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

HUGO GUILHERME SILVA

Avaliação e tratamento de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. presentes na água de lavagem dos filtros e no resíduo flotado gerados pela tecnologia de ciclo completo com flotação por ar dissolvido

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2018

HUGO GUILHERME SILVA

Avaliação e tratamento de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. presentes na água de lavagem dos filtros e no resíduo flotado gerados pela tecnologia de ciclo completo com flotação por ar dissolvido

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 Patrícia Sabogal Paz

São Carlos
2018

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

S895 Silva, Hugo Guilherme
Avaliação e tratamento de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. presentes na água de lavagem dos filtros e no residuo flotado gerados pela tecnologia de ciclo completo com flotação por ar dissolvido / Hugo Guilherme Silva; orientadora Lyda Patrícia Sabogal Paz. São Carlos, 2018.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2018.

1. *Giardia* spp.. 2. *Cryptosporidium* spp.. 3. ozônio. 4. óxido de cálcio. 5. cloreto de polialumínio. 6. separação imunomagnética . I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **HUGO GUILHERME SILVA**.

Título da dissertação: "Avaliação e tratamento de Oocistos de *Cryptosporidium* SPP. e Cistos de *Giardia* SPP. presentes na água de lavagem dos filtros e no resíduos flotado gerados pela tecnologia de ciclo completo com flotação por ar dissolvido".

Data da defesa: 16/03/2018.

Comissão Julgadora:

Resultado:

Profa. Dra. **Lyda Patricia Sabogal Paz**
(Orientadora)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovado

Profa. Dra. **Cali Laguna Achon**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

APROVADO

Prof. Dr. **Raphael Corrêa Medeiros**
(Universidade Federal de Santa Maria/UFSM)

Aprovado

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:
Prof. Dr. **Eduardo Mario Mendiando**

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus Pai, pelo seu amor, pela minha saúde, fé consciente, alegrias e seus ensinamentos;

Ao meu anjo da guarda, que me rege, me protege, me ajuda e está sempre comigo como se fosse meu irmão mais velho;

A minha namorada, Bruna, que é companheira para todos os momentos e que brevemente será minha esposa;

Aos meus pais Célio e Hélia;

Ao meu irmão Vinícius;

A minha orientadora, pela qual tenho muito respeito e carinho, professora Lyda;

Aos colegas do Latar, em especial ao Allan, Paulão, Fissa, Fernando, Brunão, Bárbara, Ulisses, Kamila e a Maria Teresa;

Aos amigos dessa jornada;

Aos amigos de Uberlândia;

Aos meus familiares;

Aos membros da banca;

A CAPES pela bolsa;

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

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

“Seja a mudança que você quer ver no mundo”.

Mahatma Gandhi

RESUMO

SILVA, H. G. (2018). Avaliação e tratamento de oocistos de *Cryptosporidium spp.* e cistos de *Giardia spp.* presentes na água de lavagem dos filtros e no resíduo flotado gerados pela tecnologia de ciclo completo com flotação por ar dissolvido. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

O presente trabalho avaliou o uso e a detecção de óxido de cálcio e ozônio para a inativação de cistos de *Giardia spp.* e oocistos de *Cryptosporidium parvum* presentes nos resíduos e na água de lavagem dos filtros gerados após a utilização da tecnologia de ciclo completo com flotação por ar dissolvido (coagulação, floculação, flotação e filtração) em escala de bancada, usando o cloreto de polialumínio – PAC como coagulante. Para os ensaios analíticos de recuperação dos protozoários e validação do método foram utilizados as suspensões e o *Easyseed*® nas matrizes ALF e resíduos. A quantificação dos protozoários foi realizada pelo método de centrifugação direta com a adição de solução de dispersão detergente ICN 7X (MP BIO®) a 1,0% na amostra com a etapa de separação imunomagnética – IMS. As recuperações nos ensaios de qualidade utilizando as suspensões de protozoários foram de 19,86 % $\pm$ 16,29 e 43,95% $\pm$ 11,21, para oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* respectivamente na matriz ALF, enquanto que para a matriz resíduo foram de 8,16 % $\pm$ 30,24 para *Cryptosporidium* e 32,54 % $\pm$ 46,48 para *Giardia*. Para os ensaios de recuperação empregando o *Easyseed*® os valores da matriz ALF foram 2,25% $\pm$ 1,37 para *Cryptosporidium* e 3,75% $\pm$ 2,25 para *Giardia*. No resíduo, a recuperação foi de 4,5% $\pm$ 1,50 para *Cryptosporidium* e 49% $\pm$ 1 para *Giardia*. Para os ensaios com óxido de cálcio na matriz resíduo, a primeira condição com dosagem de 23 mg cal/100mL no tempo de contato de 3 dias a 25°C, não foram encontrados protozoário positivo para o teste IP (iodeto de propídeo), o que deixa esta condição satisfatória. Na segunda condição, com dosagem de 16 mg cal/100mL e tempo de contato de 3 dias a 25°C, foram encontrados protozoários negativos para IP. Para as condições de desinfecção, utilizando ozônio, com tempos de contato 5 min e 10 min e dosagens de 10 mg O₃.L⁻¹ e 7,5 mg O₃.L⁻¹, respectivamente, poucos organismos foram detectados. Portanto, destaca-se a dificuldade em avaliar a permeabilidade dos protozoários após os ensaios de desinfecção realizados. Faz-se necessário realizar novos ensaios com outras dosagens e tempos de contato.

Palavras-chave: *Giardia spp.*; *Cryptosporidium spp.*; ozônio; óxido de cálcio; cloreto de polialumínio; separação imunomagnética

ABSTRACT

SILVA, H.G. (2018). Evaluation and treatment of oocysts of *Cryptosporidium* spp. and cysts of *Giardia* spp. present in the wash water of the filters and in the float residue generated by the complete cycle technology with flotation by dissolved air. Dissertation (Master). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

The present work evaluated the use of calcium oxide and ozone for the inactivation of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium parvum* oocysts present in the wastes and in the wash water of the filters obtained after the use of the complete cycle technology with dissolved air flotation (coagulation, flocculation, flotation and filtration) on a bench scale using polyaluminium chloride - PAC as a coagulant. For the analytical tests of protozoan recovery and validation of the method, suspensions and Easyseed® were used in the ALF and residues matrices. Protozoan quantification was performed by the direct centrifugation method with the addition of detergent dispersion solution ICN 7X (MP BIO ®) at 1.0% in the sample with the immunomagnetic separation step - IMS. The recoveries in the quality assays using the protozoal suspensions were $19.86\% \pm 16.29$ and $43.95\% \pm 11.21$ for *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts respectively in the ALF matrix, whereas for the residue matrix were $8.16\% \pm 30.24$ for *Cryptosporidium* and 32.54 ± 46.48 for *Giardia*. For the recovery assays using Easyseed® the ALF matrix values were $2.25\% \pm 1.37$ for *Cryptosporidium* and $3.75\% \pm 2.25$ for *Giardia*. In the residue, recovery was $4.5\% \pm 1.50$ for *Cryptosporidium* and $49\% \pm 1$ for *Giardia*. For the calcium oxide assays in the residue matrix, the first condition with a dosage of 23 mg cal / 100mL at the contact time of 3 days at 25°C, no positive protozoan was found for the IP (propidium iodide) test, which leaves is a satisfactory condition. In the second condition with a dosage of 16 mg cal / 100mL and contact time of 3 days at 25°C, negative protozoa were found for IP. For the disinfection conditions using ozone with contact times 5 min and 10 min and dosages of $10 \text{ mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ and $7.5 \text{ mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, few organisms were detected. Therefore, the difficulty in evaluating the permeability of protozoa after the disinfection tests carried out. Realization of new tests with other dosages and contact times.

Keywords: *Giardia* spp.; *Cryptosporidium* spp.; ozone; calcium oxide; polyaluminium chloride; immunomagnetic separation

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características gerais de diferentes espécies de <i>Giardia</i> em relação ao genótipo, hospedeiros principais, tamanho dos cistos e pesquisadores que descobriram as espécies.	28
Tabela 2: Características gerais de diferentes espécies de <i>Cryptosporidium</i> em relação ao genótipo, hospedeiros principais, tamanho dos cistos e pesquisadores que descobriram as espécies.....	29
Tabela 3: Descrição da coleta da água tratada após os ensaios em floteste	47
Tabela 4: Dosagens de reagentes após diversos ensaios para resíduo flotado e ALF no método de FCC.....	50
Tabela 5: Parâmetros e valores utilizados para a calibração do ozonizador (Vieira, 2016).....	60
Tabela 6: Produção de ozônio obtida através da tensão do ozonizador e da vazão aplicada no aparelho (SLOMPO, 2017).....	61
Tabela 7: Parâmetros de tratabilidade da água de estudo, obtidos em ensaios de bancada no equipamento floteste (condições ótimas)	66
Tabela 8: Características físicas, químicas e biológicas da água de estudo, água clarificada, água de lavagem dos filtros, água filtrada e do resíduo flotado, obtidas no floteste.....	67
Tabela 9: Contagem de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp. nas suspensões para o método FCC	69
Tabela 10: Contagem de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp. nas suspensões para os métodos de centrifugação direta e centrifugação direta com ICN 7X	70
Tabela 11: Porcentagem de recuperação de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp. para diferentes métodos e porcentagem de parasitos permeáveis positivos para IP, obtidas após os ensaios de concentração para a matriz de ALF	71
Tabela 12: Número de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp. nas suspensões para os ensaios de qualidade analítica utilizando a matriz ALF.....	74
Tabela 13: Número de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp. nas suspensões para os ensaios de qualidade analítica utilizando a matriz resíduo flotado	75
Tabela 14: Recuperação média de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp. do ensaio de qualidade analítica do método utilizando as suspensões com as matrizes ALF e resíduo flotado e os respectivos desvios padrão e coeficiente de variação (resultados em triplicata).....	75
Tabela 15: Porcentagem de recuperação de (oo)cistos por dissociação ácida nos ensaios de qualidade analítica utilizando as suspensões, para as matrizes ALF e resíduo flotado.....	76

Tabela 16: Viabilidade estimada em função da permeabilidade da membrana dos parasitos após aplicar o protocolo (resultados em triplicata), para as matrizes ALF e resíduo flotado ..	76
Tabela 17: Recuperação média de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp. do ensaio de qualidade analítica do método utilizando EasySeed® com as matrizes ALF e resíduo flotado e os respectivos desvios padrão e coeficiente de variação	77
Tabela 18: Porcentagem de recuperação de (oo)cistos por dissociação ácida nos ensaios de qualidade analítica utilizando EasySeed®, para as matrizes ALF e resíduo flotado	78
Tabela 19: Número de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp. nas suspensões (contagem utilizada nos tratamentos com 23 mg de cal/100 mL de resíduo flotado, com tempo de contato de 3 dias)	88
Tabela 20: Número oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp. nas suspensões (contagem utilizada nos tratamentos com 16 mg de cal/100 mL de resíduo flotado e tempo de contato de 3 dias).....	88
Tabela 21: Porcentagem média de recuperação oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp. após tratamento alcalino dos resíduos flotados e respectivos desvios padrão e coeficiente de variação	90
Tabela 22: Porcentagem de recuperação de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp., por dissociação ácida após tratamento alcalino dos resíduos flotados.....	90
Tabela 23: Porecentagem de parasitos negativos para IP de oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp., após tratamento alcalino dos resíduos flotados e respectivos desvios padrão e coeficiente de variação.....	91
Tabela 24: Inativação em log de <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp. em relação às dosagens de 16 e 23 mg cal/100mL ⁻¹ , no tempo de contato de 5 dias, para o resíduo flotado.	91
Tabela 25: Número de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp. nas suspensões para o tratamento com ozônio da primeira condição (tempo de contato 5 min dosagem 10 mg O ₃ .L ⁻¹).....	96
Tabela 26: Número de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp. nas suspensões para o tratamento com ozônio da segunda condição (tempo de contato 5 min dosagem 10 mg O ₃ .L ⁻¹).....	96
Tabela 27: Concentrações de ozônio aplicado, ozônio do off-gas, ozônio residual dissolvido, ozônio consumido e eficiências na transferência de massa de ozônio para as dosagens de 7,5 e 10 mgO ₃ L ⁻¹ e os tempos de contato de 10 e 5 min, respectivamente	97

Tabela 28: Inativação em log de <i>Giardia muris.</i> e <i>Cryptosporidium spp.</i> em relação às dosagens de 7,5 e 10 mgO ₃ L ⁻¹ , quando os tempos de contato eram 10 e 5 min, respectivamente	97
Tabela 29: Porcentagem média de recuperação de oocistos de <i>Cryptosporidium spp.</i> e cistos de <i>Giardia spp.</i> após tratamento por ozônio da matriz ALF e respectivos desvios padrão	98
Tabela 30: Porcentagem de recuperação de oocistos de <i>Cryptosporidium spp.</i> e cistos de <i>Giardia spp.</i> por dissociação ácida após tratamento por ozônio da matriz ALF	98
Tabela 31: Porcentagem de parasitos negativos para IP de oocisto de <i>Cryptosporidium spp.</i> e cistos de <i>Giardia spp.</i> , após tratamento com ozônio da matriz ALF e respectivos desvios padrão e coeficiente de variação.....	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Floteste	39
Figura 2: Bombona de armazenamento da água de estudo	44
Figura 3: Filtros de areia.....	45
Figura 4: Lodo flotado.....	46
Figura 5: Amostra de ALF no béquer e em tubos Falcon	48
Figura 6: Esquema simplificado do protocolo de FCC (ANDREOLI, 2016)	49
Figura 7: Foto do kit Dynabeads® Life Technologies™. Produtos pertencentes ao kit. Da esquerda para a direita: Solução tampão SL-A 10X; Solução tampão SL-B 10X; Dynabeads® anti-Giardia e Dynabeads® anti-Cryptosporidium. Fonte: Boni (2016).....	51
Figura 8: Produtos pertencentes ao Kit Merifluor®. Da esquerda para a direita: Solução tampão concentrada 20 x; Reagente de detecção; Contra corante e meio de montagem. Fonte: Boni (2016).....	53
Figura 9: Visualização de cistos de Giardia spp. com aumento de 40x por meio dos filtros: a) FITC; b) DIC; c) WG Para IP; e d) DAPI	54
Figura 10: Ensaio de recuperação das suspensões na matriz ALF	56
Figura 11: Produção de ozônio ($\text{gO}_3.\text{h}^{-1}$) obtida através da regulação da vazão de ozônio ($\text{L}.\text{min}^{-1}$) e tensão adotada (%) (SLOMPO, 2017)	61
Figura 12: Ozonizador. A) coluna em acrílico e B) Gerador de ozônio.....	63
Figura 13: Cistos e oocistos visualizados nos poços ao avaliar a ALF do floteste. Organismos-alvo indicados por setas.....	72
Figura 14: Oocistos de Cryptosporidium spp. visualizado após a primeira dissociação ácida na matriz ALF. Ensaio com EasySeed®. Imagens em 400x a) DAPI; b)FITC; c) IP; d) DIC	80
Figura 15: Oocistos de Cryptosporidium spp. visualizado após a segunda dissociação ácida na matriz ALF. Ensaio com EasySeed®. Imagens em 400x: a) DAPI; b)FITC; c) IP; d) DIC ...	81
Figura 16: Cisto de Giardia spp. visualizado após a segunda dissociação ácida na matriz ALF. Ensaio com EasySeed®. Imagens em 400x: a) DAPI; b)FITC; c) IP; d) DIC.....	82
Figura 17: Oocistos de Cryptosporidium spp. visualizado após a primeira dissociação ácida na matriz resíduo. Ensaio com EasySeed®. Imagens em 400x: a) DAPI; b)FITC; c) IP; d) DIC	83
Figura 18: Cistos de Giardia spp. visualizados após a primeira dissociação ácida na matriz resíduo. Ensaio com EasySeed®. Imagens em 400x: a) DAPI; b)FITC; c) IP; d) DIC	84

Figura 19: Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. visualizado após a segunda dissociação ácida na matriz resíduo. Ensaio com EasySeed®. Imagens em 400x: a) DAPI; b) FITC; c) IP; d) DIC	85
Figura 20: Cistos de <i>Giardia</i> spp. visualizados após a segunda dissociação ácida na matriz resíduo. Ensaio com EasySeed®. Imagens em 400x: a) DAPI; b) FITC; c) IP; d) DIC	86
Figura 21: Tratamento alcalino com dosagem de 23 mg/100mL de resíduo flotado, temperatura de 25°C e tempo de contato de 7 dias: a) Amostras de resíduo flotado após o tratamento (amostras totalmente secas indicadas com setas); b) Resíduo flotado totalmente seco	89
Figura 22: Imagens de microscopia em i) DAPI, ii) FITC, iii) IP e iv) DIC após o tratamento do resíduo flotado	94
Figura 23: Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp. visualizado após a primeira dissociação ácida na matriz ALF, obtido no ensaio de desinfecção com ozônio. Imagens em 400x: a) DAPI; b) FITC; c) IP; d) DIC	100
Figura 24: As setas vermelhas indicam a <i>Giardia</i> spp. e as setas amarelas a <i>Giardia</i> Muris. Imagens em 400x: a) DAPI; b) FITC; c) IP; d) DIC	104

LISTA DE ABREVIATURAS

ALF– Água de lavagem dos filtros
APHA – Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater
COT – Carbono orgânico total
CV – Coeficiente de variação (desvio padrão relativo)
DAPI – 4',6-diamino-2fenil-indol
DIC - Contraste interferencial diferencial
EESC – Escola de Engenharia de São Carlos
ETA – Estação de Tratamento de Água
FAD – Flotação por Ar Dissolvido
FITC – Isotiocianato de fluoresceína
FCCa – Floculação em carbonato de cálcio
FLA – Filtro de Laboratório de Areia
FM – Fator de multiplicação
HBSS - Hanks' Balanced Salt Solution
IMS – Separação imunomagnética
IP – Iodeto de propídeo
LATAR – Laboratório de Tratamento Avançado e Reúso de Água
MPC-1 – Concentrador de partículas magnéticas 1
MPC-S – Concentrador de partículas magnéticas 2
OMS - Organização Mundial da Saúde
PAC – Cloreto de polialumínio
PBS – Solução salina de fosfato
PCR – Reação em cadeia de Polimerase
SHS – Departamento de Hidráulica e Saneamento
TLP – Tubo de lado plano
THM - Trihalometanos
UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas
USEPA – Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos
USP – Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

CaCl_2 – Cloreto de cálcio

CaCO_3 – Carbonato de cálcio

CaO – Óxido de cálcio

Gml – Gradiente de velocidade de mistura lenta

Gmr – Gradiente de velocidade de mistura rápida

$\log_{10}$ – Logaritmo de base 10

NaHCO_3 – Bicarbonato de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

pH – Potencial hidrogeniônico

Psat – Pressão de saturação

Pt-Co – Unidade de cor

pZ – Potencial zeta

rpm – Rotação por minuto

Tflot – Tempo de flotação

Tml – Tempo de mistura lenta

Tmr – Tempo de mistura rápida

Trec – Taxa de recirculação

uT – Unidade de turbidez (unidade nefelométrica de turbidez)

$^{\circ}\text{C}$ – Graus célsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	24
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo Geral	26
2.2. Objetivos Específicos	26
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1. Microrganismos emergentes.....	27
3.2. Métodos de detecção de (oo) cistos de protozoários em amostras de água e de resíduos.....	30
3.2.1. Amostragem e Concentração	31
3.2.2. Purificação e Separação	32
3.2.3. Avaliação e Identificação	34
3.3. Tecnologia de ciclo completo e as características dos resíduos gerados.....	34
3.3.1. Flotação.....	35
3.3.2. Remoção de (oo) cistos de <i>Giardia</i> e de <i>Cryptosporidium</i> por processos que envolvem o tratamento de água de abastecimento	36
3.3.3. Preocupação Ambiental dos Resíduos de ETA.....	37
3.4. Ensaio de tratabilidade utilizando floteste	38
3.5. Estimativa da permeabilidade de (oo) cistos com corantes vitais	39
3.6. Ozônio na remoção de protozoários	41
3.7. Higienização de resíduos com cal	42
3.8. Análise crítica do tópico revisão bibliográfica	43
4. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1. Preparação da água de estudo.....	44
4.2. Caracterização da água de estudo.....	44
4.3. Ensaio de Tratabilidade	45
4.4. Geração de resíduos nos ensaios de tratabilidade	46
4.5. Descrição da coleta da água tratada após os ensaios em floteste	47
4.6. Descrição da coleta da água de lavagem dos filtros (ALF).....	48
4.7. Concentração da amostra empregando o método de centrifugação	48
4.8. Concentração da amostra empregando o protocolo de FCC	49
4.9. Concentração da amostra usando centrifugação mais o ICN 7X	50
4.10. Purificação por separação imunomagnética (IMS)	51
4.11. Preparo das lâminas com o <i>kit</i> Merifluor® e Aplicação de DAPI e IP.....	52

4.11.1. Identificação de protozoários utilizando microscopia de imunofluorescência.....	53
4.12. Ensaio de qualidade analítica	55
4.12.1. Método de qualidade analítica utilizando suspensões de <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i>	55
4.12.2. Método de qualidade analítica com <i>EasySeed</i> ®	56
4.13. Tratamento dos Resíduos	56
4.14. Tratamento da água de lavagem dos filtros usando ozônio	57
4.14.1. Descrição dos ensaios com o ozonizador	57
4.14.2. Quantificação da produção de ozônio.....	59
4.14.3. Valores usados para calibração do ozonizador	60
4.14.4. Instalação Experimental.....	62
4.14.5. Cálculo do Balanço de Massa do Ozônio	63
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
5.1 Ensaio de tratabilidade e caracterização das matrizes	66
5.2 Seleção do protocolo de detecção de protozoários.....	69
5.3 Ensaio de qualidade analítica do protocolo de detecção utilizando as suspensões	74
5.4 Ensaio de qualidade analítica com <i>EasySeed</i> ®	77
5.5 Tratamento alcalino no resíduo flotado	87
5.6 Tratamento da ALF com ozonização	95
5.7 Comparação entre as espécies de <i>Giardia spp.</i> e <i>Giardia muris</i>	103
5.8 Análise crítica do tópico resultados e discussão.....	105
6. CONCLUSÕES	106
7. RECOMENDAÇÕES	107
8. BIBLIOGRAFIA	108

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O lançamento de efluentes (domésticos ou industriais) sem tratamento adequado e a presença de resíduos sólidos, entre outros fatores, contribuem para a alteração da qualidade das fontes de abastecimento de água. O principal problema associado a essas ações são as doenças.

Mesmo com os avanços tecnológicos no tratamento de água, casos de doenças de vinculação hídrica ainda continuam presentes, independentemente da condição socioeconômica do país. De acordo com Carvalho (2009), uma das causas que impossibilita nos países em desenvolvimento o crescimento socioeconômico são as doenças relacionadas à água, entre elas a criptosporidíase e a giardíase, as quais são causadas por protozoários.

Franco (2006) descreveu que as doenças de vinculação hídrica, principalmente as relacionadas aos protozoários, são um grande problema de Saúde Pública. No caso do Brasil, Heller et al. (2004), indicou que o conhecimento sobre os riscos relacionados à presença de protozoários ainda é baixo.

A Portaria de Consolidação nº 5 (2017) estabelece a necessidade de monitoramento de cistos de *Giardia spp.* e oocistos de *Cryptosporidium spp.* quando a média geométrica anual de *Escherichia coli* for superior ou igual a 1000 unidades/100mL na captação. Para determinar a presença desses microrganismos, equipamentos e técnicas sofisticadas são necessárias, as quais, devido aos altos custos, acabam não sendo implantadas pelos laboratórios nas empresas de saneamento.

Os métodos de detecção de (oo)cistos são complexos, por isso requerem técnicas especializadas, reagentes e equipamentos específicos de alto custo. As análises são também dependentes de insumos importados e padrões estrangeiros.

No tratamento convencional é comum a utilização de cloro na etapa de desinfecção, contudo, os cistos de *Giardia spp.* e oocistos de *Cryptosporidium spp.* apresentam resistência a esse tratamento. Esses microrganismos, devido ao seu reduzido tamanho, podem não ser retidos pelos filtros das estações de tratamento de água – ETA. Essas afirmações mostram que a remoção desses organismos da água é complexa, no entanto, existem tecnologias de tratamento que podem ser capazes de eliminar esse risco microbiológico.

Ciclo completo com flotação além de ser um sistema de tratamento com capacidade de remoção de cor verdadeira e algas, também, é utilizado para remover protozoários (EDZWALD; HAARHOFF, 2011).

A correta disposição do lodo gerado nas estações de tratamento de água (ETA) é extremamente importante, pois nele está presente a maior parte dos cistos e (oo) cistos retidos nos processos de tratamento (ANDREOLI, 2016). No total de 2.098 cidades brasileiras que geram lodo no processo de tratamento de água, 1.415 lançam em rios, 463 em terrenos e 83 em aterro sanitário (IBGE, 2010). Outra preocupação é em relação às ETA que retornam para o sistema a água utilizada na lavagem dos filtros, porque esse líquido pode conter, assim como o lodo, microrganismos patógenos.

De acordo com Achon e Cordeiro (2015), realizaram pesquisas em 22 estações de tratamento de água de uma Sub-Bacia Hidrográfica do Estado de São Paulo com base na Lei 12.305/2010. Os resultados mostram que somente 9% das ETA destinam o lodo para unidades de tratamento de resíduos, 86% das ETA dispõem o lodo sem tratamento em corpos d'água e 5% encaminham o lodo para uma das estações de tratamento de esgoto.

Devido à extrema dificuldade de detecção e inativação dos protozoários, a falta de pesquisas sobre o tratamento e a disposição de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* nos resíduos de estações de tratamento de água, o presente projeto avaliou métodos de detecção e o tratamento dos resíduos gerados na tecnologia do ciclo completo com flotação quando a água bruta apresentava cistos de *Giardia spp.* e oocistos de *Cryptosporidium spp.* Para o tratamento do resíduo flotado foi usado óxido de cálcio, enquanto que para a água de lavagem dos filtros o método utilizado foi o ozônio.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a detecção e o tratamento dos resíduos gerados na tecnologia de ciclo completo com flotação quando a água bruta apresentava cistos de *Giardia spp.* e oocistos de *Cryptosporidium spp.*

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar ensaios de tratabilidade em floteste com água de estudo com a finalidade de gerar os resíduos a serem tratados;
- Comparar diferentes métodos de concentração de protozoários e escolher o método que não altere a permeabilidade da membrana dos protozoários visando estimar a viabilidade com iodeto de propídeo;
- Avaliar a eficiência do óxido de cálcio na perda da permeabilidade da membrana dos (oo) cistos presentes no resíduo flotado; e
- Avaliar a eficiência da ozonização na perda da permeabilidade da membrana dos (oo) cistos presentes na água de lavagem dos filtros.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Microrganismos emergentes

Os pesquisadores Hotez e Fujiwara (2014), mostraram dados relevantes sobre as doenças tropicais negligenciadas no hemisfério ocidental, sendo o Brasil o país com a maior presença. Dentre as principais infecções negligenciadas destacam-se: as de protozoários.

Giardia lamblia é um microrganismo do tipo parasito flagelado, conhecido de espécies de mamíferos, entre eles os seres humanos, é levado em consideração por ser o protozoário que pode causar diarreia (CACCIÒ; SPRONG, 2011).

A *Giardia* possui dois estádios em seu ciclo de vida, a fase trofozoíto (fase de replicação) e a forma de cisto (fase infecciosa) (RYAN; CACCIÒ, 2013). Os cistos podem medir de 5 a 15 µm de largura por 8 a 18 µm de comprimento, apresentando morfologia ovalada (USEPA, 2012).

