente de fenton como agente coagulante na remoção de substâncias húmicas de água por meio da flotação por ar dissolvido e filtração. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 11, n. 3, p. 260-268, 2006.

DE JULIO, M. et al. Avaliação da remoção de Cianobactérias e Saxitoxinas da Água Bruta Afluente à ETA Pitangui de Ponta Grossa/PR, Utilizando os Diagramas de Coagulação para o Sulfato de Alumínio e PAC. 25º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2009. **Anais Eletrônicos**: I-071. Recife – PE, Brasil.

DE JULIO, M.; FIORAVANTE, D. A.; GRAHAM, N. J. D. Remoção de cianobactérias de água proveniente de manancial brasileiro eutrofizado, utilizando os diagramas de coagulação para o sulfato de alumínio e PAC. **Engenharia Civil UM**, nº 37, 2010.

DROZD, C.; SCHWARTZBROD, J. Removal of *Cryptosporidium* from river water by cross flow microfiltration: a pilot-scale study. **Water Science and Technology**, v. 35, n.11-12, p. 391-395, 1997.

DUGAN, N.R. et al. Controlling *Cryptosporidium* oocysts using conventional filtration. **Journal of American Water Works Association**, v. 93 p. 64–77, 2001.

ECKMANN, L. Mucosal defences against *Giardia*. **Parasite Immunology**, v. 25, n. 1, p. 259–270, 2003.

EDZWALD, J. K.; KELLEY, M. B. Control *Cryptosporidium*: from reservoirs to clarifiers to filters. **Water Science and Technology**, v. 37, n. 2, p 1-8, 1998.

EDZWALD, J. K. et al. *Giardia* and *Cryptosporidium* removals by clarification and filtration under challenge conditions. **Journal of American Water Works Association**, v. 92, n. 12, p. 70-84, 2000.

EDZWALD, J. K. Dissolved air flotation and me. **Water Research**, v. 44, n.7, p. 2077-2106, 2010.

EMELKO, M. B. Removal of viable and inactivated *Cryptosporidium* by dual- and tri-media filtration. **Water Research**, v. 37, n. 12, p. 2998-3008, 2003.

FARIAS, E.W.C.; GAMBA, R.C.; PELLIZARI, V.H. Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw sewage and creek water in the city of São Paulo, Brazil. **Brazilian J. Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 41-43, 2002.

FAUBERT, G. Immune response to *Giardia duodenalis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 35–54, 2000.

FAYER, R. *Cryptosporidium*: A water-borne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1-2 SPEC.ISS., p. 37–56, 2004.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p.1305-1322, 2000.

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and *Giardiasis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, 2011, ISSN 0893-8512; p. 1098-6618, 2011.

FENG, Y. et al. Occurrence, source, and human infection potential of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in source and tap water in Shanghai, China. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 11, p. 3609–16, 2011.

FERRARI, T. N; DE JULIO, M.; DE JULIO T., S. Emprego do Sulfato de Alumínio e do Cloreto de Polialumínio em estudos de Tratabilidade da Água que abastece o Município de São José dos Campos - Sp. **Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal**, v. 8, n. 4, p. 118-137, 2011.

FERREIRA FILHO, S. S.; WAEKENS, B. E. Aspectos químicos do cloreto de polialumínio como coagulante no tratamento de águas de abastecimento. 25º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. 2009a. **Anais Eletrônicos**: I-073. Recife – PE. Brasil.

FERREIRA FILHO, S. S.; WAEKENS, 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, p. 317–326, 2009b.

FRANCO, R.M.B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n.2, p.109-111, 2001.

FRANCO, R. M. B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. **Revista Panamericana de Infectologia**, v.4, p. 36-43, 2007.

FRANCO, R. M. B.; BRANCO N.; LEAL, D. A. G. Parasitologia ambiental: métodos de concentração e detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n. 2, p. 119-135, 2012.

FRANCY, D. S. et al. Effects of seeding procedures and water quality on recovery of *Cryptosporidium* oocysts from stream water by using U.S. Environmental Protection Agency Method 1623. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 4118–4128, 2004.

FREITAS, A. G. et al. Recirculação de água de lavagem de filtros e perigos associados a protozoários. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 15, n. 1, p. 37–46, 2010.

FRICKER, C. R. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. **Protozoan Parasites and Water, The Royal Society of Chemistry**. p. 91-97, 1995.

FOGLER, H.S. **Elementos de Engenharia das Reações Químicas**. Rio de Janeiro, LTC, 2002.

GARDNER, T. B.; HILL, D. R. Treatment of Giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 1, p. 114–128, 2001.

GASSER, R.B.; O'DONOGHUE, P. Isolation, propagation and characterization of *Cryptosporidium*. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1379-1413, 1999.

GELDREICH, E.E. Creating microbial quality in drinking water. In: Geldreich, E.E. (Ed.), **Microbial Quality of Water Supply in Distribution Systems**, p. 39–101, 1996.

GONÇALVES, E. M. N. et al. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a daycare unit in São Paulo. **Clinics** [online] v. 61, p.119-126, 2006.

GOLDSTEIN, S. T. et al. Cryptosporidiosis: an outbreak associated with drinking water despite state-of-the-art water treatment. **Annals of Internal Medicine Journal**, v. 124, p.459-68, 1996.

GRIMASON, A. M. et al. Application of DAPI and immunofluorescence for enhanced identification of *Cryptosporidium* spp oocysts in water samples. **Water Research**, v. 28, n. 3, p. 733-736, 1994.

GUERDEN, T.; OLSON, M. *Giardia* in pets and farm animals, and their zoonotic potential in humans in: LUJÀN, H. D.; SVÄRD, S. editors, **Giardia: A model Organism**. Springer, 2011.

HASHIMOTO, A.; KUNIKANE, S.; HIRATA, T. Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the drinking water supply in Japan. **Water Research**, v. 36, n. 3, p. 519–526, 2002.

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, p. 3–22, 2006.

HIJNEN, W. A. M. *et al.* GAC adsorption filters as barriers for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water treatment. **Water Research**, v. 44, n. 4, p. 1224-1234, Feb 2010. ISSN 0043-1354.

HIRATA, T.; HASHIMOTO, A. Experimental assessment of the efficacy of microfiltration and ultrafiltration for *Cryptosporidium* removal. **Water Science Technologie**, v. 41, n. 7, p 103-107, 1997.

HSU, B. M.; HUANG, C.; PAN, J. R. Filtration behaviors of *Giardia* and *Cryptosporidium* - Ionic strength and pH effects. **Water Research**, v. 35, n. 16, p. 3777–3782, 2001.

HUCK, P. M. et al. The importance of coagulation for the removal of *Cryptosporidium* and surrogates by filtration. **Chemical Water and Wastewater Treatment VI**. p. 191-200. Springer, 2000.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico, 2008. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

JAKUBOWSKI, W. Control of *Giardia* in water supplies. **Human Parasitic Diseases**, v. 3, p. 335-353, Elsevier, New York, 1990.

JAKUBOWSKI, W.; GRAUN, G. F. Update on the control of *Giardia* in water supplies. In: ***Giardia, the Cosmopolitan Parasite***, p. 217-238. Edited by OLSON, B. E.; OLSON, M. E.; WALLIS, P. M. 2002.

JANUÁRIO, G. F.; FERREIRA FILHO, S. S. Planejamento e aspectos ambientais envolvidos na disposição final de lodos das estações de tratamento de água da Região Metropolitana de São Paulo. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 117–126, 2007.

JIANG, J. Q. The role of coagulation in water treatment. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 8, p. 36–44, 2015.

JIMENEZ, B. et al. Dextran blue colorante as a reliable tracer in submerged filters. **Water Research**, v. 22, n. 10, p. 1253–1257, 1988.

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**, p. 20–24, 2004, Amsterdam, The Netherlands.

KARANIS, P. *Giardia* and *Cryptosporidium*: occurrence in water supplies. **Encyclopedia of Environmental Health**, p. 946–954, 2011.

KEEGAN, A. et al. Effect of water treatment processes on *Cryptosporidium* infectivity. **Water Research**, v. 42, n. 6-7, p. 1805–1811, 2008.

KING, B. J. et al. Environmental temperature controls. **American Society of Heating**, v. 71, n. 7, p. 3848–3857, 2005.

KOHLI, A. et al. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in brazilian children. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 7, p. 718–725, 2008.

KORICH, D. G. et al. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 1423-1428, 1990.

KORKES, F. et al. Relationship between intestinal parasitic infection in children and soil contamination in urban slum. **Journal of Tropical Pediatrics**, v.55, n.1, p. 42-45, 2008.

KUCZYNSKA, E.; SHELTON, D. R. Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.7, p. 2820-2826, 1999.