Os oocistos de *Cryptosporidium* podem medir de 4 a 6 µm, apresentam morfologia esférica e são mais resistentes a adversidades ambientais que os de *Giardia*. Os oocistos de *Cryptosporidium* conseguem resistir por até 1 ano a 4 °C na água do mar (CACCIÒ et al., 2003). Dentro do hospedeiro ocorre o ciclo de vida completo desse parasito, o qual se inicia pelos estádios de reprodução sexuada e assexuada até formar o oocisto, o qual é infectante (CACCIÒ; PUTIGNANI, 2014).

O *Cryptosporidium spp.* é apontado como um relevante contaminante biológico da água (ROSE; HUFFMAN; GENNACARO, 2002). Outro protozoário patogênico é a *Giardia spp.*, a qual está presente principalmente em águas de recreação e as destinadas para o consumo humano (CRAUN; CALDERON, 2005; FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012a).

Existe uma diversidade de espécies de *Giardia* e *Cryptosporidium* descobertas principalmente com o desenvolvimento das tecnologias e a biologia molecular. Algumas espécies desses protozoários, bem como as características gerais em relação ao genótipo, hospedeiros principais, tamanho dos cistos e os autores que descobriram as espécies podem ser observadas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Características gerais de diferentes espécies de *Giardia* em relação ao genótipo, hospedeiros principais, tamanho dos cistos e pesquisadores que descobriram as espécies.

Espécie	Genótipo	Hospedeiros Principais	Tamanho dos cistos (µm)	Referências
<i>Giardia duodenalis</i> (<i>G. lamblia</i> e <i>G. intestinalis</i>)	A	Humanos e outros primatas, canídeos, felinos, bovinos, roedores, animais silvestres	12-15 x 6-8	Homem et al. (1992); Mayrhofer et al. (1995)
	B	Humanos e outros primatas, canídeos e animais silvestres	12-15 x 6-8	Homem et al. (1992); Mayrhofer et al. (1995)
<i>Giardia duodenalis</i> (<i>G. lamblia</i> e <i>G. intestinalis</i>)	C	Canídeos	12-15 x 6-8	Meloni e Thompson, (1987)
	D	Canídeos	12-15 x 6-8	Monis et al. (1998)
	E	Bovinos e animais de pastoreio	12-15 x 6-8	Ey et al. (1997)
	F	Felinos	12-15 x 6-8	Monis et al. (1999)
	G	Roedores	12-15 x 6-8	Monis et al. (1999)
<i>G. agilis</i>	-	Anfíbios	20-30 x 4-5	Kunstler, (1882)
<i>G. muris</i>	-	Roedores, aves e peixes	9-12 x 5-7	Grassi, (1879)
<i>G. psittaci</i>	-	Aves	14 x 6	Erlandersen e Bemrich, (1987)
<i>G. ardeae</i>	-	Aves	10 x 6,5	Erlandesen et al. (1990)
<i>G. microti</i>	-	Roedores	12-15 x 6-8	Feely, (1988)

Fonte: Franco; Branco; Leal, 2012^a

Tabela 2: Características gerais de diferentes espécies de *Cryptosporidium* em relação ao genótipo, hospedeiros principais, tamanho dos cistos e pesquisadores que descobriram as espécies

Espécie	Hospedeiro Principal	Infeccioso para o ser humano	Tamanho dos oocistos (µm)	Referência
<i>C. hominis</i>	Homem	sim	4,5 x 5,4	Morgan-Ryan et al. (2002)
<i>C. parvum</i>	Ruminantes	sim	4,5 x 5,5	Tyzzer, (1992)
<i>C. andersoni</i>	Bovinos	sim	5,5 x 7,4	Lynday et al. (2000)
<i>C. muris</i>	Roedores	sim	5,6 x 7,4	Tyzzer, (1907)
<i>C. suis</i>	Suínos	sim	4,4 x 4,9	Ryan et al. (2007)
<i>C. felis</i>	Felinos	sim	4,5 x 5,0	Iseky, (1979)
<i>C. canis</i>	Canídeos	sim	3,68 x 5,88	Fayer et al. (2001); Pedraza-Diaz et al., (2001)
<i>C. bovis</i>	Bovinos	-	4,63 x 4,89	Fayer et al. (2005)
<i>C. ryanae</i>	Bovinos	-	3,16 x 3,73	Fayer et al. (2008)
<i>C. Xiao</i>	Ovelhas	-	2,94 x 3,44	Fayer e Santin, (2009)
<i>C. wairi</i>	Cobaíes	-	4,0 x 4,8	Valterling et al. (1971)
<i>C. baileyi</i>	Aves	sim	5,2 x 6,3	Current et al. (1986)
<i>C. meleagridis</i>	Aves	sim	4,5 x 4,6	Slavin, (1955)
<i>C. gali</i>	Aves	-	6,2 x 8,5	Ryan et al. (2003)
<i>C. serpentis</i>	Répteis	-	4,8 x 5,6	Levine, (1980)
<i>C. fayeri</i>	Cangurus	-	4,3 x 4,9	Ryan et al. (2008)
<i>C. macropodum</i>	Cangurus	-	4,9 x 5,1	Power e Ryan, (2008)
<i>C. varanii</i>	Lagarto	-	4,7 x 4,8	Pavlassek e Ryan, (2008)
<i>C. ubiquitum</i>	Cervos	sim	5,04 x 4,66	Fayer et al. (2010)
<i>C. cuniculus</i>	Coelhos	sim	5,98 x 5,38	Robinson et al. (2010)
<i>C. fragile</i>	Sapo	-	6,2 x 5,5	-
<i>C. molnari</i>	Peixe	-	4,7 x 4,5	Sitja - Bobadilla, A. et al. (2005)
<i>C. scophthalmi</i>	Peixe	-	4,4 x 3,9	Alvarez- Pellitero, et., (2009)
<i>C. scrofarum</i>	Suínos	sim	5,2 x 4,8	Nemeject et al. (2013)
<i>C. tyzzeri</i>	Rato	sim	4,6 x 4,2	Ren, et al. 2012; Raskova et al., 2013
<i>C. viatorum</i>	Homem	sim	5,4 x 4,7	Elwin et al. (2012); Insulander et al. (2012)

Fonte: Franco; Branco; Leal, 2012; Chalmers e Katzer, 2013.

O principal meio de dispersão dos protozoários é a transmissão hídrica, pois estão presentes em grande quantidade no meio, devido ao seu tamanho reduzido e resistente, tornando-os aptos a transpor as barreiras físicas das estações de tratamento de água. Essas propriedades junto com a resistência aos desinfetantes comumente usados nas estações de tratamento são elementos que contribuem para a ocorrência dos surtos documentados de criptosporidiose e giardiose (SANTOS et al., 2013).

De acordo com Fayer et al. (2000), o surto de criptosporidíase em Milwaukee, ocorrido nos Estados Unidos, no ano de 1993, deixou em torno de 400.000 pessoas internadas. Infelizmente, surtos como esse ocorreram em comunidades que são abastecidas com água tratada, de acordo com padrões de potabilidade (CARDOSO et al., 2002). Isso mostra que apesar de existir um sistema de tratamento de água, ele não foi capaz de remover esses patógenos.

No Brasil, os estudos relacionados à ocorrência de protozoários em água de abastecimento são poucos. A maioria dos casos constatados está relacionada à propagação interpessoal, enquanto que casos de surtos de giardíase e cryptosporidíase por vinculação hídrica não foram confirmados (FRANCO et al., 2012).

Os principais sintomas associados à giardíase e cryptosporidíase são: diarreia e dores abdominais; porém, em casos mais graves, pode acontecer perda de peso, anemia e chegar ao óbito. Os (oo)cistos desses parasitas são resistentes aos principais produtos químicos utilizados no tratamento convencional da água e, também, apresentam resistência às condições ambientais (ROSE, 1997; KEEGAN et al., 2007).

3.2. Métodos de detecção de (oo) cistos de protozoários em amostras de água e de resíduos

Existem diversos métodos para a detecção e identificação de protozoários, entre eles os métodos mais simples, como o uso de suspensão de organismos em lâminas de vidro, para visualização no microscópio de campo claro, e métodos mais complexos, como análises biomoleculares (CLANCY et al., 2000). Esses métodos podem ser utilizados tanto para a detecção em amostras de água quanto de resíduos da ETA.

A maior parte dos métodos de detecção de (oo) cistos consiste em três fases: concentração; purificação; e a última, visualização e contagem dos (oo) cistos (FRANCO, 2012; BRANCO, 2006). A primeira fase, concentração, consiste em concentrar os protozoários em um volume reduzido. Depois de concentrada, a amostra pode conter uma

grande quantidade de sujeira e microrganismos não desejáveis. Deste modo, a fase seguinte de purificação faz-se importante, pois purifica e elimina essas interferências. Na fase final, visualização e enumeração, os (oo) cistos são identificados e contabilizados no microscópio.

3.2.1. Amostragem e Concentração

O objetivo da concentração da amostra de água é recuperar os (oo) cistos. O volume da amostra analisada depende da concentração prevista de (oo) cistos. Para isso, os métodos mais utilizados são a floculação em carbonato de cálcio (FCC) e a filtração em membrana (FM).

A floculação em carbonato de cálcio – FCC é um método utilizado na fase de concentração, criado por Vesey et al. (1993) e adaptado por outros autores, como Feng et al. (2011). O método descrito apresenta algumas limitações, entre elas: interferência na viabilidade dos patógenos e dificuldade de visualização dos (oo) cistos em microscópio de fluorescência (FRANCO, 2012; BRANCO, 2006). Além dessas, destaca-se também a probabilidade de ocorrer resultados falso-positivos ou negativos, pois a precipitação química acontece em pH elevado e por período prolongado (*overnight*) e a dissolução do sedimento é realizado com uso do ácido sulfâmico, o qual pode ocasionar modificações nos protozoários e dificultar a identificação dos microrganismos no microscópio (FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012).

De acordo com Aldom e Chagla (1995), na filtração em membranas (FM) a amostra é filtrada com o auxílio de uma bomba de vácuo e no término da filtração o material é eluído a partir da superfície da membrana por meio de extração mecânica com solução Tween 80 a 0,01%. O sendo o material resultante, centrifugado para ser concentrado. Para essa metodologia existem algumas variações que empregam diferentes tamanhos de poros das membranas.

Os mesmos autores afirmam que a eficiência de recuperação média para oocistos varia de 25,5 a 70,5%. A principal limitação desse procedimento é o efeito da turbidez da água, porque quanto maior for o valor da turbidez presente mais rapidamente será a oclusão dos poros da membrana, o que causa a necessidade de serem substituídas (FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012).

Um dos métodos empregados inicialmente para a detecção dos protozoários foi a filtração de grande volume de água (aproximadamente 100 L para água bruta e 1000 L para água tratada), sua metodologia consistia em realizar a filtração em cartuchos tipo cartridge,

que são filtros de poliprolileno com 1 µm de porosidade, e em seguida centrifugar e gerar um pellet (EPA, 1995). De acordo com a EPA (1995) a sensibilidade dessa metodologia é influenciada pela presença ou concentração de determinados interferentes, como: turbidez, argila, polímeros, coagulantes utilizados no tratamento e a presença de microalgas.

Dos Santos et al. (2011), realizaram análises para a comprovação da eficiência dos métodos centrífugo-concentração e filtração em membrana na detecção dos protozoários, cistos de *Giardia spp.* e oocistos de *Cryptosporidium spp.*, oriundos da estação de tratamento de esgoto. Os pesquisadores concluíram que ambos os métodos usados para a detecção apresentaram eficiência em todos os tipos de amostras, destacando também o baixo custo das análises.

No método de filtração em membranas podem ser utilizadas membranas de acetato de celulose com 1,2 µm de porosidade (ALDOM; CHAGLA, 1995). Franco, Rocha-Eberhardt e Cantusio Neto (2001) usaram membranas de ésteres mistos de celulose de 47 mm de diâmetro e porosidade nominal de 3 µm na filtração à vácuo.

Cantusio Neto et al. (2010) compararam as metodologias de floculação em carbonato de cálcio de Vesey et al. (1993) e filtração em membranas de 47 mm de diâmetro (FRANCO et al., 2001) e usaram o *EasySeed*® para a água reagente, enquanto que para amostras de água bruta foram usados o *ColorSeed*®. Para a análise que usou o *EasySeed*® a filtração em membrana obteve maior eficiência de recuperação dos protozoários, mas para a amostra com *ColorSeed*® esse método teve uma redução na eficiência de recuperação.

Os mesmos autores concluíram que determinadas características da água como: metais, matéria orgânica em decomposição, bactérias, sílica, presença de ácidos húmicos e variações do pH e da turbidez, são variáveis que influenciaram negativamente na sensibilidade das diversas metodologias.

Pinto (2013) realizou estudo do método 1623 utilizando Filt-Max® (FMx) e o método de Filtração em Membranas. O autor não verificou diferenças relevantes entre os métodos estudados.

3.2.2. Purificação e Separação

Um dos métodos de detecção de protozoários em águas é o “ICR – Information Collection Rule - Protozoan Method for detecting *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water by fluorescent antibody procedure” (USEPA, 1995), o qual apresenta muitas

desvantagens, como: técnica complexa, pouca quantidade de recuperação, resultados falso-positivos e falso-negativos (CLANCY et al., 1999; ALLEN; CLANCY; RICE, 2000; FRANCO; CANTUSIO NETO; BRANCO, 2001; NHMRC, 2011).

Por causa dos diferentes métodos de detecção de protozoários, a agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos na década de 1990 reconheceu a importância de padronizar os diversos métodos de detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia*, por isso foi criado o Método 1622 (EPA-821-R-99-001). O Método criado incluiu a etapa de purificação que utiliza a imunomagnética (IMS) no lugar de outros métodos de purificação.

Infelizmente, o Método 1622 era voltado exclusivamente para a detecção dos oocistos de *Cryptosporidium*, o qual foi sucedido pelo Método 1623 que inclui os cistos de *Giardia*. Atualmente, o Método 1623 é o que se mantém como referência.

O Método 1623 foi planejado com objetivo de pesquisar *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* provenientes de água bruta ou tratada, sendo seu desempenho influenciado pela alta turbidez da água (DIGIORGIO et al., 2002), pelo teor de ferro dissolvido existente na amostra (YAKUB; STADTERMAN-KNAUER, 2000), variações do pH (KUHN et al., 2002) e tempo de rotação das microesferas no decorrer da incubação.

Para a purificação da amostra, atualmente é utilizado a técnica de separação imunomagnética (IMS) do Método 1623.1 (USEPA, 2012), sendo um protocolo validado para purificar e segregar os (oo) cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium* (CLANCY et al., 2000).

O IMS consiste na utilização de anticorpos monoclonais de alta afinidade, unidas à superfície de esferas magnetizadas, os quais permitem a captura de (oo) cistos. Depois da captura, há uma etapa de dissociação, que separa os (oo) cistos das esferas.

Outro método de purificação utilizado é a flutuação, que promove a separação dos (oo) cistos, porém, um alto número de partículas e células de algas pode permanecer na amostra e assim prejudicar a visualização em microscópio de fluorescência (CLANCY et al., 2000; MCCUIN et al., 2001). A eficiência desse método depende do tempo que os protozoários estiveram em contato com as partículas da matriz, da turbidez e do número original de (oo) cistos (MCCUIN et al., 2001).

A seleção do método para a dissociação e como ela é feita são fatores extremamente importantes. Os pesquisadores Ware et al. (2003) realizaram a dissociação térmica com incubação a 80°C, no período de dez minutos, o que surgiu expressivo aumento na recuperação de oocistos, 41% para 71% em água reagente e de 10% para 51% em amostras de água de rio artificialmente contaminadas.

Pinto (2013) realizou um estudo do método de Purificação por Separação Imunomagnética (IMS) comparando os procedimentos de dissociação ácida e térmica, obteve que dissociação ácida teve média maior de eficiência de recuperação para cistos de *Giardia spp*, enquanto que para oocistos de *Cryptosporidium spp* estatisticamente não existiu diferenças.

3.2.3. Avaliação e Identificação

Para a etapa de avaliação e identificação dos protozoários os principais métodos utilizados são: Reação de Imunofluorescência Direta (RID) e a Polymerase Chain Reaction (PCR). O RID utiliza anticorpos monoclonais com corante fluorogênico isotiocianato de fluoresceína (FITC), os quais agem contra os antígenos de cistos e (oo) cistos, e sua leitura é realizada em microscopia de imunofluorescência (FRANÇA, 2007).

O PCR baseia-se na detecção de quantidade de DNA e/ou RNA. Por causa do avanço no desenvolvimento dessas técnicas, novas espécies e subespécies de *Giardia spp.* e *Cryptosporidium spp.* estão sendo detectadas (APHA; AWWA; WEF, 2012).

3.3. Tecnologia de ciclo completo e as características dos resíduos gerados

A ETA de ciclo completo é a mais utilizada no Brasil, de acordo com a Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (IBGE, 2010). Os principais processos e operações desse tipo de estação de tratamento de água são: coagulação, floculação, clarificação (flotação ou decantação), filtração e desinfecção (BETANCOURT; ROSE, 2004).

A coagulação é o processo de desestabilização das partículas coloidais, através da adição de um coagulante (DI BERNARDO; DANTAS, 2005). A floculação é a etapa em que as impurezas na água, já desestabilizadas por causa da coagulação, juntam-se e formam flocos, que posteriormente serão removidos em outras unidades. A agitação inadequada pode provocar ruptura dos flocos e assim prejudicar a eficiência do tratamento (YOON; DENG, 2004).

A clarificação é a operação que separa da água os flocos formados pelas etapas anteriores, através da decantação ou flotação. Na decantação, os flocos possuem movimento descendente devido à força da gravidade, porque apresentam massa específica maior que a da água (DI BERNARDO; DANTAS, 2005). A flotação será abordada no item 3.3.1.

A filtração é a etapa responsável pelo polimento da água. A água passa por um meio poroso, o qual retêm as partículas que estão presentes na água (podem estar suspensas ou coloidais). Depois de um tempo de operação é importante ocorrer à lavagem dos filtros para a desobstrução dos poros (DI BERNARDO; DANTAS, 2005).

A desinfecção inativa os organismos que persistiram dos processos e operações anteriores a esta. Os principais desinfetantes usados são: cloro gasoso, hipoclorito de sódio e ozônio.

3.3.1. Flotação

A flotação está presente na etapa de clarificação e é utilizada para remover cor verdadeira, algas e partículas. Esse processo consiste na inserção de microbolhas de ar que colidem e aderem-se aos flocos presentes na água, promovendo seu deslocamento de forma ascendente.

Flotação por ar dissolvido (FAD), flotação eletrostática e flotação por ar disperso são tipos de flotação mais importantes em relação à produção de microbolhas (AWWA, 2002).

Entre os principais tipos de FAD, encontram-se: microflotação, flotação a vácuo e flotação pressurizada, sendo esse último mais comum (DI BERNARDO; DANTAS, 2005). Na técnica de FAD a produção de microbolhas ocorre pela redução da pressão da água saturada com o ar.

Os principais motivos para a escolha do FAD ao invés da decantação para o tratamento de águas de consumo são: remoção de patógenos, algas, gosto e odor, cor, o lodo mais concentrado e o volume reduzido em planta dos tanques de flotação comparados com os decantadores (EDZWALD; HAARHOFF, 2011).

O aparelho floteste simula a flotação em escala de bancada e sua composição considera câmara de pressurização, conjuntos de dosagem, jarros, conjuntos de coleta e motor agitador. No equipamento de floteste em alguns casos é possível a instalação de filtros de laboratório, com o objetivo de simular o tratamento de ciclo completo, começando pela coagulação e terminando na filtração.

Edzwald e Haarhoff (2011) recomendam para o estudo em escala de bancada usando a tecnologia FAD o tempo de floculação de 5 a 20 min, o tempo de flotação de 10 min, a taxa de recirculação de 6 a 12% e a pressão de saturação de 400 a 600 kPa.

3.3.2. Remoção de (oo) cistos de *Giardia* e de *Cryptosporidium* por processos que envolvem o tratamento de água de abastecimento

Tratamentos físico-químicos em série, por mais que sejam eficientes, não promovem a total remoção de (oo) cistos; entretanto, comparando os cistos de *Giardia spp.* e os oocistos de *Cryptosporidium spp.*, os primeiros são mais fáceis de serem removidos, provavelmente isso ocorre por causa das dimensões entre os gêneros (ASSAVASILAVASUKUL et al., 2008). A eficiência de remoção dos protozoários dependerá principalmente e sua concentração desses na água (BETANCOURT; ROSE, 2004).

O processo de coagulação é extremamente importante para a remoção de *Cryptosporidium spp.* Otimizá-lo melhora a remoção, por exemplo, de turbidez e esporos de bactérias aeróbias (DUGAN et al., 2001; MACIEL E SABOGAL-PAZ, 2016).

Os autores Hsu, Huang e Pan (2001) avaliaram o comportamento dos filtros com a força iônica do meio filtrante, e diferentes valores de pH, na remoção de cistos de *Giardia spp.* e oocistos de *Cryptosporidium spp.* Através do experimento, pode-se verificar que quando os (oo) cistos estavam aderidos aos colóides foram mais facilmente removidos pelo meio filtrante, pois ocorreram interações entre os colóides e o meio filtrante com influência do pH do meio.

Maciel e Sabogal-Paz (2016) realizaram um estudo de tratamento de água com ciclo completo na escala de bancada e foi observado que a utilização de PAC como coagulante resultou em valores de potencial zeta positivos e remoções em torno de 2 log para *Giardia spp.* e *Cryptosporidium parvum*.

Quando os (oo) cistos de *Cryptosporidium spp.* e de *Giardia spp.* são incorporados aos flocos, depois das etapas de coagulação e floculação, sua baixa densidade pode dificultar a sedimentação (EDZWALD; HAARHOFF, 2011), o que fazia da flotação o melhor processo para remover esses patógenos.

Os autores Plummer, Edzwald e Kelley (1995) fizeram um experimento que comparou o FAD e a sedimentação para a remoção dos oocistos de *Cryptosporidium parvum*. Foi observado que a flotação removeu cerca de três vezes mais oocistos que a decantação.

3.3.3. Preocupação Ambiental dos Resíduos de ETA

As impurezas que entram junto com a água devem sair como resíduos, por isso, a geração de resíduos do saneamento é comum, principalmente no lodo dos flotações ou decantadores e na limpeza dos filtros (DI BERNARDO; DANTAS; VOLTAN, 2011).

A geração de resíduos nas ETA é um problema que muitas vezes não é considerado. Cerca de 2.000 toneladas de resíduos são introduzidas nos corpos hídricos sem nenhum tratamento (CORDEIRO, 1999).

Existem diferentes formas de gerar resíduos nas ETA de ciclo completo, sendo que a produção mais significativa de lodos se encontra na lavagem dos filtros e na descarga dos decantadores ou flotações (CORNWELL et al., 1987).

A introdução de resíduos de ETA em mananciais modifica bruscamente sua qualidade (DI BERNARDO et al., 2012). Isso pode aumentar a concentração de metais, interferir na luminosidade do ambiente aquático e reduzir o uso múltiplo da água como fonte de abastecimento.

Os insumos utilizados no tratamento de água, juntamente com a qualidade do manancial, influenciam na quantidade e nas características dos resíduos produzidos nas ETA (REALI, 1999). O manancial apresenta variações sazonais que podem interferir nas características da água bruta, a qual interfere na qualidade do lodo gerado.

De acordo com Cordeiro (1999), o lodo pode apresentar valores diferentes para o mesmo parâmetro: DQO (500 a 15.000 mg.L⁻¹); DBO (30 a 480 mg.L⁻¹); SV (15 a 73 mg.L⁻¹) ST (1.100 a 81575 mg.L⁻¹) e pH (5,55 a 7,6). Isso demonstra a complexidade do resíduo gerado.

Nos resíduos gerados pela flotação, o lodo é removido por equipamentos mecânicos de raspagem, por transbordamento ou hidraulicamente.

De acordo com Sabogal-Paz (2007), o volume de resíduos produzidos durante um dia nas ETA com flotação é de aproximadamente 6 a 8% do volume de água gerado.

Para diminuir o volume de resíduos gerados de ETA de ciclo completo diferentes técnicas são usadas. Entre elas se encontram as Camas de Drenagem, desenvolvidas por Cordeiro (2001), esse sistema reduz o tempo de drenagem de água livre do lodo, possibilitando menor área para implementação do projeto (CORDEIRO et al., 2014).

Os pesquisadores Achon e Cordeiro (2016), realizaram estudos com o objetivo de avaliar a destinação e a disposição final dos lodos gerados durante os processos de tratamento de água em Sub-Bacia Hidrográfica localizada no Estado de São Paulo. Os resultados foram:

77% de disposição *in natura* do lodo de ETA nos corpos d'água sem tratamento prévio, 14% disposto em aterro e 9 % disposto de forma incorreta. Todas as análises foram baseadas nas diretrizes da Política Nacional de Resíduos Sólidos- Lei 12305/2010.

Marquez et al. (2005) inocularam grandes quantidades de cistos de *Giardia spp.* e oocistos de *Cryptosporidium spp.* em uma ETA piloto de ciclo completo, constataram a presença dos microrganismos em todas as etapas da estação. Os mesmos autores mostraram que a quantidade de oocistos de *Cryptosporidium spp.* foi maior que cistos em todas as etapas, encontrando altas concentrações no lodo do decantador e na água de lavagem dos filtros.

De acordo com Souza Filho (1998), quando o resíduo líquido (água de lavagem dos filtros) volta à câmara de chegada da água bruta para misturar-se com ela é denominado de recirculação. O mesmo autor afirma que a água utilizada na recirculação pode ser tratada ou não tratada e a vazão para esse fim não deve ser superior a 10% da vazão de água bruta.

O controle para a recirculação de água de lavagem dos filtros deve ser rígido, pois caso contrário poderá interferir na qualidade da água tratada e comprometer o funcionamento da ETA com a presença de sólidos suspensos, metais, precursores de trihalometanos e de protozoários como *Giardia* e *Cryptosporidium* (CORNWELL; LEER, 1994).

3.4. Ensaios de tratabilidade utilizando floteste

O floteste é um equipamento utilizado para a realização de ensaios que permitem otimizar os parâmetros de mistura rápida, floculação e flotação. Normalmente, a clarificação por flotação é apropriada ao tratamento de águas com baixa turbidez (DI BERNARDO, 2011).

Os ensaios de tratabilidade devem ser padronizados, as soluções dos produtos químicos devem ser ajustadas e a água de estudo deve ser coletada e armazenada uma única vez durante todo o período de execução dos ensaios (DI BERNARDO, 2011). Após a coleta da água de estudo, deverá ser realizada a caracterização físico-química e microbiológica dessa água (DI BERNARDO, 2011).

O floteste possui agitadores do tipo paletas com rotação variável, onde cada rotação corresponde a um gradiente de velocidade média do jarro e sua relação é influenciada pela temperatura da água (DI BERNARDO, 2011).

O equipamento floteste possui uma câmara de pressurização, jarros, conjuntos de dosagem, conjunto de coleta e motor-agitador (Figura 1).

Figura 1: Floteste

A coleta de amostras de água flotada é feita por um coletor deslizante e antes desse passo é necessário realizar o descarte da água que pode permanecer no interior do sistema de coleta. Esse procedimento é feito para evitar interferências na amostragem (DI BERNARDO, 2011).

3.5. Estimativa da permeabilidade de (oo) cistos com corantes vitais

Segundo Smith e Grimason (2003), depois da identificação dos parasitos é preciso determinar a viabilidade e infectividade, as quais se referem à eficiência do tratamento utilizado. A viabilidade se relaciona à atividade metabólica ou integridade da parede celular dos (oo) cistos (SANTOS; CANTUSIO NETO; FRANCO, 2008). Medeiros (2010) descreve alguns métodos para a determinação de viabilidade: excitação (desencistamento) e a inclusão ou exclusão de corantes vitais.