KULKARNI, P. et al. Gravity settling characteristics of *Cryptosporidium parvum* oocysts in aqueous suspension using in situ static light scattering. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 233, n. 1-3, p. 1–10, 2004.

LE CHEVALLIER, M. W.; NORTON, W. D.; LEE, R. G. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 9, p. 2610–2616, 1991.

LEITCH, G. J.; HE, Q. Cryptosporidiosis-an overview. **Journal of Biomedical Research**, v. 25, n. 1, p. 1–16, 2011.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das Reações Químicas**. São Paulo: Blucher, 2000.

LEVY, G. J.; SHAINBERG, I.; ALPEROVITCH, N.; MERWE, A. J. VAN DER. Effect of Na-hexametaphosphate on the hydraulic conductivity of kaolinite-sand mixtures. **Clays and Clay Minerals**, v. 39, n. 2, p. 131–136, 1991.

LIBÂNIO, M. **Fundamentos de Qualidade e Tratamento de Água**. Ed. Átomo. Belo Horizonte-MG, 2008.

LINDQUIST, H. D. Criteria for evaluation of proposed protozoan detection methods. **Journal of Microbiological Methods**, v. 37, n. 1, p. 33-43, 1999.

LOPES, F. M. F. et al. Comparação da flotação por ar dissolvido e sedimentação no tratamento de água utilizando policloreto de alumínio. 25º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2009. **Anais Eletrônicos**: I-111. Recife – PE, Brasil.

MACKENZIE, W. R. et al. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water-supply. **New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 3, p. 161-167, Jul 1994.

MANSER, M. et al. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in clinical laboratories in Europe — a comparative study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 1, p. O65–O71, 2014.

MARQUEZ, A. D. et al. Remoção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia lamblia* em águas de abastecimento. 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2005. **Anais Eletrônicos**: I-137. Campo Grande – MS, Brasil.

McCUIN, R. M. et al. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from source water concentrates using immunomagnetic separation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 45, n. 2, p. 69-76, 2001.

McCUIN, R. M.; CLANCY, J. L. Methods for the recovery, isolation and detection of *Cryptosporidium* oocysts in wastewaters. **Journal of Microbiological Methods**, v. 63, n. 1, p. 73–88, 2005.

MEDEIROS, R. C. **Avaliação da remoção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em processos de tratamento de esgoto sanitário.** Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013.

MUHSEN, K.; LEVINE, M. M. A systematic review and meta-analysis of the association between *Giardia lamblia* and endemic pediatric diarrhea in developing countries. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. SUPPL. 4, 2012.

MØRCH, K. *et al.* Severity of *Giardia* infection associated with postinfectious fatigue and abdominal symptoms two years after. **BMC Infectious Diseases**, v. 9, p. 206, 2009.

NIEMINSKI, E. C.; ONGERTH, J. E. Removing *Giardia* and *Cryptosporidium* by conventional treatment and direct filtration. **American Water Works Association**, v. 87, n.9, p. 96, 1995.

OKHUYSEN, P. C. et al. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 4, p. 1275–1281, 1999.

ONGERTH, J. E.; STIBBS, H. H.; Identification of *Cryptosporidium* oocysts in river water. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, p. 672-676, 1987.

ONGERTH, J. E.; HUTTON, P. E. Testing of diatomaceous earth filtration for removal of *Cryptosporidium* oocysts. **Journal of the American Water Works Association**, v. 93, n. 12, p. 54-63, 2001.

ONGERTH, J. E. The concentration of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water - the role and importance of recovery efficiency. **Water Research**, v. 47, n. 7, p. 2479–2488, 2013.

ORLOFSKY, E. et al. Simultaneous detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* (oo)cysts in soil using immunomagnetic separation and direct fluorescent antibody staining. **Journal of Microbiological Methods**, v. 94, n. 3, p. 375–377, 2013.

ORTEGA-PIERRES, G. et al. New tools provide further insights into *Giardia* and *Cryptosporidium* biology. **Trends in Parasitology**, v.25, n.9. p. 410-416, 2009.

OTTOSON, J. et al. Removal of viruses , parasitic protozoa and microbial indicators in conventional and membrane processes in a wastewater pilot plant. **Water Research**, v. 40, p. 1449–1457, 2006.

PAPINEAU, I. et al. Impact of media aging on the removal of *Cryptosporidium* in granular media filters. **Journal of Environmental Engineering**, v. 139, n. 5, p. 603-611, May 2013. ISSN 0733-9372.

PARSEKIAN, M. P. S. **Análise e proposta de formas de gerenciamento de estações de tratamento de águas de abastecimento completo em cidades de porte médio do estado de São Paulo**. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo – EESC/USP. Brasil, 1998.

PAVANELLI, G. **Eficiência de Diferentes Tipos de Coagulantes na Coagulação, Floculação e Sedimentação de Água com Cor ou Turbidez Elevada**. Dissertação (mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo - EESC/USP. Brasil, 2001.

PEGORARO, P. R. **Distribuição do tempo de residência e letalidade no processamento térmico contínuo de líquidos com escoamento laminar não ideal em trocadores bitubulares**. Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo – USP. Brasil, 2012.

RAO, M. A.; LONCIN, M. Residence time distribution and its role in continuous pasteurization (Part II). **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie**, v. 7, p. 14-17, 1974.

RAZZOLINI, M.; DA SILVA SANTOS, T.; BASTOS, V. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* cysts/oocysts in watersheds and drinking water sources in Brazil urban areas. **Journal of Water and Health**, v. 8, n. 2, p. 399-404, 2010.

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.

REIS, E. L. T. et al. **Impacto ambiental dos resíduos gerados em sistemas de tratamento de água no rio Ribeira de Iguape, São Paulo, Brasil**. Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia em Resíduos e Desenvolvimento Sustentável. Florianópolis – SC. Brasil, 2004.

RENDTORFF, R.C. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, p. 209–220, 1954.

RICHTER, C. A. **Água: Métodos e Tecnologias de Tratamento**. São Paulo: Blucher, 2009.

ROBERTSON, L. J. *Giardia duodenalis*. Second Edition ed.Elsevier, 2014.

ROSE, J. B. Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications. **Annual Review of Public Health** v. 18, p. 135-161, 1997.

ROSE, J. B.; HUFFMAN, D. E.; GENNACCARO, A. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 113–123, 2002.

RYAN, U.; CACCIÒ, S. M. Zoonotic potential of *Giardia*. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 12-13, p. 943–956, 2013.

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

SANTOS, G. R. **Estudo de clarificação de água de abastecimento público e otimização da estação de tratamento de água**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ. Brasil, 2011.

SANTOS, L.U. **Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em uma Estação de Tratamento de Esgoto: avaliação das eficiências do processo de lodo ativado na remoção e de desinfecção por luz ultravioleta na inativação desses patógenos.**132p. Tese (Doutorado). Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas – Unicamp – SP, 2007.

SANTOS, S. A. DOS; MERLINI, L. S. Prevalência de enteroparasitoses na população do município de Maria Helena, Paraná. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 3, p. 899–905, 2010.

SATO, M. I. Z. et al. Assessing the infection risk of *Giardia* and *Cryptosporidium* in public drinking water delivered by surface water systems in Sao Paulo State, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 442, p. 389-396, Jan 2013. ISSN 0048-9697.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “Neglected Diseases Initiative”. **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 203-208, 2006.

SCALIZE, P. S.; DI BERNARDO, L. Caracterização da água de lavagem de filtros rápidos de estações de tratamento de água e dos sobrenadantes e sedimentos obtidos após ensaios de clarificação utilizando polímero aniônico. In: 27º Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2000. **Anais eletrônicos**: II-023. Porto Alegre, RS, Brasil.

SCHUSTER, C. J. et al. Infectious disease outbreaks related to drinking water in Canada. **Canadian Journal of Public Health**, v. 96, p. 254–258, 2005.

SILVA, C. F. **Remoção de oocistos e de indicadores físicos de *Cryptosporidium parvum* em águas de abastecimento por meio as decantação em escala piloto.** Dissertação de mestrado Escola de Engenharia- Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

SILVA, R. R. et al. Association between nutritional status, environmental and socio-economic factors and *Giardia lamblia* infections among children aged 6-71 months in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.103, p. 512-519, 2009.

SMITH, H. V.; GRIMASON, A. M. *Giardia* and *Cryptosporidium* in water and wastewater in: MARA, D.; HORAN, N. **The Handbook of Water and Wastewater Microbiology**, 2003. ISBN 0-12-470100-0.

SMITH, H.V. et al. Tools for investigation the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends in Parasitology**, v. 22: p. 160-167, 2006.

STATES, S.; TOMKO, R. J. Enhanced coagulation and removal of *Cryptosporidium*. **Journal American Water Works Association**, v. 94, n. 11, p. 67-77, Nov 2002. ISSN 0003-150X.