Determinar de modo preciso e rápido a viabilidade dos cistos e oocistos presentes no abastecimento de água, os quais são resistentes ao tratamento é muito importante para os estudos epidemiológicos e fins regulatórios (KORICH et al., 1990). Discernir (oo)cistos e cistos viáveis de não viáveis é significativo para a perspectiva ecológica da presença desses protozoários no meio (DOWD; PILLAI, 1997).

Por causa do custo e imprecisões, os meios de determinações de viabilidade por excitação e infectividade animal não estão na rotina de análises dos serviços públicos de

água. Alguns relatórios recomendam a aplicação de corantes vitais e outros métodos para a determinação da viabilidade (DOWD; PILLAI, 1997).

O corante fluorogênico vital iodeto de propídeo é utilizado para determinar a permeabilidade da membrana em incluir ou não o corante no material interno da célula, ou seja, caso a membrana esteja danificada ocorrerá a inclusão do corante, o qual pode ser visto com fluorescência vermelha com excitação em comprimento de onda de 500 nm (APHA; AWWA; WEF, 2012).

O DAPI é o corante comumente utilizado para confirmar a morfologia dos (oo) cistos, pois auxilia na visualização do núcleo dos organismos (SANTOS, 2007). Quando vistos no microscópio os cistos de *Giardia* e os oocistos de *Cryptosporidium* mostram núcleos com diferentes intensidades de azul (SANTOS, 2007). Neste contexto, Campbell et al. (1992) realizaram um experimento com a combinação dos dois corantes vitais, o IP e o DAPI para discriminar os oocistos de *Cryptosporidium* viáveis e não viáveis. Eles evidenciaram que a inclusão de IP se correlaciona fortemente ($r^2 = 0,997$) com a viabilidade avaliada pelo método de excitação.

Os pesquisadores Vergara-Castiblanco et al. (2000) investigaram a viabilidade de duas espécies de *Cryptosporidium parvum*, que eram da Colômbia e Espanha e pesquisaram os métodos de excitação *in vitro*, inclusão ou exclusão de dois corantes fluorogênicos vitais (DAPI e IP) e ensaio de infectividade. Eles mostraram que não foi possível verificar correlação entre excitação *in vitro*, inclusão ou exclusão de corantes vitais e na infectividade *in vivo* para os parasitos da Colômbia, entretanto, os dados conseguidos com o da Espanha apontaram forte correlação entre a eficiência de excitação, os corantes vitais e a infectividade.

Infectividade é a capacidade de o parasito completar o ciclo de vida no hospedeiro, produzindo e eliminando novas formas de resistências nas fezes (FRANÇA, 2007). Medeiros (2010) aborda os seguintes métodos para avaliar a infecciosidade: cultivo celular e a infecciosidade animal. O procedimento desse último método é a inoculação de (oo)cistos em animais de laboratório e depois o monitoramento dos efeitos na saúde desses animais.

3.6. Ozônio na remoção de protozoários

Nas estações de tratamento de água, o processo de desinfecção é extremamente significativo, porque propicia a proteção da saúde pública. Nesta etapa, pode-se evidenciar a inativação de microrganismos patogênicos existentes na água, tornando-a mais segura para o consumo e uso humano (COSTA, 2007). Existem diversos métodos de desinfecção, entre eles o ozônio, o qual é estimado ser um método promissor para o tratamento de efluentes (SILVA et al., 2010).

O ozônio é um oxidante extremamente forte, com capacidades para oxidar os compostos orgânicos e inorgânicos presentes na água, os quais necessitarão de uma demanda do oxidante previamente à desinfecção (DANIEL, 2001).

Em 1781, por causa do seu odor próprio, foram identificados os primeiros sinais do ozônio, entretanto, apenas no ano 1867 sua fórmula química, (O_3), foi encontrada. Depois de quase 20 anos, em 1886, sua propriedade de desinfetante foi descoberta. A utilização do ozônio como desinfetante no tratamento de água ocorreu pela primeira vez no ano de 1893, na Holanda. No ano de 1906, a primeira estação de tratamento de água a usar o ozônio para desinfecção foi na França (SANCHES, 2003; COSTA, 2007; SOARES, 2007).

O ozônio é um oxidante forte, podendo ser um desinfetante alternativo ao cloro, eficiente para a inativação de bactérias, vírus, colifagos, cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* (DA SILVA et al., 2011; LAPOLLI et al., 2003).

No meio aquoso, o ozônio possui capacidades para agir em vários compostos, através de reações diretas com o ozônio molecular ou através de reações indiretas com os radicais formados devido à decomposição do ozônio na água (LANGLAIS; RECKHOW; BRINK, 1991).

De acordo com Silveira (2004), os mecanismos de inativação de micro-organismos patogênicos como ozônio são: destruição da organização celular através de ataques aos constituintes celulares; interferência no metabolismo energético, deixando as enzimas não funcionais; e interferência na biossíntese e no crescimento, causando prejuízo na síntese de proteínas, coenzimas ou parede celular e ácidos nucleicos.

Para a produção em escala comercial do ozônio, o processo mais conhecido é o “processo corona”, o qual se fundamenta na aplicação de uma corrente elétrica no oxigênio ou em um fluxo gasoso de ar. Devido a esse procedimento, os elétrons recebem energia suficiente para romperem as duplas ligações da molécula de O_2 , surgindo assim dois átomos de oxigênio. Os átomos rompidos de oxigênio entram em reação com outra molécula de O_2

para a formação de O_3 . Devido ao fato de que ele não pode ser armazenado nem transportado, ele deve ser gerado no próprio local de utilização (LAPOLLI et al., 2003).

Os pesquisadores Widmer et al. (2002) mostraram a inativação de cistos de *Giardia* com concentração de ozônio inicial de $1,5 \text{ mg.min.L}^{-1}$, valor de CT de $1,5 \text{ mg.min.L}^{-1}$; gerando mais de 3 log de inativação. Finch et al., (1993) investigaram a inativação de cistos com ozônio para os valores de CT de 0,24; 0,45 e $0,86 \text{ mg.min.L}^{-1}$ e obtiveram valores de 2, 3 e 4 log de inativação de cistos de *Giardia muris*, respectivamente. Para cistos de *Giardia lamblia* valores de CT de 0,65; 1,23 e $2,57 \text{ mg.min.L}^{-1}$ resultaram em 2, 3 e 4 log de inativação, respectivamente.

Os pesquisadores Labatiuk et al. (1991) avaliaram a inativação de cistos usando ozônio, obtiveram nos resultados aproximadamente 3 log de inativação de cistos de *Giardia muris*, com CT de $0,5 \text{ mg.min.L}^{-1}$, pH 6,7 e em temperatura de 22°C .

Wickramanayake et al., (1984) utilizando a técnica de excitação para a inativação de cistos de *Giardia* presentes na água e o desinfetante ozônio, conseguiram 2 log de inativação para as duas condições de estudo. Os parâmetros utilizados foram: pH do meio igual a 7, temperatura de 5 e 25°C , CT de 0,53 e $0,17 \text{ mg.min.L}^{-1}$.

3.7. Higienização de resíduos com cal

De acordo com Andreoli et al. (1999), a mistura de óxido de cálcio com o lodo de esgoto em quantidades que variam de 30 a 50% do peso seco do lodo de esgoto é denominado processo de calagem (ou higienização com cal). Os mesmos autores mostram a influência dos seguintes fatores no processo de calagem: i) a temperatura, que pode ser alterada; ii) a mudança do pH da massa (lodo e cal); e iii) a ação da amônia, a qual será originada do nitrogênio que possa estar contido no lodo.

Quando a cal entra em contato com a água presente no lodo ocorre uma reação exotérmica e o menor valor de umidade (em % de água) do lodo deve ser cerca de 70%, pois valores menores de água quando misturados com a cal não atingem temperaturas altas, prejudicando o processo de desinfecção (ANDREOLI et al., 1999).

O pH do lodo que está calado com 50 % do seu peso seco possui valores acima de 12,0 e nessas condições os patógenos são eliminados, contanto que o tempo de contato seja apropriado (ANDREOLI et al., 1999). Os mesmos autores mostraram que a amônia produzida também é um fator de desinfecção que possui maior efetividade quando o tempo de contato com o patógeno for alto.

Thomaz-Soccol et al. (1999) realizaram estudos sobre a eficiência da calagem para a diminuição de ovos de helmintos que estavam no lodo de esgoto e os resultados obtidos mostraram que a viabilidade dos ovos encontrados se reduziu totalmente (100%).

Dai Pra et al. (2008) avaliaram o uso da calagem na redução de *Salmonella spp.* e *Clostridium spp.*, provenientes de lodo de esgoto, em doses de 300, 600 e 900 g/m² e obtiveram resultados de 82% de redução de *Salmonella spp.* e 97% de *Clostridium spp.* para a dosagem de 300 g/m², enquanto que nas dosagens de 600 e 900 g/m² a redução foi de 100 %.

3.8. Análise crítica do tópico revisão bibliográfica

Devido à dificuldade em encontrar pesquisas referentes ao tratamento dos resíduos gerados nas estações de tratamento de água - ETA, o presente trabalho embasou em estudos de resíduos gerados nas estações de tratamento de esgoto - ETE.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As atividades foram desenvolvidas no Laboratório de Tratamento Avançado e Reuso de Águas - LATAR da EESC/USP.

4.1. Preparação da água de estudo

A água de estudo foi preparada utilizando a água do poço do campus 1 da USP de São Carlos com 90 mg.L^{-1} de caulinita (Caolim, Pheur – Sigma-Aldrich® – Fluka-60609), 10 mg.L^{-1} de ácido húmico (Sal Sódico, Grau Técnico Sigma-Aldrich® – H16752), nas mesmas proporções utilizadas por Andreoli (2016), visando elevar a turbidez (aproximadamente 60 uT) e a cor verdadeira (cerca 100 Pt-Co), e homogeneizada por um misturador elétrico durante 30 min a 500 rpm (329 s^{-1}). A água de estudo era armazenada em uma bombona com capacidade de 200L (Figura 2).

Figura 2: Bombona de armazenamento da água de estudo

4.2. Caracterização da água de estudo

A água de estudo foi caracterizada utilizando as seguintes análises: pH, potencial zeta, turbidez, cor verdadeira, cor aparente, alcalinidade, condutividade, absorbância 254 nm, carbono orgânico total – COT, dureza, alumínio, ferro, manganês, coliformes totais e *Escherichia coli*. Todos os procedimentos seguiram APHA, AWWA e WEF (2012).

4.3. Ensaaios de Tratabilidade

O flote teste foi utilizado para simular o tratamento de ciclo completo com flotação. As metodologias de Di Bernardo, Dantas e Voltan (2011) e Edzwald e Haarhoff (2011) foram seguidas para a realização dos ensaios.

O cloreto de polialumínio – PAC (Anexo C) foi usado como coagulante e os parâmetros de projetos foram fixados conforme os resultados obtidos por Andreoli (2016); contudo, esses valores foram testados novamente em triplicata para corroborar as eficiências alcançadas. Os valores utilizados do PAC (16,68% de teor de Al_2SO_3); para os testes visando a encontrar a dosagem ideal de coagulante foram: 25mg/L; 26 mg/L; 27,5 mg/L e 30 mg/L .

O equipamento foi ajustado conforme Andreoli (2016) (Anexo A); gradiente de mistura rápida - $G_{mr} = 700\text{s}^{-1}$; tempo de mistura rápida - $T_{mr} = 10\text{s}$; gradiente de mistura lenta - $G_{ml} = 60\text{s}^{-1}$; tempo de mistura lenta - $T_{ml} = 4\text{min}$; tempo de flotação - $T_f = 10\text{min}$ e porcentagem de recirculação - $\text{Rec} = 5\%$.

Após a realização dos ensaios, verificou-se a dosagem ótima de coagulante e o valor do pH desse meio durante a coagulação. As análises consideradas para o critério de seleção foram a cor aparente e a turbidez, por serem estes parâmetros de fácil mensuração.

Na etapa de filtração (Figura 3), para a construção dos filtros foram utilizadas grãos de areia, com granulometria entre 0,30 a 0,59 mm, tamanho efetivo de 0,42 mm e controle de taxa de filtração, de acordo com Di Bernardo, Dantas e Voltan (2011). O valor máximo de filtração usado foi $20\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, que equivale a aproximadamente $100\text{ m}^3\text{m}^{-2}\text{d}^{-1}$, cujo valor se aproxima dos filtros de escala plena.

Figura 3: Filtros de areia

Para obter o tamanho necessário da granulometria, a areia foi peneirada no peneirador eletrônico, de acordo a metodologia da NBR-7181/ABNT – Análise Granulométrica de Solos. Os filtros eram tubos de acrílico de 19 mm de diâmetro interno por 40 cm de altura, sendo que 15 cm da coluna foram preenchidos com a areia descrita anteriormente. A areia foi colocada no filtro com auxílio de um cone plástico e uma colher, sendo depositada lentamente para que não ocorresse a formação de bolsões de ar.

As amostras de água filtrada foram coletadas nos seguintes tempos: 2,30 min; 10 min; e 20 min. O desempenho do tratamento foi verificado de acordo com os valores das análises de cor aparente e a turbidez.

4.4. Geração de resíduos nos ensaios de tratabilidade

Os ensaios em floteste foram repetidos diversas vezes, com os parâmetros otimizados, para obter os volumes de resíduos necessários ao tratamento.

Após o ensaio de tratabilidade, uma parte da água clarificada foi misturada com o lodo flotado (Figura 4), formando assim 1L e 300 ml de Resíduo flotado. Esse volume era armazenado em uma bombona de 20L, para ser utilizado posteriormente.

Figura 4: Lodo flotado

Para a produção da água de lavagem dos filtros – ALF, após o ensaio de tratabilidade, cada filtro era retirado do suporte e o seu conteúdo (areia mais água) era colocado em um béquer que continha 240 ml de água deionizada. Com auxílio de uma seringa com 60 ml de

água deionizada foram feitas lavagens ascensionais dos filtros e o líquido resultante das lavagens foi despejado novamente no béquer. Posteriormente, era aguardado o tempo de 5 min para que a areia que estava no béquer se sedimentasse, e por último, a água desse recipiente era armazenada cuidadosamente em uma bombona de 15 L.

Os parâmetros de turbidez, cor aparente, cor verdadeira, pH, potencial zeta, condutividade, absorbância, alcalinidade, foram avaliados para a água de lavagem dos filtros, enquanto que a série de sólidos (sólidos totais, fixos e voláteis e sólidos solúveis totais, fixos e voláteis), sólidos sedimentáveis, COT, DQO e metais (alumínio, ferro e manganês) foram avaliados para o resíduo gerado após a flotação utilizando os métodos indicados em APHA et al. (2012).

4.5. Descrição da coleta da água tratada após os ensaios em floteste

Na tabela 3, encontra-se a descrição de como foram realizadas as coletas das amostras de água usadas nesta pesquisa.

Tabela 3: Descrição da coleta da água tratada após os ensaios em floteste

Amostras de água	Descrição da amostra	Descrição do método de coleta
Clarificada	Era a água no final do ensaio de flotação antes de ser filtrada.	Era coletada no final da etapa de flotação por meio da abertura do registro do jarro do floteste.
Filtrada 2,30 min	Era o tempo médio da água filtrada durante os intervalos de 1min e 30 s e 3 min e 30 s.	Iniciava-se a filtração e disparava o cronômetro, quando este marcava 1 min e 30 s abriam-se os registros dos filtros e começava as coletas até 3 min e 30 s.
Filtrada 10 min	Era o tempo médio da água filtrada durante os intervalos de 9 min e 11 min.	Iniciava-se a filtração e disparava o cronômetro, quando este marcava 9 min abriam-se os registros dos filtros e começava as coletas até 11 min.
Filtrada 20 min	Era o tempo médio da água filtrada durante os intervalos de 19 min e 21 min.	Iniciava-se a filtração e disparava o cronômetro, quando este marcava 19 min abriam-se os registros dos filtros e começava as coletas até 21 min.

4.6. Descrição da coleta da água de lavagem dos filtros (ALF)

A água de lavagem dos filtros foi resultado do seguinte processo: após a filtração de 700 ml de água clarificada, o material contido dentro do filtro (areia mais água) foi despejado dentro de um béquer que tinha 240 ml de água deionizada. Com uma seringa de 60 mL contendo água deionizada foi realizado enxágues no filtro até toda a água presente na seringa acabar. A água utilizada após o enxágue também foi colocada dentro do béquer onde estava a areia com a água. Depois de 5 min esperando a areia decantar, a amostra da água de lavagem dos filtros foi coletada (Figura 5). Embora a água de lavagem dos filtros também seja um resíduo, foi adotada somente a nomenclatura ALF.

Figura 5: Amostra de ALF no béquer e em tubos Falcon

4.7. Concentração da amostra empregando o método de centrifugação

A amostra foi colocada em um tubo Falcon previamente higienizado e enxaguado com *Tween* 80 a 0,1%, para então ser colocada na centrífuga da marca HEXIS modelo Centrifuge 5810.

O tempo de centrifugação foi de 20 min e o gradiente de velocidade 1500 xg. Posteriormente, o sobrenadante foi removido até a marcação de 5 mL para realizar ensaios com IMS (Apêndice A e B).

4.8. Concentração da amostra empregando o protocolo de FCC

A pesquisa utilizou o método de FCC (Anexo B), desenvolvido por Vesey et al. (1993) e modificado por Feng et al. (2011) e por Giglio (2015) e, novamente, alterado por Andreoli (2016), conforme Figura 6.

Figura 6: Esquema simplificado do protocolo de FCC (ANDREOLI, 2016)

A amostra avaliada foi colocada em um béquer previamente higienizado e enxaguado com *Tween* 80 a 0,1%, para então ser homogeneizada em agitador magnético durante 10 min. Enquanto ocorria a agitação foi adicionado cloreto de cálcio 1M e bicarbonato de sódio 1M.

Após a agitação, a amostra ficou em repouso para posteriormente adicionar hidróxido de sódio e agitar novamente por mais 5 min. Feito isso, o agitador foi desligado e a amostra descansou por no mínimo 4 h.

Uma mangueira de borracha foi utilizada para aspirar ao sobrenadante que foi descartado, essa mangueira foi trocada toda vez que realizou esse método, com objetivo de evitar contaminação.

Os valores de volumes foram de 1,3 L para o lodo flotado (Resíduo) e de 0,3 L para a água de lavagem dos filtros, sendo os mesmos utilizados por Andreoli (2016).

Na sequência a amostra foi agitada novamente por 5 min e adicionado ácido sulfâmico 10%. Todo o conteúdo foi transferido para os tubos de centrífuga e foi centrifugado por 20 min a 1500xg. Posteriormente, o sobrenadante foi removido dos tubos e transferido todos os *pellets* para um único tubo que foi centrifugado novamente a 1500xg por mais 20 min.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido até a marcação de 5 mL do tubo e também foi agitado o *pellet* em vórtex, juntamente com pipeta Pasteur. Depois da agitação foi adicionado PBS até completar o tubo e centrifugado novamente a 1500xg por 20 min. Por fim, foi removido o sobrenadante até 5 mL para realizar ensaios com IMS.

Na Tabela 4 podem ser visualizadas as dosagens de reagentes, em mL, que foram escolhidos após diversos ensaios para cada matriz no método de FCC.

Tabela 4: Dosagens de reagentes após diversos ensaios para resíduo flotado e ALF no método de FCC

Amostra	Dosagem de NaOH 5M(mL)	Dosagem de cloreto de cálcio 1M (mL)	Dosagem de Bicarbonato de sódio 1M (mL)	Dosagem de Ácido Sulfâmico 10% (mL)
Lodo Flotado (Resíduo) (1,3L)	7,5	13	13	26
Água de lavagem dos filtros (0,3L)	4,0	3	3	6

4.9. Concentração da amostra usando centrifugação mais o ICN 7X

A parte inicial deste procedimento foi semelhante ao método 4.8. O *pellet* resultante da centrifugação foi transferido para o tubo de lado plano e três lavagens com 1 mL do detergente ICN 7X foram realizadas no tubo falcon. Após cada lavagem, o conteúdo foi despejado no tubo de lado plano, o mesmo foi acoplado no agitador e ficou sobre agitação durante 1 h.

4.10. Purificação por separação imunomagnética (IMS)

Para a etapa de purificação foi utilizado o método do IMS (Apêndice B) seguindo recomendações da USEPA (2012), para isso foi utilizado os produtos do *Dynabeads® (lifes Technologies™)* (Figura 7).

Figura 7: Foto do kit Dynabeads® Life Technologies™. Produtos pertencentes ao kit. Da esquerda para a direita: Solução tampão SL-A 10X; Solução tampão SL-B 10X; Dynabeads® anti-*Giardia* e Dynabeads® anti-*Cryptosporidium*. Fonte: Boni (2016)

Antes de iniciar os procedimentos, todos os materiais e utensílios foram higienizados e enxaguados com *Tween* 80 a 0,1%. Feito isso, pegou-se a amostra que estava no tubo de lado plano (TLP) e adicionou nela às soluções tampão SL-A 10X e SL-B.

Posteriormente, os Dynabeads Anti-*Giardia* e Anti-*Cryptosporidium* foram agitados em vórtex, um por vez, depois de cada agitação foram adicionado 50 ou 100 μ L ao TLP dependendo da amostra a ser processada. Agitou-se os tubos por 1 h a 18 rpm no mixer rotatório. Posteriormente a agitação foi acoplado o TLP no concentrador de partículas magnéticas (MPC-1) e movimentos manuais foram realizados inclinando a extremidade da tampa do tubo para cima e para baixo, ângulo de 90°, por 2 min. Feito isso, foi descartado o conteúdo do tubo sem removê-lo do MPC-1. Em seguida, a amostra foi homogeneizada no tubo e transferida para o microtubo. Isso foi feito utilizando 3 enxagues de 0,4 mL da solução tampão preparada. Em seguida foi acoplado o microtubo no concentrador de partículas magnéticas 2 (MPC-2) e foram realizados movimentos manuais em ângulo de 180° durante 1 min. Finalmente, após esses procedimentos, foi descartado o material do microtubo, removeu-se o microtubo do MPC-2 e adicionou 50 μ L de ácido clorídrico 0,1N no material aderido.

A amostra foi homogeneizada no vórtex por cerca de 1 min e ficou em repouso durante 10 min. Após essa etapa adicionou-se 5 µL de hidróxido de sódio 1N na lâmina de microscopia de forma a espalhar por todo o poço, o microtubo foi colocado novamente no vórtex e agitado, depois recolocou-se o microtubo no MPC-2 e foram realizados movimentos manuais por cerca de 10 s. Após isso, o material não aderido na parede do microtubo foi removido e adicionado no poço da lâmina.

Para a outra dissociação ácida foram realizados novamente os passos descritos anteriormente, a partir da adição de 50 µL de ácido clorídrico 0,1 N no material aderido.

Os cálculos nesse procedimento foram realizados individualmente, ou seja, primeiro contou a recuperação de um tipo de protozoário e depois outro. A Equação (1) foi utilizada para contabilizar os organismos visualizados.

$$R = \frac{(C1+C2)}{\text{Protoz(inoculados)}} \times 100\% \quad \text{Equação (1)}$$

Em que:

R: Porcentagem de recuperação do método (%)

C1: Contagem de (oo) cistos na 1^a dissociação ácida;

C2: Contagem de (oo) cistos na 2^a dissociação ácida;

Protoz (inoculados): Número de protozoários inoculados na amostra.

4.11. Preparo das lâminas com o *kit* Merifluor® e Aplicação de DAPI e IP

Após a etapa de purificação, as lâminas foram levadas para a bancada e foi iniciado o procedimento para o preparo conforme indicado no *Kit* Merifluor® (Figura 8) (Apêndice C).

Figura 8: Produtos pertencentes ao Kit Merifluor®. Da esquerda para a direita: Solução tampão concentrada 20 x; Reagente de detecção; Contra corante e meio de montagem. Fonte: Boni (2016)

Posteriormente, foi realizado o procedimento conforme indicado no *Kit Merifluor®*, o excesso das soluções foi removido ao redor dos poços com um pedaço de papel, depois, ainda sem a presença de luz, 2 gotas do *Fluoroshield™ with DAPI* (Sigma F6057) serão adicionados em cada poço e aguardará 15 min.

O passo seguinte envolveu 3 lavagens de 50 μ L em cada poço com a solução Hanks`Balancead Salt Solution – HBSS, da *Sigma-Aldrich®* (H9269). Depois disso, 50 μ L do Iodeto de Propídio – IP , da *Sigma-Aldrich®* (P4170) foi adicionado em cada poço e aguardaram-se 5 min. A mesma lavagem foi repetida para o IP. Por fim, uma lavagem de 50 μ L de água ultrapura foi realizada em cada poço com intuito de prevenir a formação de cristais na lâmina.

Ainda para o preparo da lâmina, 1 gota do meio de montagem do *Kit Merifluor®* foi adicionada no centro do poço e a lamínula foi colocada sobre o poço com inclinação de 45°. As bordas da lamínula foram seladas com *Coverslip Sealant*. Esse procedimento foi repetido para os outros poços. As lâminas foram encaminhadas para a leitura em microscópio.

4.11.1. Identificação de protozoários utilizando microscopia de imunofluorescência

O microscópio Olympus® BX51, com aumento de 400x, foi utilizado para analisar as lâminas e com ele foi possível identificar os (oo) cistos pela reação de imunofluorescência direta (RID). Igualmente, foi possível realizar a contagem de protozoários, e fazer as confirmações com os filtros: DAPI, FITC, WG e BF.

A análise microscópica DAPI foi utilizada para observar aspectos morfológicos, a WG para a visualização do iodeto de propídio; enquanto a análise FITC para a verificação da imunofluorescência dos protozoários e BF para verificar a membrana no campo claro.

Os oocistos eram identificados por suas formas esféricas de 4 a 6 μm enquanto que os cistos tinham formato ovóides de 8 a 18 μm de comprimento por 5 a 15 μm de largura. A parede celular desses protozoários apresentava fluorescência cor verde-maçã brilhante (Figura 9 a). Essas verificações morfológicas foram seguidas de USEPA (2012).

Figura 9: Visualização de cistos de *Giardia spp.* com aumento de 40x por meio dos filtros: a) FITC; b) DIC; c) WG Para IP; e d) DAPI

Nos testes com iodeto de propídio eram verificados se o reagente penetrava ou não nos protozoários, caso penetrasse o (oo) cisto era inviável, se não houvesse a penetração, (oo) cisto era considerado viável (Figura 9 c).

Nas análises usando DAPI, os protozoários deveriam pelo menos uma das seguintes características: ligeira coloração azul interna com uma borda verde; dois a quatro núcleos azul-claros; e intensa coloração azul interna (Figura 9 d).

No final da contagem foi calculada a recuperação e comparado com Método 1623.1(USEPA, 2012).

4.12. Ensaio de qualidade analítica

Antes de iniciar os ensaios analíticos foram testados os métodos de concentração dos itens 4.8; 4.9 e 4.10 com o objetivo de compará-los e escolher qual seria o método a ser usado nesta pesquisa.

Após os testes e a escolha do método de concentração, os ensaios de controle de qualidade foram efetuados, primeiramente, utilizando as suspensões de cistos de *Giardia spp.* e de oocistos de *Cryptosporidium*, posteriormente utilizado o *EasySeed®* (Anexo F).

O número de (oo)cistos encontrados foi comparado com o número de (oo)cistos inoculados, de acordo com a Equação (2). A porcentagem de recuperação foi calculada para estimar o desempenho do método avaliado, no caso centrifugação direta com IMS.

$$\% \text{Recuperação} = \frac{\text{n}^\circ(\text{oo})\text{cistos encontrados}}{\text{n}^\circ(\text{oo})\text{cistos inoculados}} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

A média da porcentagem de recuperação e o coeficiente de variação foram calculados e seus valores foram comparados de acordo com o Método 1623.1 (USEPA, 2012).