SOUZA, F. G. C. **Ocorrência de sólidos e metais na água tratada e nos resíduos gerados em ETA convencional de ciclo completo com descargas diárias** Tese (doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo – EESC/USP. Brasil, 2004.

SOUZA FILHO, A. G.; DI BERNARDO, L. Caracterização e clarificação da água de lavagem dos filtros de uma ETA que utiliza cloreto férrico como coagulante primário. In: 20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1999. **Anais eletrônicos**: I-058. Rio de Janeiro - RJ, Brasil.

TEIXEIRA, J. C.; HELLER, L.; BARRETO, M. L. *Giardia duodenalis*: fatores de risco para crianças residentes em áreas de assentamento subnormal no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 6, p. 1489-1493, 2007.

THOMPSON, R. C. A. Giardiasis: Modern concepts in control and management. **Annales Nestlé**, v. 66, n. 1, p. 23-29, 2008.

TOLEDO, D. A. Redução de produtos químicos na clarificação de água para consumo humano. In: 35ª Semana Nacional da Associação dos Serviços Municipais de Saneamento – ASSEMAE, 2005. Belo Horizonte-MG, Brasil.

TONETTI, A. L. et al. Estudo hidrodinâmico de reatores utilizando-se a análise de fluxo. **Revista DAE**. Ed. 187, DOI: 10.4322/dae.2014.079, 2011

TOZE, S. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. **Water Research**, v. 33, n. 17, p. 3545–3556, 1999.

TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: Biology, pathogenesis and disease. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 10, p. 1047–1058, 2002.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Filter Backwash Recycling Rule Technical Guidance Manual**. EPA/816-R-02-014. December 2002.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Method 1623.1 *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA**. Office of Water (MS-140) EPA 816 -R-12-001. January 2012.

VESEY, G. et al. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, n. 1, p. 82-86, 1993.

WEBER, P; TORRES, T.L. Estudo para caracterização quantitativa e qualitativa lodo de estação de tratamento de água. In: 24º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2007. **Anais eletrônicos**: I-092. Belo Horizonte, MG, Brasil.

WHO World Health Organization. **Guidelines for Drinking-Water Quality** - 4th ed. 2011.

WIDMER, G. et al. Structural and biochemical alterations in *Giardia lamblia* cysts exposed to ozone. **The Journal of Parasitology**, v. 88, n. 6, p. 1100–1106, 2002.

WILLIS, J. E. et al. Global occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in shell fish : should Canada take a closer look? **FRIN**, v. 52, n. 1, p. 119–135, 2013.

XAGORARAKI, I. et al. Removal of emerging waterborne pathogens and pathogen indicators by pilot-scale conventional treatment. **Journal of the American Water Works Association**, v. 96, n. 5, p. 102-113, 2004.

YAKUB, G. P.; STANDTERMAN-KNAUER, K. L. Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* from high-iron matrices. **Applied Environmental Microbiology** v. 66, p. 3628-3631, 2000.

ZILBERMAN, A. et al. Two-phase separation method for recovery of *Cryptosporidium* oocysts from soil samples. **Water, Air, and Soil Pollution**, p. 1–10, 2009.

ANEXOS

ANOVA para 1 fator: Método 15 C; Método 19 C; Método 20 C

Método

Hipótese nula Todas as médias são iguais
Hipótese alternativa No mínimo uma média é diferente
Nível de significância $\alpha = 0,05$

Assumiu-se igualdade de variâncias para a análise

Informações dos Fatores

Fator Níveis Valores
Fator 3 Método 15 C; Método 19 C; Método 20 C

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Fator	2	868,6	434,3	1,34	0,329
Erro	6	1938,4	323,1		
Total	8	2807,0			

Sumário do Modelo

S	R2	R2 (aj)	R2 (pred)
17,9740	30,94%	7,93%	0,00%

Médias

Fator	N	Média	DesvPad	IC de 95%
Método 15 C	3	60,21	15,75	(34,82; 85,60)
Método 19 C	3	41,2	17,8	(15,8; 66,6)
Método 20 C	3	37,9	20,1	(12,5; 63,3)

DesvPad Combinado = 17,9740

Comparações Emparelhadas de Tukey

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 95%

Fator	N	Média	Agrupamento
Método 15 C	3	60,21	A
Método 19 C	3	41,2	A
Método 20 C	3	37,9	A

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Testes Simultâneos de Tukey para as Diferenças de Médias