4.12.1. Método de qualidade analítica utilizando suspensões de *Giardia* e *Cryptosporidium*

Suspensões de cistos de *Giardia spp.* foram adquiridas do Laboratório de protozoologia do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP e oocistos de *Cryptosporidium spp* (Anexo D) foram provenientes da Waterborne (New Orleans – LA, EUA) 5 µL dessas suspensões foram inoculados na amostra visando estimar qual a concentração de (oo) cistos/L. Para a matriz de ALF foi inoculado aproximadamente 2000 (oo)cistos/L em cada amostra, enquanto que para a matriz de resíduo flotado foram inoculados cerca de 220 (oo) cistos em 0,1 L de cada amostra. Para as duas matrizes quatro amostras foram processadas mais o branco. Após a inoculação, a centrifugação direta com ICN7X e IMS.

No método do IMS foi usado o kit *Dynabeads®*, de acordo com os procedimentos descritos pelo fabricante, empregando duas dissociações ácidas.

Para as matrizes da ALF (Figura 10), foi usada metade das microesferas magnéticas recomendadas pelo método (50 µL), as justificativas para essa alteração são: verificar a

eficiência do método usando menos microesferas por causa da baixa concentração de sólidos presentes nas amostras e a redução dos custos do ensaio. Para os resíduos flotados foram empregados 100 µL, valor que é recomendado pelo fabricante.

Figura 10: Ensaio de recuperação das suspensões na matriz ALF

4.12.2. Método de qualidade analítica com *EasySeed*®

Após os ensaios utilizando as suspensões de *Giardia spp.* e *Cryptosporidium spp.* foi realizado ensaios empregando o *EasySeed*®. O teste consistiu em verificar a recuperação dos protozoários. Para isso foram inoculados 100 cistos e 100 oocistos que estavam presentes na suspensão comercial *EasySeed*®, em 0,1 L de resíduo flotado e 1,0 L de água de lavagem dos filtros (Anexo F). Em seguida foi aplicado o método de concentração (Centrifugação) com ICN 7X e IMS.

4.13. Tratamento dos Resíduos

Em um béquer foram despejados 100 mL da amostra de resíduo flotado e adicionado óxido de cálcio. Posteriormente, a mistura foi levada à estufa por sete dias com temperatura de aproximadamente 25 °C. O valor adotado para o óxido foi de 0,0263 g (correspondente a dosagem de 23 mg de óxido de cálcio/100 mL de amostra, ou 460 mg SFT.L⁻¹), o qual era 50% da massa seca de sólidos fixos totais encontrados no resíduo. O teste foi repetido, alterando apenas o tempo na estufa, que de sete dias passou para três dias. Essa alteração foi

realizada porque se observou que toda a amostra encontrada no primeiro tempo tinha secado. Ambas as análises foram realizadas em triplicata.

O primeiro tratamento utilizou três béqueres e em cada um foi adicionado 100 mL de resíduo flotado. Posteriormente, cada béquer foi posicionado no misturador elétrico e colocou-se 1000 (oo) cistos e aguardou-se 20 min para a homogeneização. Após esse tempo, as amostras foram levadas à estufa e ficaram durante três dias a uma temperatura de aproximadamente 25 °C. No final desse procedimento, as amostras foram levadas para as demais etapas, centrifugação com ICN 7X e IMS.

Antes da realização do segundo ensaio, o teste foi feito novamente sem protozoário durante três dias com óxido de cálcio que correspondia a 30% da massa seca da quantidade total de sólidos fixos totais encontrados no resíduo flotado, corresponde ao valor de 0,0158g, ou seja, dosagem de 16 mg de cal/100 mL de amostra (320mg SFT.L⁻¹). Esse procedimento foi realizado para ver se a amostra não secava no béquer.

O procedimento da segunda etapa do tratamento do resíduo foi realizado da mesma maneira que o da primeira, alterando, a quantidade de óxido de cálcio usada, que de 23 mg passou para 16 mg de cal/100 mL. A quantidade média de protozoários inoculados foi 4980 oocistos.L⁻¹ e 4749 cistos.L⁻¹. No final desse procedimento, as amostras foram levadas para as demais etapas, centrifugação com ICN 7X e IMS.

4.14. Tratamento da água de lavagem dos filtros usando ozônio

Para o tratamento utilizando ozônio como desinfetante, foram realizados dois ensaios em triplicata com duas dosagens e dois tempos de contato. Antes de iniciar os ensaios o equipamento foi calibrado por Vieira (2016) e adaptado por SLOMPO (2017), que forneceu os dados da calibração. Nestes ensaios, foram usados a espécie de *Giardia Muris* (Anexo E), proveniente da Waterborne.

4.14.1. Descrição dos ensaios com o ozonizador

A solução de iodeto de potássio (KI) a 2 % (20 g de KI para cada 1,0 L de água destilada) era preparada antes de iniciar os ensaios. Sua conservação era em local escuro e refrigerado. O volume de 400 mL de solução de KI a 2% eram colocados em um frasco próximo à coluna de ozonização, juntamente com 3,0 L da amostra.

O gerador de ozônio era ligado antes do início dos ensaios por 30 min para aquecer, as vidrarias e utensílios eram higienizados e enxaguados com Tween 80 a 0,1%. As suspensões dos protozoários eram removidas da geladeira e ficavam a temperatura ambiente. Posteriormente, eram homogeneizadas seguindo o mesmo protocolo da inoculação.

A água de estudo foi colocada no béquer até a marcação de 1,5 L, depois foi adicionados 40 µL da suspensão de *Giardia spp.* e 535 µL da suspensão de *Cryptosporidium parvum*, posteriormente foi adicionado 1,5 L da amostra no béquer, totalizando 3 L. A água de estudo ficou sob agitação durante 20 min.

Em seguida, a água de estudo homogeneizada foi colocada na coluna de ozonização até a marcação de 3 L, usando um funil, o registro da base da coluna estava fechado. Um volume de 400 mL de KI foi adicionado no frasco do *off-gas*.

Anteriormente ao ensaio, era fechado o registro do topo da coluna, ajustado o rotâmetro para a vazão proposta, a pressão era alocada em 0,5 bar e por fim o gerador de ozônio ligado, o tempo de ensaio era marcado. No final do tempo de contato, o ozonizador foi desligado, entretanto, o compressor de ar permanecia ligado por mais 1,0 min para, então, ser totalmente desligado.

Com o equipamento desligado, o registro que libera o ar foi fechado, o registro que se encontrava no topo da coluna era aberto e a mangueira que estava no frasco lavador de gás foi desconectada para dar prosseguimento as análises *off-gas*. O volume de 100 mL era coletado para realizar análises de concentração de ozônio residual, turbidez, cor aparente, temperatura e pH.

Posteriormente, nas amostras coletadas para a análise do ozônio residual eram adicionados ácido sulfúrico H₂SO₄ 1,0 N, utilizando 2 mL de ácido para cada 100 mL de amostra. A titulação era realizada com o tiosulfato de sódio até a coloração amarelo, em seguida, 1,0 mL de solução indicadora de amido foi adicionada para cada 100 mL de amostra coletada, exibindo uma coloração azulada. Por isso, era feito novamente a titulação com tiosulfato de sódio até a coloração azulada desaparecer. A quantidade de tiosulfato usada (V_{TIO}) foi anotada para obter a produção de ozônio.

As análises de ozônio residual e do *off-gas* foram realizadas de acordo com APHA, AWWA e WEF (2012), considerando o método índigo, através do uso de ampolas AccuVac® da marca HACK (Método 8311), na faixa de 0,01 – 1,50 mgO₃.L⁻¹. A amostra que estava na coluna de ozonização era coletada e encaminhada para o método de concentração.

4.14.2. Quantificação da produção de ozônio

A solução de tiosulfato de sódio consumida na titulação foi usada para calcular a produção de ozônio no intervalo de tempo estipulado. As produções de ozônio no frasco lavador de gás, na coluna de ozonização e a total foram estabelecidas com base nas Equações 3 e 4.

$$P = \frac{N_{TIO} \times (V_{TIO} - V_B) \times V_{KI} \times 1440}{V_{AM} \times t} \quad \text{Equação (3)}$$

$$P_{TOTAL} = P_{COLUNA} + P_{FLV} \quad \text{Equação (4)}$$

Em que:

P: Produção de ozônio (gO₃/h);

N_{TIO}: Normalidade do tiosulfato de sódio;

V_{TIO}: Volume consumido de tiosulfato de sódio na titulação da amostra (mL);

V_B: Volume consumido de tiosulfato de sódio na titulação do branco (mL), (Vieira, 2016 encontrou valor de V_b = 0, e foi adotado para o restante dos ensaios);

V_{KI}: Volume de solução de iodeto de potássio a 2% acrescentado na coluna de ozonização ou no frasco lavador de gás (mL);

V_{AM}: volume da amostra (mL);

t: Tempo de contato (min);

1440: Fator de conversão;

P_{TOTAL}: Produção total de ozônio (gO₃/h);

P_{COLUNA}: Produção de ozônio na coluna de ozonização (gO₃/h);

P_{FLV}: Produção de ozônio no frasco lavador de gás (gO₃/h).

A produção de ozônio pode relacionar-se com a dosagem de ozônio da coluna de ozonização que pode ser visto na Equação 5. A dosagem é um valor médio da concentração de ozônio durante o tempo de contato.

$$D = \frac{P \times t \times 1000}{V \times 60} \quad \text{Equação (5)}$$

Em que:

D: Dosagem de ozônio (mg.L^{-1});

P: Produção de ozônio (gO_3/h);

t: Tempo de contato (min);

V: Volume ozonizado (L).

4.14.3. Valores usados para calibração do ozonizador

A calibração do gerador de ozônio foi realizada de acordo com os valores encontrados por Vieira (2016) e pode ser visualizada na Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros e valores utilizados para a calibração do ozonizador (Vieira, 2016)

Tensão no aparelho ozonizador (%)	40, 60, 80 e 100
Vazão de ozônio (L.min^{-1})	0,5; 1,0; 1,5 e 2
Tempo de contato do ozônio com solução de KI (min)	5
Volume de amostra para titulação (mL)	100
Normalidade do tiosulfato de sódio (N)	0,025
Volume de KI na coluna de ozonização (L)	3
Volume de KI no frasco lavador de gás (L)	1

De acordo com os valores utilizados por (Vieira, 2016) na calibração do ozonizador, Slompo (2017) realizou os cálculos para a produção de ozônio (Tabela 6).

Na Tabela 6, a tensão é referente à regulação do aparelho ozonizador, a vazão é a do ozônio, a qual pode ser obtida regulando o rotâmetro, sua unidade de medida é em litros por minuto e por último, a produção de ozônio que é dada em gramas de ozônio por hora.

Tabela 6: Produção de ozônio obtida através da tensão do ozonizador e da vazão aplicada no aparelho (SLOMPO, 2017)

Vazão (L.min ⁻¹)	Tensão (%)	Produção (gO ₃ .h ⁻¹)
0,5	40	0,25
1,0		0,76
1,5		1,08
2,0		1,60
0,5	60	0,41
1,0		1,39
1,5		1,50
2,0		2,13
0,5	80	0,80
1,0		1,89
1,5		2,62
2,0		3,57
0,5	100	1,17
1,0		2,61
1,5		3,87
2,0		4,80

Na Figura 11, podem ser visualizadas as curvas de produção e as respectivas equações que relacionam a vazão de ozônio com sua produção, conforme cada tensão usada.

Figura 11: Produção de ozônio (gO₃.h⁻¹) obtida através da regulação da vazão de ozônio (L.min⁻¹) e tensão adotada (%) (SLOMPO, 2017)

4.14.4. Instalação Experimental

Nas dependências do laboratório LATAR foram realizados, em escala piloto os ensaios de ozonização. Os elementos básicos para a realização dos ensaios foram: coluna de ozonização, frascos lavadores de gás (*off-gas*) e gerador de ozônio.

A coluna de ozonização era feita de acrílico transparente, possuía 2,0 m de altura e 60 mm de diâmetro externo, 52 mm de diâmetro interno e 4 mm de espessura. A alimentação e a limpeza da coluna eram feitos manualmente.

Os frascos lavadores de gás (*off-gas*) eram um frasco Schott, com capacidade de 2 L. Esse recipiente era conectado ao topo da coluna do ozonizador por meio de uma mangueira e na sua tampa continha um tubo com extremidade porosa mergulhado na solução de iodeto de potássio a 2%.

O gerador de ozônio usado era o modelo PXZ3507, EAGLESAT®. O equipamento era alimentado pelo oxigênio separado do ar atmosférico por meio de um gerador de oxigênio, o qual usava peneiras de adsorção para a separação dos gases.

O gerador de ozônio era do tipo Corona Discharge, composto por um gerador de alta tensão, chave seletora de tensão com 0, 20%, 40%, 60%, 80% e 100%, válvulas de controle de pressão e vazão de oxigênio. A pressão foi mantida em 0,5 bar durante a realização dos experimentos.

A vazão de ozônio/oxigênio foi regulada por meio do rotâmetro de marca Dwyer modelo RMA (Figura 12), acoplado ao equipamento gerador de ozônio, com graduação de 0,5 a 5 L O₂/min.

Figura 12: Ozonizador. A) coluna em acrílico e B) Gerador de ozônio

4.14.5. Cálculo do Balanço de Massa do Ozônio

Através do balanço de massa do ozônio foi possível quantificar a massa de ozônio transferida e consumida nos ensaios realizados e relacionar esses resultados à eficiência de inativação dos microrganismos. As Equações 6 a 11 foram usadas. Na Equação 6 é possível calcular a massa de ozônio que é aplicada na amostra.

$$MA = D \times V$$

Equação (6)

Em que:

MA: Massa aplicada de ozônio (mg);

D: Dosagem de ozônio aplicado (mg.L^{-1});

V: Volume da amostra ozonizada (L).

A massa total de ozônio aplicada dividiu-se em duas, a primeira é a massa transferida para o meio líquido e a segunda é a massa que não foi transferida, *off-gas*. A massa não transferida foi calculada usando as Equações 7 e 8.

$$M_{OFF-GAS} = \frac{N_{TIO} \times V_{TIO} \times V_{OFF-GAS} \times 24.000}{V_{AM}} \quad \text{Equação (7)}$$

Em que:

$M_{OFF-GAS}$: Massa de ozônio não transferida quantificada no *off-gas* (mg);

N_{TIO} : Normalidade do tiosulfato de sódio (N);

V_{TIO} : Volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra (mL);

$V_{OFF-GAS}$: Volume de solução de KI (2%) adicionado ao frasco lavador de gás (L);

V_{AM} : Volume de amostra de KI (2%) titulada (mL).

$$M_T = M_A - M_{OFF-GAS} \quad \text{Equação (8)}$$

Em que:

M_T : Massa de ozônio transferida ao meio líquido (mg);

M_A : Massa total de ozônio aplicada (mg);

$M_{OFF-GAS}$: Massa de ozônio não transferida quantificada no off-gas (mg).

A massa de ozônio transferida para o meio líquido pode também ser dividida em duas, a primeira massa residual e a segunda a massa consumida. O cálculo de ambas pode ser feito pelas Equações 9 e 10.

$$M_R = [O_3]_R \times V \quad \text{Equação (9)}$$

Em que:

M_R : Massa residual (mg);

$[O_3]_R$: Concentração de ozônio residual (mg.L⁻¹);

V : Volume de amostra ozonizada (L).

$$M_C = M_T - M_R \quad \text{Equação (10)}$$

Em que:

M_C : Massa consumida (mg);

M_T : Massa de ozônio transferida ao meio líquido (mg);

M_R : Massa residual (mg).

Por fim, a concentração de ozônio consumido $[O_3]_C$ foi calculada pela Equação 11.

$$[O_3]_C = D - ([O_3]_R + [O_3]_{OFF-GAS}) \quad \text{Equação (11)}$$

Em que:

$[O_3]_C$: Concentração de ozônio consumido (mg.L^{-1});

D: Dosagem de ozônio aplicada (mg.L^{-1});

$[O_3]_R$: Concentração de ozônio residual (mg.L^{-1});

$[O_3]_{OFF-GAS}$: Concentração de ozônio no *off-gas* (mg.L^{-1}).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio de tratabilidade e caracterização das matrizes

Os parâmetros de tratabilidade (condições ótimas) da água de estudo, obtidas após os ensaios de tratabilidade, estão na Tabela 7 e as características físicas, químicas e biológicas da água de estudo, água clarificada, água de lavagem dos filtros, água filtrada e do resíduo flotado, obtidas no floteste, estão na Tabela 8.

Tabela 7: Parâmetros de tratabilidade da água de estudo, obtidos em ensaios de bancada no equipamento floteste (condições ótimas)

Parâmetros	Unidade	Ensaio em Floteste
Dosagem de caulinita (produto: Sigma/Fluka, 60609)	mg.L ⁻¹	90
Dosagem de ácido húmico (produto: Sigma, H16752)	mg.L ⁻¹	10
Dosagem de coagulante sem adição de alcalinizante ou acidificante (PAC com 17,56% de Al ₂ O ₃)	mg.L ⁻¹	26
	mg Al ³⁺ .L ⁻¹	2,29
pH de coagulação	-	6,9
Gradiente de velocidade médio na mistura rápida – Gmr	s ⁻¹	700
Tempo de mistura rápida – Tmr	s	10
Gradiente de velocidade médio na mistura lenta – Gml	s ⁻¹	60
Tempo de mistura lenta – Tml	min	4
Velocidade de sedimentação – Vs	cm.min ⁻¹	-
Tempo de flotação – Tf	min	10
Taxa de recirculação – Rec	%	5
Pressão de saturação	kPa	500
Taxa de filtração	m ³ .m ⁻² .d ⁻¹	100

Tabela 8: Características físicas, químicas e biológicas da água de estudo, água clarificada, água de lavagem dos filtros, água filtrada e do resíduo flotado, obtidas no floteste

Parâmetros	Água de estudo (amostra pontual)	Resíduo flotado ¹ (amostra composta ²)	Água clarificada (amostra composta ²)	Água de lavagem dos filtros ¹ (amostra composta ²)	Água filtrada (amostra composta ²)
Turbidez (uT)	66,8	380	4,43	26,7	0,26
Cor aparente (Pt-Co)	191	322	21,9	85,6	6,1
Cor verdadeira (Pt-Co)	109	NM	1,9	3	NM
pH	6,5	6,84	6,9	6,1	6,8
Potencial zeta (mV)	-25,8	NM	-0,279	-0,191	-0,319
Condutividade ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)	60,21	NM	60,58	18,87	89,70
Absorbância (254)	0,488	NM	0,417	0,416	0,377
Alcalinidade ($\text{mgCaCO}_3.\text{L}^{-1}$)	25,6	NM	20,84	6,94	18,17
Sólidos totais (mg. L^{-1})	NM	440	NM	60	NM
Sólidos voláteis totais(mg. L^{-1})	NM	20	NM	10	NM
Sólidos fixos totais (mg. L^{-1})	NM	460	NM	50	NM
Sólidos suspensos totais (mg.L^{-1})	NM	470	NM	50	NM
Sólidos suspensos voláteis(mg.L^{-1})	NM	60	NM	30	NM
Sólidos suspensos fixos(mg.L^{-1})	NM	410	NM	90	NM
Sólidos sedimentáveis (%)	NM	13	NM	0,1	NM
COT (mg. L^{-1})	1,78	1,06	0,98	1,07	1,05
DQO (mg.L^{-1})	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Alumínio (mg Al. L^{-1})	< LD	25720	< LD	< LD	< LD
Ferro (mg Fe. L^{-1})	0,215	1980	0,022	0,183	<LD
Manganês (mg Mn. L^{-1})	< LD	5,4	< LD	< LD	< LD
Coliformes totais UFC/100ml)	48	2	13	6	7
Escherichia coli (UFC/100ml)	0	0	1	0	0

Notas:

NM: não medido; < LD: inferior ao limite de detecção.

¹: cada floteste gerou 1,3 L de resíduo flotado por jarro (volume maior porque houve dificuldade em extrair a amostra do jarro) e 300 mL de água de lavagem por filtro;

²: vários ensaios em floteste foram realizados para obter o volume necessário à quantificação de todos os parâmetros listados.

Os ensaios permitiram obter água filtrada com turbidez inferior a 0,5 uT, atendendo à Portaria de Consolidação MS-GM nº 5 (2017) Aproximadamente 26 mg. L^{-1} de cloreto de polialumínio – PAC foram dosados à água de estudo sem adicionar alcalinizante ou acidificante.

Maciel e Sabogal-Paz (2016) avaliaram o uso de PAC no tratamento de água com elevada turbidez e presença de cistos de *Giardia spp.* e oocistos de *Cryptosporidium spp.*, deduziram que a dosagem do produto sem ajustar o pH fornecia a melhor condição de tratamento e baixos custos operacionais. Esse resultado foi similar aos trabalhos de Giglio (2015) e Andreoli (2016) e, também, nos ensaios realizados.

O PAC tem sido frequentemente usado no tratamento de águas de abastecimento em países latino-americanos (DALSSASSO; SENS, 2006; FERREIRA FILHO; WAELEKENS, 2009), especialmente em estações de tratamento de água – ETA que apresentam limites operacionais, visto que o produto pode ser dosado sem necessidade de ajustar o pH da água bruta.

A concentração de sólidos e o valor de turbidez nas amostras (Tabela 8) representam uma dificuldade na detecção de cistos de *Giardia spp.* e oocistos de *Cryptosporidium spp.* em resíduos de ETA. Segundo Franco et al. (2012), a turbidez elevada da matriz pode interferir a separação imunomagnética – IMS uma vez que nesta etapa, capturam-se os cistos e oocistos livres, logo, não aderidos aos sedimentos ou outras partículas (p.ex. flocos). Além do mais, a existência de metais na amostra como, por exemplo, aqueles constituintes de coagulantes utilizados no tratamento (alumínio e ferro), da mesma forma causam interferência na ligação dos organismos-alvo às microesferas magnéticas (USEPA, 2012). A recuperação de oocistos de *Cryptosporidium parvum* é influenciada com o aumento da turbidez na matriz, quanto maior esta menor a recuperação do protozoário (BUKHARI et al., 1998; CHANG et al., 2007). Claramente, a detecção de protozoários em resíduos de ETA mostra um desafio e, ainda mais, pelo fato de não existir um método padrão de referência e que possibilite validar o protocolo selecionado.

No Brasil, de acordo com IBGE (2010), 67% das ETA despejavam seus resíduos *in natura* diretamente no manancial mais perto. O fato é preocupante, pois esses resíduos podem conter cistos e oocistos viáveis.

Pesquisas realizadas em estados brasileiros mostraram a existência de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em fontes de abastecimento de água (FRANCO et al., 2001; HACHICH et al., 2004; SATO et al., 2013). Esse fato poderia ser evitado caso os serviços de coleta e tratamentos de esgotos existissem ou fossem mais eficientes.

Segundo a Tabela 8, o coagulante aumentou a concentração de alumínio nos resíduos, esse metal dependendo da quantidade pode trazer benefícios ou problemas para os seres vivos. Neste contexto, Salvador et al. (2000) realizaram experimentos em solução nutritiva para avaliar os efeitos do alumínio sobre o crescimento de mudas de goiabeira nas concentrações de 0, 5, 10, 15, 20 e 25 mg L⁻¹, em pH 4. Os resultados mostraram que em doses baixas o alumínio auxiliou no crescimento, entretanto, em doses altas houve a fitotoxidez. Destaca-se que os mesmos pesquisadores disseram que aproximadamente 95% do Al absorvido ficaram retidos nas raízes das plantas, portanto, ele ficou retido nas plantas e não foi totalmente liberado para o meio ambiente.

Mesmos que esses protozoários sejam removidos da água de consumo, cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* viáveis e potencialmente infectantes podem continuar presentes nos resíduos gerados após o tratamento (KEEGAN et al., 2008) e, por isso, o tratamento deve ser estudando objetivando reduzir os riscos associados à disposição inadequada dos resíduos.

5.2 Seleção do protocolo de detecção de protozoários

Os três métodos avaliados foram: i) floculação em carbonato de cálcio (FCC) com IMS; ii) centrifugação direta com IMS; e iii) centrifugação direta, adição de solução de dispersão detergente ICN 7X (MP BIO®) a 1,0% na amostra, nova centrifugação e posterior IMS.

A matriz considerada para realizar as análises e posteriormente escolher o método foi a ALF (1,0 L de amostra inoculada com número conhecido de parasitos). A contagem dos protozoários nas suspensões foi necessária para presumir o volume inoculado e a permeabilidade (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9: Contagem de oocistos de *Cryptosporidium spp.* e cistos de *Giardia spp.* nas suspensões para o método FCC

Poços da lâmina	Oocistos de <i>Cryptosporidium spp.</i> em 5 µL (suspensão da Waterborne)		Total	Parasitos Permeáveis - negativos para IP (%)	Cistos de <i>Giardia spp.</i> em 5 µL (suspensão da Unicamp)		Total	Parasitos Permeáveis – Positivos para IP (%)
	Negativo para IP (não corado)	Positivo para IP (corado)			Negativo para IP (não corado)	Positivo para IP (corado)		
1	167	569	736	22,69	161	389	550	29,27
2	53	238	291	18,21	69	505	574	12,02
3	69	228	297	23,23	106	403	509	20,83
Média			441	21,38	Média		544	20,71
Desvio padrão			255	3	Desvio padrão		33	9

Nota: IP: iodeto de propídio

Tabela 10: Contagem de oocistos de *Cryptosporidium spp.* e cistos de *Giardia spp.* nas suspensões para os métodos de centrifugação direta e centrifugação direta com ICN 7X

Poços da lâmina	Oocistos de <i>Cryptosporidium spp.</i> em 5 µL (suspensão da Waterborne)		Total	Parasitas Permeáveis – negativos para IP(%)	Cistos de <i>Giardia spp.</i> em 5 µL (suspensão da Unicamp)		Total	Parasitas Permeáveis – positivos para IP (%)
	Negativo para IP (não corado)	Positivo para IP (corado)			Negativo para IP (não corado)	Positivo para IP (corado)		
1	91	278	369	24,66	257	462	719	35,74
2	94	391	485	19,38	42	254	296	14,19
3	26	262	288	9,02	51	375	426	11,97
Média			381	17,69	Média		480	20,63
Desvio padrão			99	7,95	Desvio padrão		216	13,13

Nota: IP: iodeto de propídio

Os testes realizados com IP, presentes na Tabela 9, mostraram que aproximadamente 20% dos parasitos estavam permeáveis (não viáveis) e que 5,0 µL de cada suspensão continham 544 ± 33 cistos e 441 ± 255 oocistos. Com relação à contagem, o desvio padrão para oocistos foi o maior. Enquanto na Tabela 10, os testes feitos revelaram que cerca de 19% dos protozoários foram permeáveis ao IP e que em 5,0 µL de cada suspensão estavam presentes 480 ± 216 para cistos e 381 ± 99 para oocistos

Destaca-se que embora os dois procedimentos de inoculação das amostras foram realizados em sequência, a média de protozoários encontrada em cada ensaio foi diferente, isso confirma a necessidade de realizar a contagem dos protozoários na lâmina antes de fazer a inoculação nas amostras.

Importante ressaltar que embora a média tenha alterado, o teste de permeabilidade da membrana manteve-se estável, o qual foi usado como base para a escolha do método.

A porcentagem de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium spp.* e cistos de *Giardia spp.* para diferentes métodos e a porcentagem de parasitos permeáveis positivos para IP, obtidas após os ensaios de concentração para a matriz de ALF está na Tabela 11.

Tabela 11: Porcentagem de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium spp.* e cistos de *Giardia spp.* para diferentes métodos e porcentagem de parasitos permeáveis positivos para IP, obtidas após os ensaios de concentração para a matriz de ALF

Protocolo testado	Matriz	Organismo-alvo (oocisto ou cisto)	Recuperação (%)	Parasitos permeáveis positivos para IP (%)
Floculação em carbonato de cálcio + IMS	ALF	<i>Cryptosporidium spp.</i>	27,87	55,28
		<i>Giardia spp.</i>	2,57	28,57
Centrifugação direta + IMS	ALF	<i>Cryptosporidium spp.</i>	11,69	47,19
		<i>Giardia spp.</i>	1,45	57,14
Centrifugação direta + detergente ICN 7X + centrifugação + IMS	ALF	<i>Cryptosporidium spp.</i>	12,21	39,78
		<i>Giardia spp.</i>	18,11	18,96
Método 1623.1 (USEPA, 2012)	Amostras de água qualquer	<i>Cryptosporidium spp.</i>	32-100 e $CV \leq 37$	NA
		<i>Giardia spp.</i>	8-100 e $CV \leq 39$	NA

Nota: ALF: água de lavagem dos filtros; CV: coeficiente de variação; NA: não se aplica

O maior valor encontrado para recuperação de *Cryptosporidium spp* foi 27,87 % do protocolo floculação em carbonato de cálcio mais IMS, enquanto que para *Giardia spp.* o valor de 18,11% é o maior, sendo este presente no protocolo centrifugação direta mais detergente ICN 7X mais centrifugação mais IMS. Ao comparar com o método 1623.1, apenas o valor de *Giardia spp.* está dentro do padrão.

Ao comparar os testes de permeabilidade da membrana, o maior valor para *Cryptosporidium spp* foi 55,28 % do protocolo floculação em carbonato de cálcio mais IMS, e para a *Giardia spp* o valor de 57,14 do protocolo de centrifugação direta mais IMS.

Na Figura 13a, observou-se que a FCC deixou um poço mais limpo, entretanto ocorreu perda de fluorescência na visualização dos oocistos. A FCC tem sido recomendada em amostras com elevada turbidez e apresenta baixo custo ao compará-la com técnicas existentes. No entanto, Campbell et al. (1992) declarou que a FCC pode alterar a viabilidade de oocistos de *C. parvum* em 30%, por causa da variação do pH da amostra ao longo do procedimento.

DAPI

FITC

IP

a) Floculação em carbonato de cálcio com IMS (oocisto de *Cryptosporidium spp*)

DAPI

FITC

IP

b) Centrifugação direta com IMS (cisto de *Giardia spp.*).

DAPI

FITC

IP

c) Centrifugação direta, adição de solução ICN 7X, nova centrifugação e IMS (cisto de *Giardia spp.*).

Figura 13: Cistos e oocistos visualizados nos poços ao avaliar a ALF do floteste. Organismos-alvo indicados por setas

Campbell et al. (1992) avaliaram dois corantes fluorogênicos e a infectividade animal para estimar a viabilidade de oocistos envolvendo dois métodos de concentração (centrifugação direta e FCC), com base nos dados obtidos, os autores relataram que os ensaios devem ser interpretados com cautela quando o método de FCC for usado na detecção de parasitos.

De acordo com Franco et al. (2012), o método de FCC possui as seguintes restrições:

i) as variações na concentração dos reagentes e no pH podem reduzir a recuperação de cistos e

oocistos e, também, existe perda de protozoários no sobrenadante descartado; ii) os reagentes empregados podem causar diminuição da fluorescência dos organismos e aumento da fluorescência residual iii) o pH no valor de 10, fundamental ao procedimento, além do longo tempo de preparo da amostra, podem causar mudanças morfológicas e de viabilidade, causando prejuízo nos ensaios posteriores de viabilidade e infectividade animal.

Difícilmente valores acima de 20L da matriz são processados pelo método FCC, pois provocariam elevado pellet a ser processado. Também, o pH deve estar próximo do neutro para proceder empregar a IMS, fator que poderá ocasionar perda de organismos no procedimento. Mesmo com suas desvantagens, o método tem sido utilizado na detecção de protozoários em variadas matrizes, de acordo com os ensaios de Karanis e Kimura (2002), Feng et al. (2011), Giglio (2015) e Andreoli (2016).

Ao verificar os valores de recuperação do processo de uma única amostra, o FCC não correspondeu aos padrões exigidos pelo Método 1623.1, além também de alterar a permeabilidade da membrana dos protozoários. Por causa desses motivos o protocolo FCC foi descartado da pesquisa.

O pH da amostra não foi alterado pelo método de centrifugação direta com IMS, no entanto, a metodologia foi muito demorada, por causa do volume processado. Em relação à leitura dos poços, esse método apresentou impurezas dificultando assim a visualização dos protozoários (Figuras 13 b). Ao avaliar a recuperação dos protozoários da amostra analisada, o protocolo não atendeu ao método padrão da USEPA (2012) para a ALF. Em virtude das desvantagens esse protocolo foi descartado da fase de tratamento do resíduo. Ressalta-se que a metodologia de centrifugação direta com IMS tem sido usada para detectar cistos e oocistos em resíduos de estações de tratamento de esgoto ETE (DOS SANTOS; DANIEL, 2017).

A metodologia empregando a centrifugação direta, posteriormente homogeneização com adição da solução de dispersão ICN 7X seguida de IMS possibilitou melhor visualização dos poços das lâminas (Figura 13 c), isso foi devido à diminuição das sujidades encontradas na lâmina. Destaca-se que uma das principais dificuldades desse método é a demora no seu procedimento. De acordo com Oliveira (2012), ao usar o ICN 7X a 1,0% houve desagregação dos cistos e oocistos das impurezas presentes em amostras dos solos contendo protozoários. A vantagem dessa metodologia é a não alteração do pH, contribuindo para a manutenção da viabilidade dos parasitos.

Outras pesquisas usaram a centrifugação direta como método de concentração de protozoários, como na de Mortimer et al. (2016), os quais isolaram os protozoários ciliados *tetrahymena thermophila* por centrifugação direta com gradiente de densidade de sacarose.

No entanto, a recuperação do método de centrifugação direta com ICN 7X, este não correspondeu ao padrão da USEPA (2012) para oocistos.

Em função da melhor visualização das amostras nas lâminas de microscopia e na aparente manutenção da viabilidade dos parasitos estimada pelo IP, o procedimento de centrifugação direta com adição de solução de dispersão detergente ICN 7X (MP BIO®) a 1,0% na amostra, nova centrifugação e posterior IMS, foi eleito para prosseguir os ensaios.

5.3 Ensaio de qualidade analítica do protocolo de detecção utilizando as suspensões

O volume de parasitos que foram inoculados nos resíduos e na ALF foi determinado pela média aritmética de protozoários contabilizados em três alíquotas iguais (5 µL de *Giardia spp.* e 5 µL de *Cryptosporidium spp.*) retiradas após homogeneização das suspensões. A contagem dos organismos foi realizada em microscopia FITC, DAPI e IP (Tabelas 12 e 13).

Tabela 12: Número de oocistos de *Cryptosporidium spp.* e cistos de *Giardia spp.* nas suspensões para os ensaios de qualidade analítica utilizando a matriz ALF

Poços da lâmina	Oocistos de <i>Cryptosporidium spp.</i> em 5 µL de suspensão		Total	Parasitos permeáveis negativos para IP (%)	Cistos de <i>Giardia spp.</i> em 5 µL de suspensão		Total	Parasitos permeáveis positivos para IP (%)
	Negativo para IP (não corado)	Positivo para IP (corado)			Negativo para IP (não corado)	Positivo para IP (corado)		
1	76	356	432	18	143	201	344	41,57
2	67	389	456	15	81	241	322	25,16
3	105	258	363	29	46	428	474	9,70
Média			417	20,4	Média		380	25,5
Desvio padrão			48	7,5	Desvio padrão		82	15,9

Tabela 13: Número de oocistos de *Cryptosporidium spp.* e cistos de *Giardia spp.* nas suspensões para os ensaios de qualidade analítica utilizando a matriz resíduo flotado

Poços da lâmina	Oocistos de <i>Cryptosporidium spp.</i> em 5 µL de suspensão		Total	Parasitas permeáveis negativos para IP (%)	Cistos de <i>Giardia spp.</i> em 5 µL de suspensão		Total	Parasitas permeáveis positivos para IP (%)
	Negativo para IP (não corado)	Positivo para IP (corado)			Negativo para IP (não corado)	Positivo para IP (corado)		
1	51	245	296	17,2	54	227	281	19,2
2	26	320	346	7,5	20	340	360	5,6
3	64	214	278	23,0	61	187	248	24,6
Média			307	15,9	Média		296	16,5
Desvio padrão			35	7,8	Desvio padrão		58	9,8

A viabilidade dos parasitos, estimada pela permeabilidade da membrana, foi reduzida com o passar do tempo (Tabelas 12 e 13 versus Tabelas 9 e 10), fato que era esperado. O número de protozoários médio que foi inoculado nas amostras foi 2.085 oocistos.L⁻¹ e 1.900 cistos.L⁻¹ na ALF e 2.224 oocistos.L⁻¹ e 2.371 cistos.L⁻¹ no resíduo (flotado e sedimentado). O volume que foi processado da amostra foi de 1,0 L para ALF e 100 mL para o resíduo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata mais o branco e as porcentagens de recuperação de parasitos utilizando as suspensões com as matrizes ALF e resíduo flotado estão nas Tabelas 14 a 16.

Tabela 14: Recuperação média de oocistos de *Cryptosporidium spp.* e cistos de *Giardia spp.* do ensaio de qualidade analítica do método utilizando as suspensões com as matrizes ALF e resíduo flotado e os respectivos desvios padrão e coeficiente de variação (resultados em triplicata)

Amostra	Organismo-alvo (oocisto ou cisto)	Recuperação média (%) ¹	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
ALF (floteste) ²	<i>Cryptosporidium spp.</i>	19,86	16,29	82,02
	<i>Giardia spp.</i>	43,95	11,21	25,50
Resíduo flotado	<i>Cryptosporidium spp.</i>	8,16	30,24	11,01
	<i>Giardia spp.</i>	32,54	46,48	29,53
Método 1623.1 da USEPA(2012)	<i>Cryptosporidium spp.</i>	32-100	-	≤ 37
	<i>Giardia spp.</i>	8-100	-	≤ 39

¹: Recuperação calculada em função do valor médio de protozoários inoculados nas matrizes: 2085 oocistos.L⁻¹ e 1900 cistos.L⁻¹ na ALF e 2224 oocistos.L⁻¹ e 2371 cistos.L⁻¹ no resíduo (flotado ou sedimentado);

²: Um oocisto foi encontrado no branco da ALF obtida no floteste. Após o evento, as pipetas e ponteiros utilizadas no procedimento não foram colocadas sobre o mesmo papel.

Tabela 15: Porcentagem de recuperação de (oo)cistos por dissociação ácida nos ensaios de qualidade analítica utilizando as suspensões, para as matrizes ALF e resíduo flotado

Matriz	Protozoário	Ensaio	1		2		3		Branco	
Resíduo flotado	Oocistos de <i>Cryptosporidium spp.</i>	Poço da lâmina	1D	2D	1D	2D	1D	2D	1D	2D
		Porcentagem de recuperação	13,45	1,63	6,93	4,08	3,67	3,26	0	0
	Cistos de <i>Giardia spp.</i>	Poço da lâmina	1D	2D	1D	2D	1D	2D	1D	2D
		Porcentagem de recuperação	32,90	16,03	6,33	13,92	3,80	15,61	0	0
ALF	Oocistos de <i>Cryptosporidium spp.</i>	Poço da lâmina	1D	2D	1D	2D	1D	2D	1D	2D
		Porcentagem de recuperação	8,35	3,84	3,60	5,23	16,40	22,16	0	0
	Cistos de <i>Giardia spp.</i>	Poço da lâmina	1D	2D	1D	2D	1D	2D	1D	2D
		Porcentagem de recuperação	8,16	43,89	6,53	24,63	24,00	24,63	0	0

1D: primeira dissociação; 2D: segunda dissociação

Tabela 16: Viabilidade estimada em função da permeabilidade da membrana dos parasitos após aplicar o protocolo (resultados em triplicata), para as matrizes ALF e resíduo flotado

Amostra	Organismo-alvo (oocisto ou cisto)	Parasitos permeáveis – positivos para IP	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
ALF (floteste)	<i>Cryptosporidium spp.</i>	13,56	3,53	26,02
	<i>Giardia spp.</i>	30,64	15,19	49,57
Resíduo flotado	<i>Cryptosporidium spp.</i>	37,57	19,73	52,51
	<i>Giardia spp.</i>	20,35	4,91	24,12

A recuperação média de cistos de *Giardia spp.* em ambas as matrizes corresponderam ao padrão do Método 1623.1 da USEPA (2012). Entretanto, os valores da recuperação média de oocistos de *Cryptosporidium spp.* em ambas as matrizes não atenderam.

Cistos de *Giardia spp.* foram ainda encontrados na segunda dissociação nos ensaios de recuperação analítica (Tabela 15). Esses resultados mostram a relevância da segunda dissociação ácida para os testes de recuperação.

Um dos principais motivos para as diferenças de porcentagem de recuperação dos valores da ALF e do resíduo pode ser a turbidez. Quanto maior a turbidez, mais difícil é a recuperação dos protozoários.

Mccuin et al. (2001) realizaram testes de recuperação de (oo) cistos em matrizes com três níveis de turbidez: 5.000, 500 e 50 (NTU) e em água deionizada. Os valores obtidos

foram: i) 62% e 69% para oocistos e cistos, respectivamente, na água deionizada; ii) 89% e 79% oocistos e cistos, nessa ordem, na turbidez de 50; 62%; iii) 83% para oocistos e cistos, respectivamente, na turbidez de 500; e iv) 63% e 80% para oocistos e cistos, nessa ordem, na turbidez de 5.000. Evidentemente, houve queda da recuperação em função do aumento da turbidez.

Os autores Hsu e Huang (2007) também observaram a influência da turbidez na recuperação de protozoários, eles avaliaram a IMS tendo como critério a recuperação de cistos de *Giardia* em diferentes matrizes. Os autores notaram mudanças na recuperação quando a proporção de detritos das amostras de água foi alterada, quanto maior a turbidez menor a recuperação.

Em relação à permeabilidade da membrana, ao comparar a porcentagem de organismos positivos para o teste IP das Tabelas 12 e 13, os quais são referentes aos valores das suspensões, com os da Tabela 16, houve um aumento em quase todos os valores de viabilidade. Essa alteração mostra que o método influencia diretamente na permeabilidade da membrana do protozoário, sendo, portanto, negativo para a pesquisa.

Importante destacar que no presente trabalho, foi usado o IP diretamente nas suspensões não secas. As pesquisas de Robertson et al. (2014) verificaram que pode haver diferenças significativas na quantificação dos protozoários ao utilizar o IP com as suspensões secas.

5.4 Ensaio de qualidade analítica com *EasySeed*®

Os resultados do ensaio de qualidade analítica com o uso do *EasySeed* estão nas Tabelas 17 e 18. Destaca-se que nos ensaios não foram encontrados (oo) cistos no branco, indicando ausência de contaminação.

Tabela 17: Recuperação média de oocistos de *Cryptosporidium spp.* e cistos de *Giardia spp.* do ensaio de qualidade analítica do método utilizando *EasySeed*® com as matrizes ALF e resíduo flotado e os respectivos desvios padrão e coeficiente de variação

Matriz	Resíduo flotado		Água de lavagem dos filtros – ALF	
Protozoários	<i>Oocistos de Cryptosporidium spp.</i>	<i>Cistos de Giardia spp.</i>	<i>Oocistos de Cryptosporidium spp.</i>	<i>Cistos de Giardia spp.</i>
Porcentagem de recuperação média	4,50	49	2,25	3,75
Desvio padrão	1,50	1	1,375	2,25
Coeficiente de variação	33,33	2,04	61,11	60

Tabela 18: Porcentagem de recuperação de (oo)cistos por dissociação ácida nos ensaios de qualidade analítica utilizando *EasySeed*®, para as matrizes ALF e resíduo flotado

Matriz	Protozoário	Ensaio	1		2		3		4		Branco	
Resíduo flotado	Oocistos de <i>Cryptosporidium spp.</i>	Poço da lâmina	1D	2D	1D	2D	1D	2D	1D	2D	1D	2D
		Porcentagem de recuperação	5	0	7	0	2	1	3	0	0	0
	Cistos de <i>Giardia spp.</i>	Poço da lâmina	1D	2D	1D	2D	1D	2D	1D	2D	1D	2D
		Porcentagem de recuperação	22	26	40	11	36	13	42	6	0	0
ALF	Oocistos de <i>Cryptosporidium spp.</i>	Poço da lâmina	1D	2D	1D	2D	1D	2D	1D	2D	1D	2D
		Porcentagem de recuperação	0	1	1	0	0	5	0	2	0	0
	Cistos de <i>Giardia spp.</i>	Poço da lâmina	1D	2D	1D	2D	1D	2D	1D	2D	1D	2D
		Porcentagem de recuperação	0	0	0	6	0	6	0	3	0	0

1D: primeira dissociação; 2D: segunda dissociação

Segundo a Tabela 17, quando a matriz usada era o resíduo flotado observou-se que a recuperação média de cistos de *Giardia* foi de $49\% \pm 1$, assim, correspondeu ao padrão estabelecido pelo Método 1623.1. Entretanto, a recuperação média de oocistos de *Cryptosporidium* foi de $4,5\% \pm 1,50$ abaixo do padrão.

No ensaio de recuperação, quando a matriz usada foi ALF o valor médio observado de cistos de *Giardia* foi de $3,75\% \pm 2,25$ e oocistos de *Cryptosporidium* foi de $2,25\% \pm 1,37$, ambos não atendendo ao padrão estabelecido.

Ao analisar os valores de recuperação por dissociações, Tabela 18, observou-se a influência positiva da segunda dissociação ácida na média de recuperação. Andreoli e Sabogal-Paz (2017) indicaram a importância do aumento das dissociações para incrementar as recuperações dos parasitos.

Maciel (2014) fez ensaios de recuperação (usando o kit *EasySeed*®) de cistos de *Giardia spp.* e oocistos de *Cryptosporidium spp.* em análises com IMS, utilizando duas dissociações ácidas, quando o protocolo de detecção envolveu filtração em membranas. A água de estudo apresentava turbidez de 120 uT e atingiu recuperação de 31,5% para cistos de *Giardia spp.* e de 5,75 % para oocistos de *Cryptosporidium spp.* Somente a recuperação de cistos de *Giardia spp.* atendeu ao Método 1623.1, mesmo fato sucedido nesta pesquisa.

Cantusio Neto (2008) utilizou o método de FCC com IMS em água reagente inoculada artificialmente com *Easyseed*®, e alcançou valores de recuperação de 3,5% para cistos de *Giardia spp.* enquanto que para oocistos de *Cryptosporidium spp.* obteve 3,0%, dessa forma, ambos os valores de recuperação não atingiram ao padrão da USEPA (2012).

Andreoli e Sabogal-Paz (2017) realizaram ensaios de recuperação usando o método FCC sem IMS empregando o *AccuSpike*® e obtiveram 31,5% de recuperação para cistos de *Giardia spp* com coeficiente de variação de 20,2%, ao passo que para oocistos de *Cryptosporidium spp* conseguiram obter 70,3% de recuperação e 12,3% de coeficiente de variação. Ambos os valores atenderam ao padrão internacional.

Esses autores também fizeram ensaios de recuperação usando o método FCC com IMS aplicando o *Easyseed*®, usando duas e três dissociações ácidas. Para os ensaios com duas dissociações, os valores de recuperação de cistos de *Giardia spp.* e oocistos de *Cryptosporidium spp* foram: 16,7 e 32,3 %. Enquanto que, o valor de recuperação para *Giardia spp.* com três dissociações ácidas foi de 24,7 % e à medida de recuperação de *Cryptosporidium spp* foi de 46,5 % e seu coeficiente de variação foi de 6,1%. Evidenciando que ao adicionar mais uma dissociação ácida a média de recuperação aumentou.

Giglio (2015) avaliou resíduo sedimentado com parasitos, gerado em jarteste, empregando o método de FCC com IMS e duas dissociações ácidas. O autor conseguiu recuperações de 42 e 68 % para cistos de *Giardia spp.* e oocistos de *Cryptosporidium parvum.*, respectivamente. Valores maiores ao comparar a presente pesquisa .

Imagens da primeira e segunda dissociações ácidas de cada matriz (ALF e resíduo) foram obtidas (Figuras 14 a 20).

Figura 14: Oocistos de *Cryptosporidium spp.* visualizado após a primeira dissociação ácida na matriz ALF. Ensaio com *EasySeed®*. Imagens em 400x a) DAPI; b) FITC; c) IP; d) DIC

Figura 15: Oocistos de *Cryptosporidium spp.* visualizado após a segunda dissociação ácida na matriz ALF. Ensaio com *EasySeed®*. Imagens em 400x: a) DAPI; b) FITC; c) IP; d) DIC

Figura 16: Cisto de *Giardia spp.* visualizado após a segunda dissociação ácida na matriz ALF. Ensaio com *EasySeed*®. Imagens em 400x: a) DAPI; b) FITC; c) IP; d) DIC

Figura 17: Oocistos de *Cryptosporidium spp.* visualizado após a primeira dissociação ácida na matriz resíduo. Ensaio com *EasySeed®*. Imagens em 400x: a) DAPI; b) FITC; c) IP; d) DIC

Figura 18: Cistos de *Giardia spp.* visualizados após a primeira dissociação ácida na matriz resíduo. Ensaio com *EasySeed*®. Imagens em 400x: a) DAPI; b) FITC; c) IP; d) DIC

Figura 19: Oocistos de *Cryptosporidium spp.* visualizado após a segunda dissociação ácida na matriz resíduo. Ensaio com *EasySeed®*. Imagens em 400x: a) DAPI; b) FITC; c) IP; d) DIC

Figura 20: Cistos de *Giardia spp.* visualizados após a segunda dissociação ácida na matriz resíduo. Ensaio com *EasySeed®*. Imagens em 400x: a) DAPI; b) FITC; c) IP; d) DIC

Existe uma dificuldade em visualizar a fluorescência de alguns protozoários, principalmente dos oocistos, devido à perda da sua intensidade com o passar do tempo e a sua reduzida dimensão.

Todos os protozoários encontrados após os ensaios realizados estavam permeáveis, ou seja, o corante aplicado (IP) penetrou na membrana do protozoário, deixando-o corado. Esse fato implica que o método escolhido para avaliar a permeabilidade da membrana foi eficiente, pois era esperado que todos os protozoários fossem corados pelo corante.

De acordo com Rochelle et al. (1999) é fundamental que os procedimentos usados para a recuperação dos microrganismos não contenham efeitos prejudiciais em relação a viabilidade ou infectividade dos parasitos, visto que os ensaios são considerados para avaliar a eficiência da desinfecção.

Fujimoto et al. (2015) também estimou a permeabilidade da membrana de protozoários parasitos de peixes por meio do iodeto de propídeo e uma combinação de sondas fluorescentes, eles constataram que essa combinação entre sonda e o corante IP é uma alternativa rápida, fácil e precisa nos estudos de permeabilidade da membrana de parasitos no controle de peixes. Embora com algumas variações no método, os autores também relataram a eficiência do iodeto de propídeo para estimar a permeabilidade da membrana.

Albeledo-Lameiro et al. (2017) realizaram estudos de desinfecção fotocatalítica e avaliaram a eficiência do tratamento por meio da permeabilidade da membrana dos *Cryptosporidium parvum* ao incluírem o iodeto de propídeo, sendo que a matriz estudada foi a água destilada. Os autores confirmaram a eficiência do teste IP nos ensaios realizados ao constatarem que houve diminuição da permeabilidade da membrana em aproximadamente 90%.

Ao longo da pesquisa houve dificuldade de visualização dos protozoários, isso se deve às sujidades presentes, as quais são oriundas das matrizes selecionadas. Em algumas imagens com o filtro DIC, principalmente a Figura 18, foi possível visualizar a presença das *beads*, mesmo após as dissociações. O mesmo fenômeno foi reportado por Maciel e Sabogal Paz (2016) e Rochelle et al. (1999) quando observados oocistos e cistos.

Ao comparar os cistos de *Giardia spp.* da primeira (Figura 18) e da segunda (figura 20) dissociações no resíduo flotado uma pequena diferença em sua estrutura morfológica foi observada, sendo que na segunda dissociação esses protozoários sofreram uma leve deformidade.

5.5 Tratamento alcalino no resíduo flotado

O volume que foi inoculado diretamente no resíduo flotado foi obtido pela média aritmética de protozoários contabilizados em três alíquotas idênticas retiradas após homogeneização das suspensões (Tabelas 19 e 20).

Tabela 19: Número de oocistos de *Cryptosporidium spp.* e cistos de *Giardia spp.* nas suspensões (contagem utilizada nos tratamentos com 23 mg de cal/100 mL de resíduo flotado, com tempo de contato de 3 dias)

Poços da lâmina	Oocistos de <i>Cryptosporidium spp.</i> em 5 µL de suspensão		Total	Parasitas permeáveis negativos para IP (%)	Cistos de <i>Giardia spp.</i> em 5 µL de suspensão		Total	Parasitas permeáveis Positivos para IP (%)
	Negativo para IP (não corado)	Positivo para IP (corado)			Negativo para IP (não corado)	Positivo para IP (corado)		
1	25	318	343	7,3	28	199	227	12,3
2	59	433	492	12,0	33	215	248	13,3
3	64	464	528	12,1	20	124	144	13,9
Média			454	10,5	Média		206	13,2
Desvio padrão			98	2,8	Desvio padrão		55	0,8

Tabela 20: Número oocistos de *Cryptosporidium spp.* e cistos de *Giardia spp.* nas suspensões (contagem utilizada nos tratamentos com 16 mg de cal/100 mL de resíduo flotado e tempo de contato de 3 dias)

Poços da lâmina	Oocistos de <i>Cryptosporidium spp.</i> em 5 µL de suspensão		Total	Parasitas permeáveis negativos para IP (%)	Cistos de <i>Giardia spp.</i> em 5 µL de suspensão		Total	Parasitas permeáveis positivos para IP (%)
	Negativo para IP (não corado)	Positivo para IP (corado)			Negativo para IP (não corado)	Positivo para IP (corado)		
1	12	49	61	19,7	47	201	248	19,0
2	14	81	95	14,7	22	307	329	6,7
3	7	86	93	7,5	23	238	261	8,8
Média			83	14,0	Média		279	11,5
Desvio padrão			19	6,1	Desvio padrão		44	6,6

Ao analisar as Tabelas 19 e 20 verificou-se uma diminuição da viabilidade dos parasito, fenômeno associado ao aumento da idade das suspensões.

Aproximadamente 5.906 oocistos.L⁻¹ e 5.158 cistos.L⁻¹ foram inoculadas nas amostras dos tratamentos envolvendo o resíduo flotado com a dosagem de 23 mg de cal/100 mL e tempo de contato de 3 dias. Na outra condição do tratamento do resíduo flotado (a dosagem de 16 mg de cal/100 mL e o tempo de contato de 3 dias por amostra), foram inoculados, cerca de 4.980 oocistos.L⁻¹ e 4.749 cistos.L⁻¹ aos resíduos.

O pH do resíduo foi avaliado após dosar 10, 20 e 50% (massa de cal/massa de STF), isto para propor a dosagem que seria utilizada. O pH ficou em torno de 12 para as dosagens de 20 e 50 %, assim, os valores de 30 e 50 % foram escolhidos para o tratamento do resíduo flotado.

O volume de 100 mL foi eleito como o volume inicial para testar o tratamento com o objetivo de ter um pellet inferior ou igual a 0,5 mL, compatível com o método da IMS. A princípio, as amostras foram colocadas na estufa por sete dias à temperatura de 25°C com objetivo de simular um local de secagem natural, com dosagem de cal de 23 mg/100mL de resíduo flotado.

Posteriormente ao tempo previsto, o volume de amostra foi reduzido rapidamente e em algumas amostras secou (Figura 21).