Valor-P	Diferença de Níveis Ajustado	Diferença de Médias	EP da Diferença	IC de 95%	Valor T
	Método 19 C - Método 15 C	-19,0	14,7	(-64,1; 26,0)	-1,30
					0,447

Método 20 C - Método 15 C	-22,3	14,7	(-67,3; 22,8)	-1,52
0,348				
Método 20 C - Método 19 C	-3,2	14,7	(-48,3; 41,8)	-0,22
0,974				

Nível de confiança individual = 97,80%

ANOVA para 1 fator: Método 15 G; Método 19 G; Método 20 G

Método

Hipótese nula	Todas as médias são iguais
Hipótese alternativa	No mínimo uma média é diferente
Nível de significância	$\alpha = 0,05$

Assumiu-se igualdade de variâncias para a análise

Informações dos Fatores

Fator	Níveis	Valores
Fator	3	Método 15 G; Método 19 G; Método 20 G

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Fator	2	1813,6	906,78	22,77	0,002
Erro	6	239,0	39,83		
Total	8	2052,6			

Sumário do Modelo

S	R2	R2 (aj)	R2 (pred)
6,31127	88,36%	84,48%	73,80%

Médias

Fator	N	Média	DesvPad	IC de 95%
Método 15 G	3	46,09	2,32	(37,18; 55,01)
Método 19 G	3	11,47	9,81	(2,55; 20,39)
Método 20 G	3	26,01	4,24	(17,09; 34,92)

DesvPad Combinado = 6,31127

Comparações Emparelhadas de Tukey

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 95%

Fator	N	Média	Agrupamento
Método 15 G	3	46,09	A
Método 20 G	3	26,01	B
Método 19 G	3	11,47	B

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Testes Simultâneos de Tukey para as Diferenças de Médias

Valor-P	Diferença	EP da

Diferença de Níveis Ajustado	de Médias	Diferença	IC de 95%	Valor T
Método 19 G - Método 15 G 0,001	-34,62	5,15	(-50,44; -18,81)	-6,72
Método 20 G - Método 15 G 0,019	-20,09	5,15	(-35,90; -4,27)	-3,90
Método 20 G - Método 19 G 0,068	14,54	5,15	(-1,28; 30,35)	2,82

Nível de confiança individual = 97,80%

APÊNDICES

APÊNDICE A - Métodos e equipamentos empregados na caracterização da água do poço e de estudo

Análise	Variável	Métodos e equipamentos		
Análises rotineiras (LATAR)	Alcalinidade total	Titulação potenciométrica com ácido sulfúrico até pH 4,30 (Método 2320B)		
	Condutividade	Condutivímetro DM-32		
	Cor aparente (455nm)	Espectofotômetro DR-2800		
	Dureza	Titulação		
	pH	Eletrodo Digimed® acoplado ao pHmetro Qualxtron e eletrodo Orion 8102BNUWP conectado ao pHmetro Digimed® (Método potenciométrico)		
		Zetasizer Nano – ZS90		
	Potencial zeta (pZ)	Termômetro de mercúrio		
	Temperatura	Turbidímetro Hach-2100N		
Análises esporádicas (Laboratório de Saneamento)	Alumínio	Método 3111 D	Fast sequencial Atomic absorption - AA 240 FS	
	Cálcio			
	Cádmio	Método 3111 B		
	Chumbo			
	Ferro			
	Magnésio			
	Manganês			
	Mercúrio	Método 3112 B		
	Coliformes totais	Método 2923 B		
	<i>Escherichia coli</i>	Colilert®		
	Dureza	Método 2340 C	Titulação	
	Nitrogênio (nitrato)	Método 4500	Espectofotômetro UV visível	
		NO ₃ ⁻ B		
Nitrogênio (nitrito)	Método 4500	UV visível		
	NO ₂ ⁻ B			

APÊNDICE B - Marcas dos demais equipamentos utilizados na pesquisa

Equipamento	Marca
Bomba de vácuo	Millipore® vácuo-pressão modelo WP61 115 60
Centrífuga	<i>Eppendorf® Centrifuge 5810</i>
Estufa	FANEM® modelo 320-SE
Jarteste	Ethik Technology modelo 218-GLDB
Microscópio	Olympus® BX51
Mufla	EDG
Sonda de condutividade	Go!link
Vórtex	Marconi modelo 162

APÊNDICE C – Características das cepas

Cepas	Características
Waterborne - <i>Giardia lamblia</i>	P101 do lote # 140113 H3
Waterborne - <i>Cryptosporidium parvum</i>	P102 do lote número 4-14