Figura 21: Tratamento alcalino com dosagem de 23 mg/100mL de resíduo flotado, temperatura de 25°C e tempo de contato de 7 dias: a) Amostras de resíduo flotado após o tratamento (amostras totalmente secas indicadas com setas); b) Resíduo flotado totalmente seco

Posteriormente ao ensaio, os tempos de contato menores foram selecionados para evitar a secagem total da amostra. Nos outros testes, as amostras foram deixadas durante 3 e 5 dias em estufa a 25°C, representando o tratamento em ambiente natural de secagem com dosagem de cal.

A temperatura de 25°C foi adotada nessa pesquisa por ser um valor que praticamente qualquer região brasileira consiga atingir. Cavalcanti (2016) relatou que a temperatura na região centro-oeste do Brasil no verão varia entre 26 a 33°C, enquanto que na mesma região no inverno fica em torno de 20 a 25°C.

O tratamento alcalino dos resíduos foi feito em triplicata e os resultados estão nas Tabelas 21 a 24. As imagens de microscopia correspondentes estão na Figura 22.

Tabela 21: Porcentagem média de recuperação oocistos de *Cryptosporidium spp.* e cistos de *Giardia spp.* após tratamento alcalino dos resíduos flotados e respectivos desvios padrão e coeficiente de variação

Método de detecção	Tratamento	Parasito	Recuperação Média (%)	Desvio Padrão	Coeficiente de variação (%)
Centrifugação direta, adição de solução de dispersão ICN 7X a 1%, centrifugação e IMS	Resíduo flotado (16 mg cal/100mL, tempo de 3 dias a 25oC) ¹	Oocistos de <i>Cryptosporidium spp.</i>	0,60	0,10	16,66
		Cistos de <i>Giardia spp.</i>	0,24	0,22	89,21
	Resíduo flotado (23 mg cal/100mL, tempo de 3 dias a 25oC) ²	Oocistos de <i>Cryptosporidium spp.</i>	3,61	3,81	105,48
		Cistos de <i>Giardia spp.</i>	1,94	0,58	30,00

¹: Recuperação calculada em função do valor médio de protozoários inoculados: 5.906 oocistos.L-1 e 5158 cistos.L-1

²: Recuperação calculada em função do valor médio de protozoários inoculados: 4.980 oocistos.L-1 e 4749 cistos.L-1

Tabela 22: Porcentagem de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium spp.* e cistos de *Giardia spp.*, por dissociação ácida após tratamento alcalino dos resíduos flotados

Tratamento	Protozoário	Ensaio	1		2		3	
Resíduo flotado (16 mg cal/100mL, tempo de 3 dias a 25oC) ¹	Oocistos de <i>Cryptosporidium spp.</i>	Poço da lâmina	1D	2D	1D	2D	1D	2D
		Porcentagem de recuperação	0,60	0,10	0,40	0,10	0	0,60
	Cistos de <i>Giardia spp.</i>	Poço da lâmina	1D	2D	1D	2D	1D	2D
		Porcentagem de recuperação	0	0	0,11	0,32	0	0,32
Resíduo flotado (23 mg cal/100mL, tempo de 3 dias a 25oC) ²	Oocistos de <i>Cryptosporidium spp.</i>	Poço da lâmina	1D	2D	1D	2D	1D	2D
		Porcentagem de recuperação	0,25	0,59	5,42	2,54	1,44	0,59
	Cistos de <i>Giardia spp.</i>	Poço da lâmina	1D	2D	1D	2D	1D	2D
		Porcentagem de recuperação	0,48	1,45	0,58	1,94	0,78	0,58

¹: Recuperação calculada em função do valor médio de protozoários inoculados: 5906 oocistos.L⁻¹ e 5158 cistos.L⁻¹

²: Recuperação calculada em função do valor médio de protozoários inoculados: 4980 oocistos.L⁻¹ e 4749 cistos.L⁻¹

1D: primeira dissociação; 2D: segunda dissociação.

Tabela 23: Porecentagem de parasitos negativos para IP de oocisto de *Cryptosporidium spp.* e cistos de *Giardia spp.*, após tratamento alcalino dos resíduos flotados e respectivos desvios padrão e coeficiente de variação

Tratamento	Ensaio	Protozoário	Parasitos negativos para IP (%)	Desvio Padrão	Coeficiente de variação (%)
Resíduo flotado (16 mg cal/100mL, tempo de 3 dias a 25oC) 1	1	Oocisto de <i>Cryptosporidium spp.</i>	4,76	8,25	173,20
		Cistos de <i>Giardia spp.</i>	0,00	0,00	0,00
	2	Oocisto de <i>Cryptosporidium spp.</i>	0,00	0,00	0,00
		Cistos de <i>Giardia spp.</i>	NE	0,00	0,00
	3	Oocisto de <i>Cryptosporidium spp.</i>	0,00	0,00	0,00
		Cistos de <i>Giardia spp.</i>	0,00	0,00	0,00
Resíduo flotado (23 mg cal/100mL, tempo de 3 dias a 25oC) 2	1	Oocisto de <i>Cryptosporidium spp.</i>	0,00	0,00	0,00
		Cistos de <i>Giardia spp.</i>	0,00	0,00	0,00
	2	Oocisto de <i>Cryptosporidium spp.</i>	0,00	0,00	0,00
		Cistos de <i>Giardia spp.</i>	0,00	0,00	0,00
	3	Oocisto de <i>Cryptosporidium spp.</i>	0,00	0,00	0,00
		Cistos de <i>Giardia spp.</i>	0,00	0,00	0,00

NE: protozoários não encontrados após o tratamento

Tabela 24: Inativação em log de *Giardia spp.* e *Cryptosporidium spp.* em relação às dosagens de 16 e 23 mg cal/100mL -1, no tempo de contato de 5 dias, para o resíduo flotado.

Tratamento	Ensaio	Inativação em log ₁₀	
		<i>Giardia spp.</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
Resíduo flotado (16 mg cal/100mL, tempo de 3 dias a 25°C)	1	NC	0,69
	2	NC	NC
	3	NC	NC
Resíduo flotado (23 mg cal/100mL, tempo de 3 dias a 25°C)	1	NC	NC
	2	NC	NC
	3	NC	NC

NC: não foi possível calcular a remoção

No resíduo flotado houve recuperação dos parasitos de 0,6% e 3,61% para oocistos e de 0,24 % e 1,94% para cistos. Foram encontrados apenas parasitos negativos para IP na dosagem de 16 mg cal/100mL e tempo de contato de 3 dias no primeiro ensaio, sendo o log de inativação 0,69. Isso evidencia a resistência dos parasitos ao tratamento. Neste contexto, Walker et al. (1998) ao realizar pesquisas de laboratório e de campo mostraram que oocistos de *Cryptosporidium spp.* podem sobreviver por meses no solo em condições de frio e de escuridão.

Para a dosagem de 23 mg de cal/100mL de amostra e tempo de contato de 3 dias a permeabilidade da membrana foi reduzida, chegando até zerar. Com essa dosagem os poços da lâmina ficaram muito poluídos e com grande presença das *beads*, mesmo com isso nenhum protozoário viável foi encontrado. Um fato interessante é a presença de *beads* mesmo depois das dissociações ácidas (Figura 22 a, b, c). A existência de *beads* nos poços também foi mencionada por Maciel e Sabogal-Paz (2016) e Rochelle et al. (1999), para cistos e oocistos, respectivamente.

a) cisto de *Giardia spp.* visualizado após tratamento alcalino do resíduo flotado 16 mg de cal/100 mL de amostra, tempo de contato de 3 dias a 25°C. Imagens em 400x.

b) oocisto de *Cryptosporidium spp.* visualizado após tratamento alcalino do resíduo flotado (16 mg de cal/100 mL de amostra, tempo de contato de 3 a 25°C. Imagens em 200x.

c) cisto de *Giardia spp.* não viável visualizado após tratamento alcalino do resíduo flotado (23mg de cal/100 mL de amostra, tempo de contato de 3 dias a 25°C. Imagens em 400x.

Figura 22: Imagens de microscopia em i) DAPI, ii) FITC, iii) IP e iv) DIC após o tratamento do resíduo flotado

Na Figura 22 aii) é possível visualizar a alteração morfológica da *Giardia spp.* após o tratamento. Uma provável explicação para essa alteração é a influência do óxido de cálcio na estrutura do cisto.

Hijikata et al. (2016) avaliaram os mecanismos de ação do tratamento alcalino com com óxido de cálcio e cinzas. Os microrganismos indicadores usados foram a bactéria *Escherichia coli* e o vírus *colifuga MS2*. Os resultados mostraram que o óxido de cálcio gerou danos à membrana externa e às atividades enzimáticas de *Escherichia coli*, e em relação ao *colifuga*, este teve perda de sua infecciosidade devido ao dano parcial da cápside e à exteriorização de RNA devido a um pH elevado. Esses resultados indicam que o tratamento alcalino do composto utilizando óxido de cálcio e cinzas pode ser eficaz.

Louwakul, Saelo e Khemaleelakul (2017), avaliaram a eficiência do efeito antibacteriano de nanopartículas de óxido de cálcio e nanopartículas de hidróxido de cálcio

contra a bactéria *Enterococcus faecalis*. Os pesquisadores mostraram que ambos tiveram resultados antibacterianos positivos e que as nanopartículas de hidróxido de cálcio foram mais eficientes que as de óxido de cálcio.

Park et al. (2017) investigaram o potencial bactericida de óxido de cálcio (CaO) contra células planctônicas em caldo de soja trípico e biofilmes de *Listeria monocytogenes* em superfícies de covas de ovo. Os resultados comprovaram que o óxido de cálcio poderia ser um potencial substituto para os desinfetantes químicos que são usados atualmente.

He et al. (2015) realizaram a conversão hidrotérmica de lodo de esgoto desidratado em água para avaliar a evolução dos produtos dessa reação sob os efeitos da temperatura e pressão com a adição de óxido de cálcio. Nos resultados foi possível comprovar que o aditivo de CaO, além de facilitar a hidrólise, e quebra de compostos orgânicos, também aumentou a fixação adicional de elementos inorgânicos e ânions.

Czechowski e Marcinkowski (2006) trataram o lodo de esgoto da estação de tratamento de Krotoszyn na Polônia, durante 1 e 35 dias, com 3% , 6% , 9% , 12% e 24% da massa seca adicionando hidróxido de cálcio. Os pesquisadores notaram que a concentração de hidróxido de cálcio na mistura de lodo provocava a liberação de amônia e reduzia o conteúdo de microrganismos patogênicos.

O tratamento alcalino do resíduo empregando óxido de cálcio em estação de tratamento de água não foi testado em (oo) cistos de protozoários ou em qualquer outro parasito, pois artigos ou outras fontes de conhecimento associados a essa temática não foram encontrados.

5.6 Tratamento da ALF com ozonização

Para os ensaios de ozônio, primeiramente, foram calculados os valores da produção de ozônio para cada condição proposta. Para a dosagem de $10 \text{ mg O}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ e 5 min de tempo de contato, o valor da produção foi de $0,36 \text{ gO}_3 \cdot \text{h}^{-1}$, enquanto que para a dosagem $7,5 \text{ mg O}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ para o tempo de contato de 10 min, o valor foi de $0,13 \text{ gO}_3 \cdot \text{h}^{-1}$.

A quantidade de protozoários inoculados foi de aproximadamente $15.000 \text{ oocistos} \cdot \text{L}^{-1}$ e $30.000 \text{ cistos} \cdot \text{L}^{-1}$ nas amostras de ALF nas duas condições (Tabelas 25 a 27).

Tabela 25: Número de oocistos de *Cryptosporidium spp.* e cistos de *Giardia spp.* nas suspensões para o tratamento com ozônio da primeira condição (tempo de contato 5 min dosagem 10 mg O₃.L⁻¹)

Poços da lâmina	Oocistos de <i>Cryptosporidium spp.</i> em 5 µL de suspensão		Total	Parasitas permeáveis negativos para IP (%)	Cistos de <i>Giardia spp.</i> em 5 µL de suspensão		Total	Parasitas permeáveis – positivos para IP (%)
	Negativo para IP (não corado)	Positivo para IP (corado)			Negativo para IP (não corado)	Positivo para IP (corado)		
1	41	112	153	27	0	3427	3427	0
2	35	99	134	26	0	3822	3822	0
3	78	54	132	59	0	4854	4854	0
Média			140	37,3	Média		4035	0
Desvio padrão			12	15,3	Desvio padrão		737	0

Tabela 26: Número de oocistos de *Cryptosporidium spp.* e cistos de *Giardia spp.* nas suspensões para o tratamento com ozônio da segunda condição (tempo de contato 5 min dosagem 10 mg O₃.L⁻¹)

Poços da lâmina	Oocistos de <i>Cryptosporidium spp.</i> em 5 µL de suspensão		Total	Parasitas permeáveis negativos para IP (%)	Cistos de <i>Giardia spp.</i> em 5 µL de suspensão		Total	Parasitas permeáveis – positivos para IP (%)
	Negativo para IP (não corado)	Positivo para IP (corado)			Negativo para IP (não corado)	Positivo para IP (corado)		
1	8	89	97	8	0	3427	3427	0
2	6	61	67	9	0	3822	3822	0
3	53	141	194	27	0	4854	4854	0
Média			120	15	Média		4034	0
Desvio padrão			54	8,7	Desvio padrão		736,8	0

Tabela 27: Concentrações de ozônio aplicado, ozônio do *off-gas*, ozônio residual dissolvido, ozônio consumido e eficiências na transferência de massa de ozônio para as dosagens de 7,5 e 10 mgO₃L⁻¹ e os tempos de contato de 10 e 5 min, respectivamente

Ensaio	Ozônio aplicado (mgO ₃ L ⁻¹)	Tempo de contato (min)	Ozônio do <i>off-gas</i> (mgO ₃ L ⁻¹)	Ozônio residual dissolvido (mgO ₃ L ⁻¹)	Ozônio consumido (mgO ₃ L ⁻¹)	Ozônio transferido (%)
1	7,5	10	0,1	1,15	6,3	84
2	7,5	10	0,2	0,79	6,5	86
3	7,5	10	0,2	0,53	6,7	89
Média	7,5	10	0,16	0,82	6,5	86
1	10	5	0,4	-0,01 ¹	9,6	96
2	10	5	0,7	1,44	7,9	79
3	10	5	0,9	1,6 ²	7,4	74
Média	10	5	0,66	1	8,3	83

Nota 1: valor abaixo da faixa de medição

Nota 2: valor acima da faixa de medição

Para a primeira condição de tratamento (tempo de contato de 5 min e dosagem de 10 mg O₃.L⁻¹), a eficiência na transferência de massa com base na média feita dos ensaios 1, 2 e 3 da Tabela 27 foi de 89%, enquanto para a segunda (condição o valor foi 83 tempo de contato 10 min dosagem 7,5 mg O₃.L⁻¹) obteve-se o valor de 83%. Portanto, a eficiência de transferência de massa pode ser considerada boa.

Na Tabela 28, estão apresentados os dados obtidos da desinfecção de *Giardia muris*. e *Cryptosporidium spp.* em log para as duas condições de tratamento.

Tabela 28: Inativação em log de *Giardia muris*. e *Cryptosporidium spp.* em relação às dosagens de 7,5 e 10 mgO₃L⁻¹, quando os tempos de contato eram 10 e 5 min, respectivamente

Tratamento	Ensaio	Inativação em log ₁₀	
		<i>Giardia muris</i> .	<i>Cryptosporidium parvum</i>
ALF (tempo de contato 5 min dosagem 10 mg O ₃ .L ⁻¹)	1	NC	NC
	2	NC	NC
	3	NC	NC
ALF (tempo de contato 10 min dosagem 7,5 mg O ₃ .L ⁻¹)	1	NC	NC
	2	NC	NC
	3	NC	NC

NC: não foi possível calcular a remoção.

Apenas no primeiro ensaio da primeira condição de tratamento foram encontrados protozoários, sendo três *Cryptosporidium* spp., todos positivos para o teste de IP. Nos demais ensaios não foram encontrados cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*. Por causa disso, não foi possível realizar os cálculos para verificar o log de inativação.

O tratamento com ozônio das matrizes de ALF foi feito em triplicata e os valores obtidos para as duas condições estão nas Tabelas 29 a 31.

Tabela 29: Porcentagem média de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. após tratamento por ozônio da matriz ALF e respectivos desvios padrão

Método de detecção	Tratamento	Parasito	Recuperação Média (%)	Desvio Padrão
Centrifugação direta, adição de solução de dispersão ICN 7X a 1%, centrifugação e IMS	ALF (tempo de contato 5 min dosagem 10 mg O ₃ .L ⁻¹) ¹	Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.	3x10 ⁻⁴	0
		Cistos de <i>Giardia</i> spp.	0	0
	ALF (tempo de contato 10 min dosagem 7,5 mg O ₃ .L ⁻¹) ¹	Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.	0	0
		Cistos de <i>Giardia</i> spp.	0	0

¹: Recuperação calculada em função do valor médio de protozoários inoculados: 15.000 oocistos.L⁻¹ e 30.000 cistos.L⁻¹

Tabela 30: Porcentagem de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. por dissociação ácida após tratamento por ozônio da matriz ALF

Tratamento	Protozoário	Ensaio	1		2		3	
ALF (tempo de contato 5 min dosagem 10 mg O ₃ .L ⁻¹) ¹	Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.	Poço da lâmina	1D	2D	1D	2D	1D	2D
		Porcentagem de recuperação	0	0	0	0	0	0
	Cistos de <i>Giardia</i> spp.	Poço da lâmina	1D	2D	1D	2D	1D	2D
		Porcentagem de recuperação	0	0	0	0	0	0
ALF (tempo de contato 10 min dosagem 7,5 mg O ₃ .L ⁻¹) ¹	Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.	Poço da lâmina	1D	2D	1D	2D	1D	2D
		Porcentagem de recuperação	0	0	0	0	0	0
	Cistos de <i>Giardia</i> spp.	Poço da lâmina	1D	2D	1D	2D	1D	2D
		Porcentagem de recuperação	0	0	0	0	0	0

¹: Recuperação calculada em função do valor médio de protozoários inoculados: 15000oocistos.L⁻¹ e 30000 cistos.L⁻¹

1D: primeira dissociação; 2D: segunda dissociação.

Tabela 31: Porecentagem de parasitos negativos para IP de oocisto de *Cryptosporidium spp.* e cistos de *Giardia spp.*, após tratamento com ozônio da matriz ALF e respectivos desvios padrão e coeficiente de variação

Tratamento	Ensaio	Protozoário	Parasitos positivos para IP (%)	Desvio Padrão	Coeficiente de variação (%)
ALF (tempo de contato 5 min dosagem 10 mg O ₃ .L ⁻¹)	1	<i>Oocistos de Cryptosporidium parvum</i>	0,0001	0,00	0,00
		<i>Cistos de Giardia muris</i>	NE	NE	NE
	2	<i>Oocistos de Cryptosporidium parvum</i>	NE	NE	NE
		<i>Cistos de Giardia muris</i>	NE	NE	NE
	3	<i>Oocistos de Cryptosporidium parvum</i>	NE	NE	NE
		<i>Cistos de Giardia muris</i>	NE	NE	NE
ALF (tempo de contato 10 min dosagem 7,5 mg O ₃ .L ⁻¹)	1	<i>Oocistos de Cryptosporidium parvum</i>	NE	NE	NE
		<i>Cistos de Giardia muris</i>	NE	NE	NE
	2	<i>Oocistos de Cryptosporidium parvum</i>	NE	NE	NE
		<i>Cistos de Giardia muris</i>	NE	NE	NE
	3	<i>Oocistos de Cryptosporidium parvum</i>	NE	NE	NE
		<i>Cistos de Giardia muris</i>	NE	NE	NE

NE: protozoários não encontrados após o tratamento

Verificou-se que não houve nenhum valor de recuperação para cistos de *Giardia muris*, como descrito anteriormente, e um pequeno valor foi obtido de oocistos de *Cryptosporidium spp.*, 0,0001% de recuperação, encontrado na primeira condição do tratamento (tempo de contato de 5 min com dosagem 10mg O₃.L⁻¹). De acordo com White (1992), oocistos de *Cryptosporidium spp.* são mais resistentes que os cistos de *Giardia spp.* no tratamento por ozonização.

Todos os oocistos de *Cryptosporidium spp.* encontrados foram positivos para o teste do IP, conforme pode ser observado na Tabela 31. Em relação aos cistos de *Giardia muris*, todos os encontrados nas suspensões usadas para a inoculação apresentaram-se positivas para o teste do IP, isso mostra que antes do início dos ensaios de desinfecção existia a permeabilidade da membrana para esses protozoários.

Na Figura 23 é possível ver a imagem do oocisto de *Cryptosporidium* spp. em DAPI, IP, DIC e FITC obtidas após os ensaios de desinfecção com ozônio.

Figura 23: Oocisto de *Cryptosporidium* spp. visualizado após a primeira dissociação ácida na matriz ALF, obtido no ensaio de desinfecção com ozônio. Imagens em 400x: a) DAPI; b) FITC; c) IP; d) DIC

Na Figura 23b observa-se um oocisto de *Cryptosporidium* spp. corado no filtro FITC, isto significa que existe permeabilidade da membrana. Hsu e Yeh (2003) avaliaram tratamentos com ozônio em amostras de água pré e pós-ozonização de 0,3 - 3,5 e 1,6 - 4,8 mg.L⁻¹, respectivamente e as conclusões apontaram que a pré-ozonização pode danificar ou destruir eficazmente a estrutura dos protozoários, principalmente de cistos de *Giardia*.

Ao avaliar as alterações estruturais e bioquímicas em cistos de *Giardia lamblia* expostas ao ozônio, Widmer et al. (2002) notaram profundas alterações estruturais na parede do cisto. Eles testaram a concentração de ozônio inicial de 1,5 mg.L⁻¹ para 0, 30, 60, 120 s,

sendo que a exposição superior de 60 s gerou degradações extensas de proteínas e no desaparecimento da parede do cisto.

Miranda (2014) em ensaios de ozonização com efluentes provindos de alagados construídos conseguiu, para a dose de $5 \text{ mgO}_3\text{L}^{-1}$ e tempos de contato de 5 e 10 min, eficiência na transferência de massa o valor de 94,4%, o qual é superior ao obtido nessa pesquisa, embora as dosagens sejam diferentes.

Silva et al. (2010) atingiram eficiência na transferência de massa no valor de 76% para as doses de $5 \text{ mgO}_3\text{L}^{-1}$ e tempo de contato de 5 min, empregadas para o tratamento de efluentes de esgoto sanitário com ozônio. Comparando o valor obtido com os desta pesquisa, as eficiências na transferência obtidas foram maiores, entretanto, as dosagens usadas foram distintas.

A eficiência de transferência pode ser influenciada pela temperatura, pois essa afeta a solubilidade do ozônio, isto é, o aumento da temperatura da água reduz a solubilidade do ozônio, o qual interfere na taxa de reação.

Nos trabalhos de Miranda (2014), a temperatura ficou entre 17 a 24°C, enquanto as de Silva et al. (2010) foram entre 20 a 30°C. Nesse trabalho, a temperatura ficou entre 21 e 23°C, o que não alteraria a eficiência do processo.

Silveira (2004) e Lapolli et al. (2010) mencionaram que o aumento da temperatura não interfere substancialmente na taxa de desinfecção do ozônio. Wickramanayake, Rubin e Sproul (1984) relataram que a resistência dos cistos de *Giardia lamblia* parece aumentar quando a temperatura diminui de 25 para 5°C em pH neutro.

De acordo com Soares (2007), a eficiência de transferência de massa de ozônio da fase gasosa para a líquida é influenciada por elementos que são: a vazão do gás, a concentração do ozônio na fase gasosa, a geometria da câmara de contato, as condições de mistura, o tamanho e as características físicas e químicas da matriz estudada.

Lapolli et al. (2010) relatam que grande parte dos dados disponíveis na literatura mostram que a eficiência da desinfecção por ozônio não é tão influenciada na faixa de pH dos efluentes domésticos (variando entorno de 6 a 8) e que, a influência do pH pode ser devido ao microrganismo-alvo, e não a especiação do ozônio em água, que é influenciada pelo pH. O pesquisador Soares (2007) não notou, em seus trabalhos, relevantes variações do pH e da temperatura alterassem os resultados da ozonização.

Os ensaios realizados por Passos et al., (2014) para inativar cistos de *Giardia spp.* em águas residuais empregando o método de concentração de FCC, sem a etapa de IMS,

obtiveram 75% de inativação, com dosagem de $11 \text{ mgO}_3\text{L}^{-1}$ e tempo de contato de 10 min (CT de $110 \text{ mg.min.L}^{-1}$).

Os resultados de Wickramanayake, Rubin e Sproul (1984) mostram que conseguiram 2 log de inativação de cistos de *Giardia lamblia* em água destilada, com CT de $0,53 \text{ mg.min.L}^{-1}$, empregando a técnica de excitação para análise da viabilidade dos cistos.

Finch et al. (1993) obtiveram o mesmo valor de log de inativação e eficiência de remoção para cistos de *Giardia lamblia*, os quais foram inoculados em amostra de água e concentrados por centrifugação, foi preciso usar CT $0,65 \text{ mg.min.L}^{-1}$, com técnica de infectividade *in vivo*.

No presente trabalho não foi possível calcular a devido à inexistência de protozoários negativos para o teste IP após os ensaios. Nessa pesquisa praticamente não houve recuperação de protozoários, entre os motivos, se destacam: i) excessiva manipulação de amostras oriundas das diversas etapas e procedimentos relacionados à metodologia, como vidrarias e tubos; ii) a interação do ozônio com os protozoários; iii) as sujidades presentes nas lâminas dos poços; iv) a impossibilidade de adicionar *Tween* 80 na coluna de acrílico do ozonizador e; v) a escolha do método de concentração de protozoários.

Os trabalhos de Santos et al. (2011), Robertson et al. (2000) e Santos (2015) elencam alguns fatores para a baixa recuperação dos (oo) cistos, dentre eles estão a enorme manipulação das amostras provenientes das inúmeras etapas e técnicas relacionados ao método, como a transferência de volumes entre tubos e a retirada de volumes sobrenadantes.

Santos e Daniel (2017) realizaram um estudo sobre a capacidade de flotação de ar dissolvido, em escala de bancada, na remoção dos cistos de *Giardia* de efluente anaeróbio. Diferentes tempos de floculação com diversos gradientes de velocidade média foram testados. Os autores concluíram que esse método conseguiu remover médias de log na faixa de 2,52 – 2,62 para cistos de *Giardia*. Com base nesses pesquisadores, uma das justificativas da inexistência de valores de recuperação de *Giardia* pode ser a interação da flotação do ozônio com esse protozoário.

Em Castro-Hermida et al. (2010), a concentração média de cistos de *Giardia spp.* e oocistos de *Cryptosporidium spp.* em rios de áreas recreacionais, em estações de tratamento de água e estações de esgoto, foram avaliados empregando sistema de filtros Filt-Max como metodologia de concentração da amostra, seguido do método de purificação IMS e o uso do IP para determinar a viabilidade, ou seja, se a membrana é permeável. Os estudos apontaram que a viabilidade dos (oo) cistos variou entre 90 e 95%, em todas as amostras investigadas.

Olvera e Ilangovan (2008) fizeram estudos de desinfecção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em água usando o tratamento ultrassônico, os estudos de viabilidade foram feitos com base no IP. Os autores constataram que posteriormente a 2 min de exposição a viabilidade caiu de 90 para 87,82% e depois de 4 min, o número de oocistos não viáveis, isto é, positivos para IP aumentou para o valor de 94,02%.

Neste trabalho, a quantidade de protozoários inoculados na matriz para ensaios com ozônio foi grande, por causa do objetivo da pesquisa, que foi avaliar a eficiência de desinfecção do ozônio estimando a viabilidade pela permeabilidade da membrana dos microrganismos por meio do teste com IP. Porém, devido às dificuldades da pesquisa com esses protozoários, praticamente não houve recuperação desses, inviabilizando a análise do objetivo.

5.7 Comparação entre as espécies de *Giardia spp.* e *Giardia muris*

Na última etapa da pesquisa, nos ensaios de desinfecção com ozônio, houve a necessidade de realizar a troca das suspensões de *Giardia*, as quais inicialmente eram *Giardia spp.* por suspensões de *Giardia muris*. Devido a essa alteração, foram feitos alguns ensaios para visualização da diferença morfológica desses protozoários. Na Figura 24 é possível visualizar a *Giardia spp.* e a *Giardia muris*.

Figura 24: As setas vermelhas indicam a *Giardia spp.* e as setas amarelas a *Giardia Muris*. Imagens em 400x: a) DAPI; b) FITC; c) IP; d) DIC

Visualmente, a *Giardia spp.* da Figura 24 é maior, mais larga e sua fluorescência é mais brilhante/intensa, enquanto que a *Giardia muris* é menor e sua fluorescência é bastante fraca. Usa-se a sigla *spp.* porque não se sabe qual é a espécie, ao passo que a *Giardia muris* é comumente encontrada em roedores, aves e peixes (FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012)

Friend (1966) realizou um estudo em microscópio eletrônico que demonstra a estrutura fina do trofozoíto de *Giardia muris* no lúmen do duodeno de um rato. Os pesquisadores mostram que essa espécie é arredondada, com superfície dorsal convexa e uma ventral côncava.

Adam (2001) descreve que a *Giardia lamblia* quando infecta seres humanos ou outros mamíferos causa diarreia. Essa espécie de *Giardia* pode ser discernida de outras espécies por meio da microscopia leve ou eletrônica.

Finch et al. (1993) compararam a inativação do ozônio de *Giardia muris* e *Giardia lamblia* em 0,05 M de ozônio em tampão de fosfato livre de demanda em bancada,

empregando modelo animal apto para determinar a viabilidade dos cistos antes e depois da ozonização. Obtiveram que a resistência de *Giardia lamblia* ao ozônio não foi significativamente diferente da de *Giardia muris* nas condições de estudo.

Mofidi et al. (2012) compararam o efeito gerado da luz ultravioleta germicida (UV) nos cistos de *Giardia lamblia* e *Giardia muris*, a qual foi determinada por infectividade animal. Os resultados comprovaram que ambos os cistos de *Giardia lamblia* e *Giardia muris* apresentaram semelhante sensibilidade à luz UV.

As pesquisas citadas anteriormente comprovam que não há diferenças expressivas nos resultados das desinfecções realizadas em cistos de *Giardia lamblia* e *Giardia muris*. Portanto, como houve a necessidade de substituir as suspensões de *Giardia* nessa pesquisa, possivelmente os resultados realizados com a *Giardia spp.* não seriam distintos.

5.8 Análise crítica do tópico resultados e discussão

O método de concentração de protozoários influencia diretamente na recuperação, sendo que existem inúmeras discussões sobre qual é melhor e mais confiável. O método escolhido neste trabalho teve como base a preservação do pH da amostra, pois este era fundamental para o desenvolvimento da pesquisa.

Nessa pesquisa, o uso do IP foi para verificar a viabilidade da membrana, ou seja, caso ocorresse dano na membrana dos protozoários o corante entrava na estrutura e deixava o microorganismo corado. Portanto, o uso do IP foi satisfatório no projeto.

Em todos os ensaios de óxido de cálcio foi observado sujicidades nos poços das lâminas. Isso pode ter comprometido a recuperação dos protozoários, visto que dificultou a contagem.

Os valores escolhidos para a ozonização possivelmente fizeram os protozoários oxidarem. Para o trabalho não foi interessante porque o objetivo principal era avaliar se o IP entrava ou não na estrutura do protozoário.

6. CONCLUSÕES

A dosagem de PAC empregada foi eficaz na remoção dos parâmetros físico-químicos presentes na água de estudo.

Entre os três métodos de detecção de protozoários testados (floculação em carbonato de cálcio (FCC) com IMS, centrifugação direta com IMS e centrifugação direta com a adição de solução de dispersão detergente ICN 7X (MP BIO®) a 1,0% na amostra, homogeneização e posterior IMS), o escolhido para essa pesquisa foi o último, porque não alterava a permeabilidade da membrana dos protozoários.

Para os ensaios de controle de qualidade do método usando as suspensões, a recuperação de *Giardia spp.* para as matrizes ALF e resíduo, alcançaram os valores de referência do Método 1623.1. Entretanto, os oocistos de *Cryptosporidium parvum* em ambas as matrizes não atenderam aos mesmos padrões.

Nos ensaios de controle do método empregando *EasySeed*®, somente os valores de cistos de *Giardia spp.* recuperados da matriz resíduo estavam dentro da faixa de referência do Método 1623.1. Os demais não conseguiram atingir os valores do padrão.

Na segunda dissociação ácida do método de purificação usado (IMS) foram encontrados valores significativos de *Giardia*, isso mostra a possibilidade desse protozoário estar ligado mais fortemente às esferas magnéticas.

Para os ensaios de desinfecção dos resíduos empregando óxido de cálcio, na dosagem de 23 mg cal/100mL no tempo de contato de 3 dias a 25°C não foram encontrados nenhum protozoário positivo para o teste IP, o que deixa esta primeira condição satisfatória. Em contrapartida, na dosagem de 16 mg cal/100mL no tempo de contato de 3 dias a 25°C foram encontrados protozoários negativos para IP, isto é, sem alteração ou mínima alteração na membrana que impediu a entrada desse corante.

Para as duas condições de desinfecção do ozônio (primeira condição: tempo de contato 5 min dosagem 10 mg O₃.L⁻¹ e segunda condição: tempo de contato 10 min dosagem 7,5 mg O₃.L⁻¹) praticamente não foram encontrados protozoários. Portanto, necessita-se realizar novos ensaios com outras dosagens e tempos de contato.

7. RECOMENDAÇÕES

Realizar ensaios de recuperação de protozoários sem a desinfecção e com a desinfecção, para depois verificar a quantidade de protozoários e condições ideais, e assim, fazer um novo ensaio. Mesmo que financeiramente o custo seja elevado.

Trocar o método de purificação usado, separação imunomagnética (IMS) por outro viável economicamente.

Testar o óxido de cálcio usado na construção civil como desinfetante.

Testar outro corante, que não seja o iodeto de propídio, para verificar a permeabilidade da membrana.

Testar outras dosagens e tempo de contato na desinfecção com ozônio.

Realizar a terceira e talvez a quarta dissociação ácida no método de purificação (IMS).

8. BIBLIOGRAFIA

ABELEDOLAMEIRO, M. J. et al. Photocatalytic inactivation of the waterborne protozoan parasite *Cryptosporidium parvum* using $\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ under simulated and natural solar conditions. *Catalysis Today*, v. 280, p. 132-138, 2017.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 11833 –Hipoclorito de sódio, 3p. 1991a.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12279 –Amostragem de hipoclorito de sódio, 2p. 1991e.

ACHON, C. L.; CORDEIRO, J. S. Destinação e disposição final de lodo gerado em ETA - Lei 12.305/2010. In: XIX Exposição de Experiências Municipais em Saneamento. 45º Assembléia nacional do ASSEMAE – Saneamento Ambiental: políticas integradas com participação social, de 24 a 29 de maio de 2015, Poços de Caldas, SP, Brasil, ID: I-151, 2015.

ACHON, C. L.; CORDEIRO, J. S. Gestão de resíduos dos serviços de saneamento (água e esgoto), a Lei 12.305/2010 e os desafios no Brasil. In: XXXV Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental (AIDIS), Anais. Catagena - Colômbia, 21 a 24 de agosto de 2016, ID 1955, 7 p. 2016.

ALLEN, M.J.; CLANCY, J.L.; RICE, E.W. The plain, hard truth about pathogen monitoring. *J. AWWA*, v.92, n.2, p.64-76, 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.

ANDREOLI, C. V. (Ed. Tec.). Programa de Pesquisa em Saneamento Básico PROSAB: Uso e manejo do lodo de esgoto na agricultura. Curitiba. Sanepar, 98 p. 1999.

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

ANDREOLI, F. C.; SABOGAL-PAZ, L. P. Coagulation, flocculation, dissolved air flotation and filtration in the removal of *Giardia spp.* and *Cryptosporidium spp.* from water supply. *Environmental technology*, n. just-accepted, p. 1-27, 2017.

APHA; AWWA; WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd ed. Washington, DC, 2012.

ASSAVASILAVASUKUL, P., LAU, B. L., HARRINGTON, G. W., HOFFMAN, R. M., BORCHARDT, M. A. 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.

BASTOS, R. K. X.; BRANDÃO, C. C. S.; CERQUEIRA, D. A. Tratamento de Água e Remoção de Protozoários. In: PÁDUA, L. P. (Coord.). Remoção de microrganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano. Rio de Janeiro: ABES, cap. 4, p.109-150. (Projeto PROSAB). 2009.

BELL, K. et al. Enhanced and optimized coagulation for particulate and microbial removal. Water Research Foundation, Denver, 2000.

BENETTI, A. D.; DE LUCA, S. J.; CYBIS, L. F. Tratamento de Água e Remoção de Protozoários. In: PÁDUA, L. P. (Coord.). Remoção de gosto e odor em processos de tratamento de água. Rio de Janeiro: ABES, cap. 8, p.293-326. (Projeto PROSAB). 2009.

BONI, D. M. Avaliação da viabilidade de cistos de *Giardia spp.* e oocistos de *Cryptosporidium parvum* em água filtrada obtida após tratamento convencional com flotação e ozonização. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, 2016.

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, Anais Eletrônicos. Punta del Este, Montevideo, Uruguai. 2006.

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.

BRASIL. Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 2010.

BRASIL. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, 2011.

BRASIL. Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017. Dispõe sobre a consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União, Brasília, 2017.

CACCIÒ, S. M.; DE GIACOMO, M.; AULICINO, F. A.; POZIO, E. *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 6, p. 3393–3398, 2003.

CACCIÒ, S. M.; PUTIGNANI, L. Epidemiology of human Cryptosporidiasis. In: CACCIÒ, S. M.; WIDMER, G. *editors*, 2014. *Cryptosporidium: parasite and disease*. Springer, 2014.

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

CASTRO-HERMIDA, J. A.; GARCÍA-PRESEDO, I.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; MEZO, M. *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in water bodies of Galicia, Spain. *Water Research*, v. 44, n. 20, p. 5887–5896, 2010.

CAMPBELL, A. T.; ROBERTSON, L. J.; SMITH, H. V. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: Correlation of in vitro excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, n. 11, p. 3488–3493, 1992.

CANTUSIO NETO, R.; SANTOS, L.U.; SATO, M.I.Z., FRANCO, R.M.B., *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.

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

CARDOSO, L.S.; DE CARLI, G.A.; DE LUCA, S.J. *Cryptosporidium* e *Giardia* em efluentes biologicamente tratados e desinfetados. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v.8, p.285-290, 2003.

CARVALHO, T. T. R. Estado Atual do Conhecimento de *Cryptosporidium* e *Giardia*. *Revista de Patologia Tropical*. Vol. 38, 1-16. 2009.

CANTUSIO NETO R., SANTOS LU, SATO MIZ, FRANCO RMB. *Cryptosporidium spp.* and *Giardia spp.* insurface water supply of Campinas, Southeast Brazil. *Wat Sci Tech* 62: 217-222, 2010.

- CAVALCANTI, I. F. A. Tempo e clima no Brasil. Oficina de textos, 2016.
- CHALMERS, R.M.; KATZER, F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. Trends in Parasitology, v.29, p.237-251, 2013.
- CLANCY, J.L.; BUKHARI, Z.; MCCUIN, R.M.; MATHESON, Z.; FRICKER, C.R. USEPA Method 1622. J. AWWA, v.91, p.60-67, 1999.
- CLANCY, J. L. (Ed). New Approaches for Isolation of *Cryptosporidium* and *Giardia*. American Water Works Association, 2000.
- CRAUN, G.F.; CALDERON, R.L.; CRAUN, M.F. Outbreaks associated with recreational water in the United States. Int. J. Environ. Health Res., v.15, p.243-262, 2005.
- 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.
- CORDEIRO, J.S. Processamento de lodos de Estações de Tratamento de Água (ETAs). In: ANDREOLI, C.V. et al. Resíduos sólidos do saneamento: Processamento, reciclagem e disposição final. Rio de Janeiro: ABES, Projeto PROSAB. 2001.
- CORDEIRO, J.S., REIS, R. F.; ACHON, C.L.; BARROSO, M. M. Evolução dos Leitões de Drenagem (LD) no Brasil – uma década de avanços. In: XXXIV Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental (AIDIS), Anais. Monterrey - México, 2 a 6 novembro de 2014, cod. 332-T8-Cordeiro-Brasil-1, 8 p. 2014.
- CORNWELL, D.A.; BISHOP, M.M.; GOULD, G.R.; VANDERMEYDEN, C. Handbook of Practice – Water Treatment Plant Waste Management. American Water Works Association, Denver, 1987.
- CORNWELL, D.A.; LEER, R. G. Waste stream recycling: Its effect on water quality. Journal AWWA, 1994.
- COSTA, H.; DANIEL, L. (Coord.). Desinfecção de efluentes sanitários, remoção de patógenos e remoção de substâncias nocivas. Vitória: PROSAB, 2002.
- CZECHOWSKI, F.; MARCINKOWSKI, T. Sewage sludge stabilisation with calcium hydroxide: effect on physicochemical properties and molecular composition. Water research, v. 40, n. 9, p. 1895-1905, 2006.

DA SILVA, S. B.; DE MELLO LUVIELMO, M.; GEYER, M. C.; PRÁ, I. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 32, n. 2, p. 659–682, 2011.

DANIEL, L. A. (Coord.). Métodos Alternativos de Desinfecção da Água. Processos de Desinfecção e Desinfetantes Alternativos na Produção de Água Potável. São Carlos: RiMa: 139 p. (Projeto PROSAB), 2001.

DAI PRA, M. A. et al. Uso de cal virgem para o controle de *Salmonella spp.* e *Clostridium spp.* em camas de aviário. *Ciência Rural*, v. 39, n. 4, p. 1189-1194, 2009.

DALSASSO, R. L., & SENS, M. L. Direct filtration with pre-flocculation and coagulation with aluminium sulfate and poly aluminium chloride: an eutrophicated water source case study. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, 11(3), 241-249. 2006.

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.; DANTAS, A. D. B.; VOLTAN, P. E. N. Tratabilidade de água e dos resíduos gerados em estações de tratamento de água. São Carlos: Editora LDiBe, 2011.

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A.D.B.; VOLTAN, P.E.N. Métodos e técnicas de tratamento e disposição dos resíduos gerados em estações de tratamento de água. Editora LDiBe, 2012.

DI GIORGIO C. L., GONZALEZ D.A., HUITT C.C. *Cryptosporidium* and *Giardia* recoveries in natural Waters by using EPA method 1623. *Appl Environ Microbiol* 68: 5952-5955, 2002.

DOS SANTOS, L. U. et al. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium spp.* e cistos de *Giardia spp.* em amostras de esgoto bruto ou tratado: avaliação crítica dos métodos. *Eng Sanit Ambient*, v. 16, n. 2, p. 115-120, 2011.

DOWD, S. E.; PILLAI, S. D. A rapid viability assay for *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts for use in conjunction with indirect fluorescent antibody detection. *Canadian journal of microbiology*, v. 43, n. 7, p. 658–662, 1997.

DOS SANTOS, P. R.; DANIEL, L. A. Occurrence and removal of *Giardia spp.* cysts and *Cryptosporidium spp.* oocysts from a municipal wastewater treatment plant in Brazil. *Environmental Technology*, v. 38, n. 10, p. 1245-1254, 2017.

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

EDZWALD, J.; HAARHOFF, J. Dissolved air flotation for water clarification. McGraw Hill Professional, 2011.

EPA - Environmental Protection Agency. ICR method. Detecting *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water by a fluorescent antibody procedure. US Environmental Protection Agency. Office of ground water and drinking water. EPA/ 814-B-95-003, 1995.

EPA - Environmental Protection Agency. Office of Water. Method 1622: *Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/FA. EPA 821-R-99-001. US Environmental Protection Agency. Washington DC, EEUU, 1999.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. International Journal for Parasitology, v. 30, p.1305-1322, 2000.

FERREIRA FILHO, S. S.; WAELEKENS, B. E. Minimization of water treatment plant sludge production with polyaluminium chloride application and its disposal in wastewater treatment plants. Engenharia Sanitaria e Ambiental, 14(3), 317-326. 2009.

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and *Giardiasis*. Clinical Microbiology Reviews, v. 24, n. 1, 2011, p. 1098-6618, 2011.

FINCH, G. R.; BLACK, E. K.; LABATIUK, C. W.; GYUREK, L; BELOSEVIC, M. Comparison of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* cyst inactivation by ozone. Applied and Environmental Microbiology, v. 59, n. 11, p. 3674-3680, 1993.

FRANCO, R. M. B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. Artigo de revisão. Rev Panam Infectol, 9(4): 36-43. 2007.

FRANCO, R. M. B.; BRANCO, Nilson; LEAL, Diego Averaldo Guiguet. 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, 2012.

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, 2012a.

FRANCO, R. M. B.; HACHICH, E.M.; SATO, M.I.Z.; NAVEIRA, R.M.L.; SILVA, E.C.; CAMPOS, M.M.C.; NETO, R.C.; CERQUEIRA, D.A.; BRANCO, N.; LEAL, D.A.G.

Avaliação da performance de metodologias de detecção de *Cryptosporidium spp.* e *Giardia spp.* em água destinada ao consumo humano, para o atendimento às demandas da Vigilância em Saúde Ambiental no Brasil. Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília, 2012.

FRANCO, R. M. B.; 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.; CANTUSIO-NETO, R.; BRANCO, N. Detecção de *Cryptosporidium* sp e *Giardia* sp em água pela técnica de filtração em membrana: estudo comparativo entre diferentes técnicas de eluição. J. Bras. Patol., v.37, n.4, p.205, 2001.

FRANÇA, R. B. *Cryptosporidium spp.*, *Giardia spp.* e ovos de helmintos em esgoto hospitalar: destruição e análise de dano estrutural dos protozoários após o processo fotoeletroquímico. 159 p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

FRIEND, D. S. The fine structure of *Giardia muris*. The Journal of cell biology, v. 29, n. 2, p. 317-332, 1966.

FREITAS, A. G.; BASTOS R. K. X.; BEVILACQUA, P. D.; PÁDUA, V. L.; PIMENTA, J. F. P.; ANDRADE, R. C. Recirculação de água de lavagem de filtros e perigos associados a protozoários. Eng. Sanitária e Ambiental, v. 15, n.1, 37-46, 2010.

FUJIMOTO, R. Y. et al. Protocolo para avaliação da viabilidade de monogenéticos e protozoários parasitos de peixes por meio das sondas fluorescentes SYBR-14 e iodeto de propídio (IP). Embrapa Tabuleiros Costeiros-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2015.

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.

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

GÓMEZ-COUSO, H. et al. Effect of the radiation intensity, water turbidity and exposure time on the survival of *Cryptosporidium* during simulated solar disinfection of drinking water. Acta Tropica, v. 112, p.43-48, out. 2009.

GROVES, J. T.; BOXER, S. G.; MCCONNELL, H. M. Electric field-induced reorganization of two-component supported bilayer membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 94, n. 25, p. 13390-13395, 1997.

HACHICH, E. M., SATO, M. I. Z., GALVANI, A. T., MENEGON, J. R. N., MUCCI, J. L. N. *Giardia* and *Cryptosporidium* in source waters of Sao Paulo State, Brazil. *Water Science and Technology*, 50(1), 239-245, 2004.

HE, C. et al. Products evolution during hydrothermal conversion of dewatered sewage sludge in sub-and near-critical water: Effects of reaction conditions and calcium oxide additive. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 40, n. 17, p. 5776-5787, 2015.

HELLER, L.; BASTOS R. K. X.; VIEIRA, M. B. C. M.; BEVILACQUA, P. D.; BRITO, L. L. A.; MOTA, M. M. M.; OLIVEIRA, A. A.; MACHADO, P. M.; SALVADOR, D. P.; CARDOSO, A. B. Oocistos de *Cryptosporidium* e Cistos de *Giardia*: Circulação no Ambiente e Riscos à Saúde Humana. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, p. 79 – 92, 2004.

HIJIKATA, N. et al. Bactericidal and virucidal mechanisms in the alkaline disinfection of compost using calcium lime and ash. *Journal of environmental management*, v. 181, p. 721-727, 2016.

HOTEZ, P. J.; FUJIWARA, R. T. Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card. *Microbes and infection*, v. 16, n. 8, p. 601-606, 2014.

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.

HSU, B.M.; HUANG, C. IMS method performance analyses for *Giardia* in water under differing conditions. *Environmental monitoring and assessment*, v. 131, n. 1, p. 129-134, 2007.

HSU, B. M.; YEH, H. H. Removal of *Giardia* and *Cryptosporidium* in drinking water treatment: A pilot-scale study. *Water Research*, v. 37, n. 5, p. 1111–1117, 2003.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico, 2008. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

KARANIS, P.; KIMURA, A. Evaluation of three flocculation methods for the purification of *Cryptosporidium parvum* oocysts from water samples. *Letters in applied microbiology*, v. 34, n. 6, p. 444-449, 2002.

KEEGAN, A. et al. Effect of water treatment processes on *Cryptosporidium* infectivity. *Water Research*, v. 42, n. 6-7, p. 1805–1811, 2008.

KIM, HYUN-SEOK et al. Fluidized bed drying of Loy Yang brown coal with variation of temperature, relative humidity, fluidization velocity and formulation of its drying rate. *Fuel*, v. 105, p. 415-424, 2013.

KORICH, D. G.; MEAD, J. R.; MADORE, M. S.; SINCLAIR, N. A.; STERLING, C. R. 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.

LABATIUK, C. W.; SCHAEFER, F. W.; FINCH, G. R.; BELOSEVIC, M. Comparison of animal infectivity, excystation, and fluorogenic dye as measures of *Giardia muris* cyst inactivation by ozone. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n. 11, p. 3187–3192, 1991.

LANGLAIS, B; RECKHOW, D. A.; BRINK, D. R. Ozone in water treatment: application and engineering. Michigan: Lewis Publishers, 298 p. 1991.

LAPOLLI, F. R.; SANTOS, L. F.; HÁSSEMER, M. E. N.; AISSE, M. M.; PIVELI, R. P. Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização. In: GONÇALVES, R. F. (Coord.). Desinfecção de efluentes sanitários, remoção de organismos patogênicos e substâncias nocivas: aplicação para fins produtivos como agricultura, aquicultura e hidropônica. Vitória: PROSAB, p. 169-208, 2003.

LOUWAKUL, P.; SAELO, A.; KHEMALEELAKUL, S. Efficacy of calcium oxide and calcium hydroxide nanoparticles on the elimination of *Enterococcus faecalis* in human root dentin. *Clinical oral investigations*, v. 21, n. 3, p. 865-871, 2017.

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

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

MARQUES, A. D.; PEREIRA, D. S. C. DE A.; COVRE, M. A.; GONÇALVES, R. F.; KELLER, R. Remoção de *Cryptosporidium spp.* e *Giardia lamblia* em águas de abastecimento. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária E Ambiental, 23. Campo Grande. Anais eletrônicos: I-053, 2005.

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.

MEDEIROS, R.C. Comparação da resistência de protozoários patogênicos – *Giardia spp.* e *Cryptosporidium spp.* – e de microrganismos indicadores à desinfecção sequencial Cloro-Radiação Ultravioleta e Ozônio-Radiação Ultravioleta. Dissertação (Mestrado) Escola de Engenharia de São Carlos, 2010.

MOFIDI, A. A. et al. The effect of UV light on the inactivation of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* cysts as determined by animal infectivity assay (P-2951-01). Water research, v. 36, n. 8, p. 2098-2108, 2002.

MORTIMER, M. et al. Separation of bacteria, protozoa and carbon nanotubes by density gradient centrifugation. Nanomaterials, v. 6, n. 10, p. 181, 2016.

MIRANDA, N. D. Ozonização e Peroxidação de Efluente Sanitário Proveniente de Alagados Construídos e Reator Compartimentado Anaeróbio/Aeróbio Visando Reuso. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia, Bauru, 2014.

NHMRC - National Resource Management Ministerial Council. Australian Drinking Water Guidelines Paper 6 National Water Quality Management Strategy. National Health and Medical Research Council, National Resource Management Ministerial Council, Commonwealth of Australia, Canberra. 2011.

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.

OLVERA, M.; ILANGO VAN, K. Disinfection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water using ultrasonic treatment. Research Centre for Environmental Quality, ITESM-CEM. v. 2, p. 118–121, 2008.

PARK, S. Y. et al. Application of calcium oxide (CaO, heated scallop-shell powder) for the reduction of *Listeria monocytogenes* biofilms on eggshell surfaces. Poultry Science, 2017.

PASSOS, T. M.; DA SILVA, L. H. M.; MOREIRA, L. M.; ZÂNGARO, R. A.; DA SILVA SANTOS, R.; FERNANDES, F. B.; DE LIMA, C. J.; FERNANDES, A. B. Comparative Analysis of Ozone and Ultrasound Effect on the Elimination of *Giardia spp.* cysts from Wastewater. *Ozone: Science & Engineering*, 36: 138-143. 2014.

PINTO, D. O. et al. Aplicabilidade do método 1623 e do método de filtração em membranas para detecção de cistos de *Giardia spp.* e oocistos de *Cryptosporidium spp.* em amostras hídricas considerando diferentes faixas de turbidez, e estudo da etapa de purificação por separação imunomagnética. *Applicability of method 1623 and membrane filtration method for detection of Giardia spp. cysts and Cryptosporidium spp. oocysts in water samples considering different levels of turbidity, and study of immunomagnetic separation phase.* 2013.

PLUMMER, J. D.; EDZWALD, J. K.; KELLEY, M. B. Removing *Cryptosporidium* by dissolved-air flotation. *Journal-American Water Works Association*, v. 87, n. 9, p. 85-95, 1995.

PROGRAMA DE PESQUISA EM SANEAMENTO BÁSICO – PROSAB. Resíduos Sólidos do Saneamento: Processamento, Reciclagem e Disposição Final. Curitiba/PR, 2001b.

PROGRAMA DE PESQUISA EM SANEAMENTO BÁSICO – PROSAB. Remoção de Microrganismos Emergentes e Microcontaminantes Orgânicos no Tratamento de Água Para Consumo Humano. Belo Horizonte/MG, 2009.

PECKOVÁ R, STUART PD, SAK B, KVĚTOŇOVÁ D, KVÁČ M5, FOITOVÁ I. Statistical comparison of excystation methods in *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Vet Parasitol.* Oct 30;230:1-5, 2016.

RAKNESS, K.; GORDON, G.; LANGLAIS, B.; MASSCHELEIN, W.; MATSUMOTO, N.; RICHARD, Y.; ROBSON, C. M.; SOMIYA, I. Guideline for measurement of ozone concentration in the process gas from an ozone generator. *Ozone Science and Engineering*, v.18, p. 209-229, 1996.

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.

Rede Nacional de Capacitação e Extensão Tecnológica em Saneamento Ambiental – ReCESA. Controle Básico de ETA III Desinfecção com ênfase em cloração. Brasília/DF, 2008.

ROBERTSON, L. J.; PATON, C. A.; CAMPBELL, A T.; SMITH, P. G.; JACKSON, M. H.; GILMOUR, R. A.; BLACK, S. E.; STEVENSON, D. A.; SMITH, H. V. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. *Water Research*, v. 34, n. 8, p. 2310–2322, jun. 2000.

ROBERTSON, L. J. *Giardia duodenalis*. Second Edition ed. Elsevier, 2014.

ROBERTSON, Lucy J. et al. Drying of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts to slides abrogates use of vital dyes for viability staining. *Journal of microbiological methods*, v. 96, p. 68-69, 2014.

ROCHELLE P.A, DE LEON R., JOHNSON A. Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of infectious *Cryptosporidium* parvum oocysts from environmental samples. *Appl and environ microbiol.*65(2):841-845, 1999.

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.; GENNACARO, A. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.26, p.113-123, 2002.

SALVADOR, J. O. et al. Influência do alumínio no crescimento e na acumulação de nutrientes em mudas de goiabeira. *Revista brasileira de ciência do solo*, v. 24, n. 4, 2000.

RYAN, U.; CACCIÒ, S. M. Zoonotic potential of *Giardia*. *International Journal for Parasitology*, v. 43, n. 12-13, p. 943–956, 2013.

SATO, M. I. Z., GALVANI, A. T., PADULA, J. A., NARDOCCI, A. C., DE SOUZA LAURETTO, M., RAZZOLINI, M. T. P., & HACHICH, E. M. 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*, 442, 389-396. 2013.

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, L. U. D.; CANTUSIO NETO, R.; FRANCO, R. M. B. Protozoários patogênicos de veiculação hídrica: as metodologias de detecção em amostras de esgoto e a eficiência dos tratamentos de remoção e desinfecção. *Higiene Alimentar*, v. 22, n. Edição Temática, p. 22-28, 2008.

SANTOS, L. U.; CANTUSIO NETO, R.; FRANCO, R. M. B.; GUIMARÃES, J. R. Detecção de oocisto de *Cryptosporidium spp.* e cistos de *Giardia spp.* em amostras de esgoto bruto ou tratado: avaliação crítica dos métodos. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 16, n. 2, p. 115–120, 2011.

SANTOS, L.U.; ALVES, D.P.; GUARALDO, A.N.A; CANTUSIO-NETO, R.; DURIGAN, M.; FRANCO, R.M.B. Infectivity of *Giardia duodenalis* Cysts from UV Light-Disinfected Wastewater Effluent Using a Nude BALB/c Mouse Model. *ISRN Parasitology*. 2013.

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

SANTOS, P. R.; DANIEL, L. A. Dissolved air flotation as a potential treatment process to remove *Giardia* cysts from anaerobically treated sewage. *Environmental technology*, v. 38, n. 19, p. 2392-2399, 2017.

SCHUPP, D. G.; ERLANDSEN, S. L. A new method to determine *Giardia* cyst viability: Correlation of fluorescein diacetate and propidium iodide staining with animal infectivity. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, n. 4, p. 704–707, 1987.

SILVA, G. H. R.; DANIEL, L. A.; BRUNING, H.; RULKENS, W. H. Anaerobic effluent disinfection using ozone: Byproducts formation. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 18, p. 6981–6986, 2010.

SILVEIRA, I. C. T. Cloro e ozônio aplicados a desinfecção de efluente hospitalar tratado em contadores biológicos rotatórios, com avaliação de efeitos tóxicos em *Daphnia similis*. 2004. Tese (Doutorado) - Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2004.

SLOMPO, N. D. M. Avaliação de processos de desinfecção para remoção e inativação de *Giardia spp.* e *Cryptosporidium spp.* e de microrganismos indicadores em águas negras previamente tratadas sequencialmente por Reator UASB, Fotobiorreator e Flotação. 2017. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

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, ISBN 0-12-470100-0. 2003.

SMITH, H. V.; NICHOLS, R. A. B.; GRIMASON, A. M. *Cryptosporidium* excystation and invasion: Getting to the guts of the matter. Trends in Parasitology, v. 21, n. 3, p. 133–142, 2005.

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

SOARES, L. V. Ozonização de esgoto sanitário: estudo de hidrodinâmica, transferência de massa e inativação de microorganismos indicadores. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação na área de Engenharia Hidráulica e Saneamento. Universidade de São Paulo (USP), 2007.

SEU, KALANI J. et al. Effect of surface treatment on diffusion and domain formation in supported lipid bilayers. Biophysical journal, v. 92, n. 7, p. 2445-2450, 2007.

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

VERGARA-CASTIBLANCO, C. A.; FREIRE-SANTOS, F.; OTEIZA-LÓPEZ, A. M.; ARES-MAZÁS, M. E. Viability and infectivity of two *Cryptosporidium* parvum bovine isolates from different geographical location. Veterinary Parasitology, v. 89, n. 4, p. 261–267, 2000.

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.

VIEIRA, R. Remoção de microalgas por pré-ozonização e flotação por ar dissolvido. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, 2016.

WARE M.W, NYMER L, LINDQUIST H.A.D, SCHAEFFER F.W. III. Evaluation of an alternative IMS dissociation procedure for use with method 1622: detection of *Cryptosporidium* in water. J Microbiol Meth, 55: 575-583, 2003.

WIDMER, G.; CLANCY, T.; WARDT, H. D.; MILLER, D.; BATZER, G. M.; PEARSON, C. B. Structural and Biochemical Alterations in *Giardia lamblia* Cysts Exposed to Ozone. Journal of Parasitology, v. 88, n. 6, p. 1100–1106, 2002.

WICKRAMANAYAKE, G. B.; RUBIN, A. J.; SPROUL, O. J. Inactivation of *Giardia lamblia* cysts with ozone. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 48, n. 3, p. 671–672, 1984.

WU, M.; BRIDLE, H.; BRADLEY, M. Targeting *Cryptosporidium parvum* capture. *Wat. Res.*, v.46, p.1715-1722, 2012.

YAKUB G.P, STADTERMAN-KNAUER K.L. Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* from high-iron matrices. *Appl Environ Microbiol* 66: 3628-3631, 2000.

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

Anexos

Anexo A - Protocolo do ensaio de tratabilidade realizado por Andreoli (2016)

A Figura A1 apresenta o esquema do equipamento utilizado, Andreoli 2016.

Fonte: Andreoli (2016)

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

Figura A1- Esquema do floteste

Protocolo seguido nos ensaios:

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

6. Abrir cuidadosamente a válvula de alívio (1) até saírem bolhas e o manômetro marcar 5 bar;
7. Esperar 10 minutos para a saturação;
8. Fechar a válvula de alívio (1);
9. Fechar a válvula de saturação (4);
10. Abrir a válvula mantenedora de ar (2);
11. Colocar cerca de 500 mL da água de estudo em cada jarro;
12. Remover as bolhas no fundo inclinando os jarros;
13. Completar os jarros com a água de estudo até a marcação;
14. Posicionar os jarros no floteste e baixar as pás;
15. Colocar as conexões de água saturada;
16. Fechar as válvulas de dreno (6) e de entrada dos jarros (7);
17. Abrir a válvula de água saturada (3);
18. Abrir e fechar a válvula de dreno rapidamente para descartar o ar presente na tubulação lançando um jato de água saturada;
19. Adicionar 5 mL de PAC (10g/L) nos copos (9);
20. Programar o floteste com os seguintes parâmetros (número de segmentos: 3; rotação inicial – sp0: 200rpm; tempo inicial – T1: 30s; rotação 1 sp1: 350 rpm; tempo 2- T2: 10s; rotação 2 –sp2: 350 rpm; tempo 3- T3: 5s; rotação 3 –sp3: 66 rpm);
21. Deixar um frasco com água destilada e cronômetro próximo, iniciar a programação do ensaio;
22. Dosar PAC quando a rotação das pás atingir 350 rpm baixando a haste e fazer 3 lavagens rápidas com água destilada;
23. Ligar o cronômetro quando a rotação reduzir para 66 rpm;
24. Esperar 4 minutos para a floculação;
25. Desligar o floteste, subir as pás e imediatamente abrir as válvulas de entrada dos jarros (7) e fechar quando o nível subir até a marcação de 5% de recirculação;
26. Esperar 10 minutos;
27. Iniciar filtração com a água clarificada e;
28. Realizar coleta do resíduo.

Anexo B - Protocolo de Flocculação em Carbonato de Cálcio

Para cada matriz foi usado os volumes de reagentes de acordo com a Tabela 1B, adaptado Andreoli (2016).

Tabela 1B: Volume de reagentes usados para cada matriz no método de FCC

Amostra	Dosagem de NaOH 5M(mL)	Dosagem de cloreto de cálcio 1M (mL)	Dosagem de Bicarbonato de sódio 1M (mL)	Dosagem de Ácido Sulfâmico 10% (mL)
Lodo Flotado (Resíduo) (1,3L)	7,5	13	13	26
Água de lavagem (0,3L)	4,0	3	3	6

Os seguintes passos foram realizados:

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

13. Fazer sucessivos enxagues com *Tween 80* a 0,1%, e também transferir o conteúdo para os tubos de centrífuga;
14. Centrifugar a 1500 G por 20 minutos;
15. Remover o sobrenadante dos tubos;
16. Transferir todos os *pellets* para um tubo único, fazendo enxagues com *Tween 80* a 0,1%;
17. Centrifugar a 1500 G por 20 minutos;
18. Remover o sobrenadante até a marcação de 5 mL por tubo;
19. Agitar o *pellet* em vórtex e com pipeta Pasteur;
20. Adicionar PBS até completar o tubo;
21. Centrifugar a 1500 G por 20 minutos e;
22. Remover o sobrenadante até 5 mL para ensaios com IMS.

Anexo C - Informações técnicas do PAC utilizado

QUIMISA S/A

Responsável pela emissão: Laboratório de Controle da Qualidade - Fone: (47)3251-1041 - Fax: (47)3251-1051 - eMail: lcq@quimisa.com.br

Matriz: Rod. Ivo Silveira, Km 03, Nº 315 - Caixa Postal 50 - 88355-200 - Brusque - SC - Fone (47)3251-1010 - quimisa@quimisa.com.br

Unidade São Paulo: Rod. Deputado A. Lammoglia, Nº S/N - Chácara São João - 13312-500 - Itu - SP - Fone (11)3090-1155 - filialsp@quimisa.com.br

Unidade Sapucaia: Rod. BR 116, Km 252, Nº 1186 - Três Portos - 93212-220 - Sapucaia do Sul - RS - Fone (51)3474-5600 - filialsapucaia@quimisa.com.br

Unidade Nova Esperança: Rua Ibrahim Ibrahim, 86 - Parque Industrial - 87600-000 - Nova Esperança - PR - Fone (44)3252-8640 - filialnovaesperanca@quimisa.com.br

Emissão: 07/12/2016 às 16:04 **LAUDO TÉCNICO DE ANÁLISE** **NR. 101.801-5**

Produto: **POLICLORETO DE ALUMINIO**

Fabricação: 27/11/2016 Validade: 3 meses Identificação (Lote): A-68870

ENSAIO REALIZADO	RESULTADO	ME	ESPECIFICAÇÃO
Aspecto	OK	ME-052	Líquido amarelo a castanho
Densidade (g/ml)	1,3620	ME Forn	=FAIXA(1,3000;1,5000)
pH 15 %	4,12	ME Forn	=FAIXA(3,00;5,00)
Teor de Al ₂ O ₃ (%)	16,68	ME Forn	=FAIXA(14,00;20,00)

OBSERVAÇÕES

Cliente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Informações Adicionais:

Obs 1: Este laudo técnico foi emitido eletronicamente, e é válido sem assinatura.

2: Este laudo técnico perde seu valor, por quaisquer alterações nele feitas.

3: O produto possui validade especificada, se mantido sob condições ideais.

Responsável
Eng. Josiane da Silva
CRQ 133 01 919

Informações complementares sobre o produto, acessar site: www.quimisa.com.br

Anexo D - Informações sobre a suspensão de *Cryptosporidium parvum* usada

Waterborne™, Inc.
Clinical and Environmental Parasitology Products * 6045 Hurst Street, New Orleans, LA 70118 USA
TEL / FAX: 504-895-3338 or Toll-Free: 866-895-3338 * Email: custserv@waterborneinc.com * www.waterborneinc.com

Product Specification and Analysis Report *Cryptosporidium parvum*

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

Source of the oocysts: Experimentally infected calves.

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

Lot #: 08-17	Date shed: 3/10/17
Total number of oocysts provided: 1×10^6	Date purified: 3/12/17

Total volume:

☒ 4 mL

☐ 8 mL

☐ other:

Storage solution:

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

☐ 5% Formalin/PBS & 0.01% Tween 20

☐ other:

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

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

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

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

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

Anexo E - Informações sobre a suspensão de *Giardia muris* usada

Waterborne™, Inc.
Clinical and Environmental Parasitology Products * 6045 Hurst Street, New Orleans, LA 70118 USA
TEL / FAX: 504-895-3338 or Toll-Free: 866-895-3338 * Email: custserv@waterborneinc.com * www.waterborneinc.com

Product Specification and Analysis Report *Giardia muris*

Product: Suspension of cysts of *Giardia muris* isolate, for use in research.

Source of Cysts: Experimentally infected mice.

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

Lot #: 083017	Date shed: 8/28 - 8/30/17
Total number of cysts provided: 5×10^6	Date purified: 8/30/17

Total volume:

☐ 4 mL

☒ 8 mL

☐ other:

Storage solution:

☐ PBS with penicillin, streptomycin, gentamicin, 0.01% Tween 20

☐ 5% Formalin/PBS/0.01% Tween 20

☒ other: de-ionized water, w/ penicillin, streptomycin, gentamicin, 0.01% Tween 20

Purification Method(s): Cysts are purified from feces by sucrose and Percoll density gradient centrifugation.

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

Storage Condition(s): 4° Celsius

Expiration Date: Suspensions of live cysts expire 21 days after the date of shipment; formalinized cysts expire 6 months after the date of shipment.

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

Anexo F - Informações sobre o *EasySeed*® usado

EasySeed™

Certificate of Analysis

Batch Number: B 605

General

Safety: This product is non-hazardous.
Storage: 2-8°C. Do not freeze.
Catalogue Number: ESCG100
Preparation Date: 17 August 2017
Expiration Date: 15 December 2017
Volume: 1.267 ml +/- 32 ul
Suspension media: Buffered saline solution.
Sterilisation method: Gamma irradiation.

Counts

(Method Ref: ESCG-001)

	Mean	St.Dev.
Cryptosporidium count:	99	1.9
Giardia count:	100	1.6

DAPI staining:

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

Stock specifics

Organism: *Cryptosporidium parvum*
Strain: Iowa
Source: Bovine
Shed date: 20 July 2017
Purification method: Discontinuous sucrose and cesium chloride centrifugation gradients.

Organism: *Giardia lamblia*
Strain: H3
Source: Gerbil
Shed date: 05 August 2017
Purification method: Sucrose and Percoll density gradient centrifugation

Quality Officer:

 Linh Le

This document is issued in accordance with NATA's accreditation requirements. Accredited for compliance with ISO Guide 34.

Accredited Reference Material Producer
 Accreditation Number: 14993
 Site Number: 15276

BTF
 A BIOMÉRIEUX COMPANY

Water Industry Enquires:

BTF Pty Ltd.
 Sydney Australia
 Tel. 61 (0) 2 8877 9150
 Fax. 61 (0) 2 8877 9101
 www.btfbio.com

Issue: 9 - March 2009

Anexo G - Informações sobre o uso do kit *Dynabeads*TM usado

98-14289-00

applied biosystems
by Thermo Fisher Scientific

CERTIFICATE OF ANALYSIS

#73012

DynabeadsTM GC Combo Kit

Quantity: 130 kit(s)
 Packaging Lot: 00536249
 Storage: at 5 ± 3 °C
 Expiry Date: 06.2020 (MM.YYYY)

The kit is composed of:

Quantity: DynabeadsTM anti-Cryptosporidium
 1 x 5 mL
 Bulk Lot: 1300
 Filling Lot: 00528209

Quantity: DynabeadsTM anti-Giardia
 1 x 5 mL
 Bulk Lot: 0900
 Filling Lot: 00528216

Quantity: 10 x SLTM Buffer A
 1 x 60 mL
 Filling Lot: 00528226

Quantity: 10 x SLTM Buffer B
 1 x 60 mL
 Filling Lot: 00532205

Distributed by IDEXX Laboratories

Customer Support
 North/South America:
 +1 207 556 4496 or
 +1 800 321 0207
 Europe: +00800 4339 9111
 UK: +44 01638 676800
 China: +86 21 61279528
 Japan: +81 422 71 5921
 Australia: +1300 44 33 99

idexx.com/water

04-14599-01

IDEXX

QUALITY CONTROL

Parameter	Method	Requirement	Result
Functional testing	The method is used for selective separation of Giardia cysts and Cryptosporidium oocysts from water sample concentrate. The complex of magnetic particles and cysts/oocysts is separated using a magnetic particle concentrator and subsequently the oocysts/cysts are dissociated from the beads. The suspension of oocysts/cysts is collected, fixed to a microscope slide, stained and analyzed using a fluorescent microscope.	Recovery of oocysts/cysts in water should be ≥ 70%.	Conforms

ISO CERTIFICATION

This product is produced in accordance to Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, a wholly owned subsidiary of Thermo Fisher Scientific Inc. (hereinafter Thermo Fisher) certified Quality Management (ISO 9001) and Environmental Management (ISO 14001) systems. Thermo Fisher Scientific Baltics UAB is also certified according to the standards ISO 13485 (Quality management system for IVD medical devices).

PRODUCT USE LIMITATION

This product has been developed for research purposes and in vitro use only. This product has not been tested for use in diagnostics or for drug development, nor is it suitable for administration to humans or animals.

DISCLAIMER OF WARRANTY

Thermo Fisher warrants solely to the Buyer that the Products materially conform to Thermo Fisher's published specifications for such Products at the time of order submission. The warranty period is from the time Thermo Fisher delivers the Product until the earlier of either the Product's expiry or "use by" date or its specified number of or 12 months from the date Thermo Fisher delivers the Product. THERMO FISHER, ITS AFFILIATES AND DISTRIBUTORS EXPRESSLY DISCLAIM ALL OTHER REPRESENTATIONS AND WARRANTIES, INCLUDING THE IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, AND ALL OTHER WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, SATISFACTORY QUALITY AND NON-INFRINGEMENT. THIS LIMITED WARRANTY PROVIDED HEREIN DOES NOT APPLY TO ANY DEFECT CAUSED BY FAILURE TO PROVIDE A SUITABLE STORAGE, USE OR OPERATING ENVIRONMENT. USE OF NON-RECOMMENDED REAGENTS OR BIOCHEMICALS. THE USE OF ANY PRODUCT FOR A PURPOSE OR IN A MANNER OTHER THAN THAT FOR WHICH THEY WERE DESIGNED. MODIFICATIONS DONE BY BUYER, OR ANY OTHER ABUSE, MISUSE OR NEGLIGENCE OF THE PRODUCTS BY BUYER. Any model or sample furnished to Buyer is merely illustrative of the general type and quality of goods and does not represent that any Product will conform to such model or sample. The warranty provided herein is valid only when used by properly trained individuals. All technical advice, documentation and information provided by Thermo Fisher, whether by phone, e-mail, website or any other channel is provided "AS IS" and without any warranty of any kind. It is the responsibility of the Buyer to determine if a Product is suitable for a specific purpose and to apply the necessary safety precautions. Buyer's exclusive and sole remedy under this warranty is: (i) replacement of the Product that failed to conform to the warranty above or (ii) at Thermo Fisher's option or, where applicable, at Thermo Fisher's distributor's option, a credit for that portion of the Product which is not conforming.

Thermo Fisher Scientific Baltics UAB

V.A. Graičiuno 8

Vilnius
 LT-02241
 Lithuania

tel. +370 700 55131
 fax +370 700 55132

www.thermoscientific.com/onebio
info.baltics@thermofisher.com

Company code 122351387, VAT code LT223513811

Company data are stored at the Register of Legal Entities of the Republic of Lithuania

Page 1 of 2

LIMITATION OF LIABILITY

NOTWITHSTANDING ANYTHING TO THE CONTRARY CONTAINED HEREIN, THE LIABILITY OF THERMO FISHER (WHETHER BY REASON OF BREACH OF CONTRACT, TORT, INDEMNIFICATION, OR OTHERWISE, BUT EXCLUDING LIABILITY OF THERMO FISHER FOR BREACH OF WARRANTY (THE SOLE REMEDY FOR WHICH WILL BE AS PROVIDED UNDER SECTION ABOVE)) WILL NOT EXCEED AN AMOUNT EQUAL TO THE TOTAL PURCHASE PRICE PAID BY CUSTOMER TO THERMO FISHER WITH RESPECT TO THE PRODUCT(S) GIVING RISE TO SUCH LIABILITY. NOTWITHSTANDING ANYTHING TO THE CONTRARY CONTAINED HEREIN, IN NO EVENT WILL THERMO FISHER BE LIABLE FOR ANY INDIRECT, SPECIAL, CONSEQUENTIAL OR INCIDENTAL DAMAGES ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE SALE, USE OR PERFORMANCE OF ANY PRODUCTS (INCLUDING WITHOUT LIMITATION DAMAGES FOR LOSS OF USE OF FACILITIES OR EQUIPMENT, LOSS OF REVENUE, LOSS OF DATA, LOSS OF PROFITS OR LOSS OF GOODWILL, ANTICIPATED OR OTHERWISE), REGARDLESS OF WHETHER THERMO (a) HAS BEEN INFORMED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES OR (b) IS NEGLIGENT. This limitation of liability does not limit Thermo Fisher's liability for death or personal injury caused by Thermo's negligence or any other liability that cannot be excluded by law.

Rev 1

QC responsible: R. Stankevičiūtė-Žukauskienė

Date: 25 July 2017

This document has been produced electronically and is valid without signature.

APÊNDICE

Apêndice A - Protocolo de centrifugação direta

1. Após a homogeneização das amostras contendo protozoários, o conteúdo foi despejado em tubos de centrifuga até completar a marca de 50 mL;
2. Os tubos foram tampados e colocados nos recipientes de encaixe da centrifuga;
3. Os recipientes de encaixe da centrifuga foram acoplados na centrifuga e está foi fechada;
4. Centrifugou a 1500 G por 20 minutos;
5. Posteriormente a centrifugação os tubos foram removidos da centrifuga e com auxílio de uma pipeta Pasteur o conteúdo foi removido até a marca de 5 mL;
6. Após esse passo o conteúdo estava pronto para a IMS.

Apêndice B - Protocolo de purificação com IMS

Este procedimento era realizado posteriormente ao método de concentração das amostras. Todos os materiais, vidrarias e utensílios utilizados estavam enxaguados com Tween 80 a 0,1%, os passos para a realização do método foram:

1. A amostra, que estava com 5 mL, foi transferida para o tubo de lado plano utilizando uma pipeta *Pasteur*, previamente umedecida com *Tween 80 a 0,1%*,
2. Uma lavagem foi realizada com 1,0mL do ICN7X e, em seguida, o conteúdo foi adicionado ao tubo de lado plano. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes, totalizando três lavagens de 1,0mL;
3. O aparelho de mixer rotatório foi disposto na bancada de microbiologia e, antes do seu uso, foi necessário verificar se o aparelho estava calibrado, ou seja, se as rotações por minuto condiziam com o valor marcado no visor;
4. O tubo de lado plano foi fixado no aparelho de mixer rotatório. Então, o aparelho foi ligado e foi mantida uma agitação de 18 rpm por 1,0h;
5. Em seguida, foram retiradas da caixa do kit Dynabeads® as soluções tampão SL-A 10X (solução transparente) e SL-B 10X (solução rosa);
6. No tubo de lado plano, foi adicionado 0,5mL da solução tampão SL-A 10X. Em seguida, foi adicionado 0,5mL da solução tampão SL-B 10X;
7. O frasco com os anticorpos monoclonais Dynabeads *Anti-Giardia* foi agitado em vórtex por 1,0min para que fosse homogeneizado. Então, 50 ou 100 µL (dependia da amostra) de seu conteúdo foi adicionado ao tubo de lado plano;
8. Da mesma forma, o frasco com os anticorpos monoclonais Dynabeads *Anti-Cryptosporidium* foi agitado em vórtex por 1,0min para que fosse homogeneizado. Então, 50 ou 100 µL (dependia da amostra) de seu conteúdo foram adicionados ao tubo de lado plano. Vale ressaltar que a ponteira utilizada para os Dynabeads *Anti-Giardia* não foi reutilizada nesta etapa, isso foi feito para evitar a contaminação;
9. O tubo de lado plano foi completado com ICN7X até a marcação de 10mL;
10. O tubo de lado plano foi novamente fixado no aparelho de mixer rotatório. Então, o aparelho foi ligado e foi mantida uma agitação de 18 rpm por mais 1,0h;
11. Com a solução SL-A 10X, foi preparada uma solução diluída de tampão na concentração de 1:10, ou seja, 1 parte da solução SL-A 10X para 9 partes de água

ultrapura (Milli-Q). Para cada tubo de lado plano, foi preparado 1,0mL dessa solução diluída de tampão;

12. Após o tempo de agitação, o aparelho foi desligado e o tubo de lado plano foi removido;
13. Posteriormente, o tubo de lado plano foi acoplado ao concentrador de partículas magnéticas 1 (MPC-1). O tubo acoplado foi movimentado manualmente a um ângulo de 90°, inclinando a extremidade da tampa do tubo para cima e para o lado a cada segundo por 2 min, totalizando 120 movimentos completos;
14. Todo o sobrenadante do item anterior foi descartado cuidadosamente com o lado plano voltado para cima, ainda acoplado ao MPC-1;
15. O tubo de lado plano foi removido do MPC-1 e o conteúdo do tubo foi homogeneizada com 0,5mL de solução tampão diluída (1:10). Esse conteúdo foi transferido para um microtubo de 1,5mL com uma pipeta *Pasteur* de vidro de 230 nm, a qual estava umedecida com *Tween* 80 a 0,1%;
16. Em seguida, foi realizado um novo enxágue, repetindo o procedimento apresentado no item 38;
17. O microtubo foi acoplado no concentrador de partículas magnéticas 2 (MPC-2) e foram realizados movimentos manuais em ângulo de 180° inclinando a extremidade da tampa do microtubo para cima e para baixo a cada segundo por 1 min, totalizando 60 movimentos completos;
18. Ao final dos movimentos, o sobrenadante no microtubo (ainda acoplado ao MPC-2) foi descartado com uma pipeta *Pasteur* de vidro de 230 nm, que estava umedecida com *Tween* 80 a 0,1%;
19. Posteriormente, ao final da etapa de IMS, as dissociações ácidas foram realizadas. A lâmina a ser utilizada foi identificada (nomeadas), destacando quais foram os poços utilizados (não foi utilizado o poço central). Para cada dissociação ácida, foi utilizado um poço. A lâmina foi disposta na bancada em ambiente esterilizado;
20. O microtubo foi removido do MPC-2 e foi adicionado 50µL de ácido clorídrico 0,1N diretamente no material aderido;
21. O microtubo foi homogeneizado em vórtex por 1,0min e ficou em repouso por 10min;
22. Um volume de 5µL de hidróxido de sódio 1N foi adicionado ao primeiro poço da lâmina (espalhando por todo o poço);
23. Depois de decorrido o tempo de repouso, o microtubo foi novamente agitado em vórtex por 1,0min;

24. O microtubo foi acoplado novamente ao MPC-2 e foram realizados movimentos manuais em ângulo de 180° inclinando a extremidade da tampa do microtubo para cima e para baixo a cada segundo por 10s;
25. Com uma pipeta *Pasteur* de vidro de 230 nm, previamente homogeneizada com *Tween 80* a 0,1%, o conteúdo que não foi aderido na parede do microtubo foi removido e adicionado no primeiro poço da lâmina na qual foi colocado o hidróxido de sódio;
26. Para realizar a segunda dissociação ácida, foram repetidos os passos 20 a 25 para o segundo poço da lâmina;
27. As amostras foram dispostas (devidamente identificadas) no laboratório de microbiologia em *overnight* para que os poços fossem secados e posteriormente preparo das lâminas

Apêndice C - Procedimentos para a montagem das lâminas

1. O *kit* Merifluor® foi retirado da geladeira, levado à sala de microbiologia e o tempo (aproximadamente de 30min) necessário foi aguardado para que atingisse a temperatura ambiente;
2. Uma placa de *Petri* foi aberta a tampa e o fundo foram envolvidos em papel alumínio para simular uma câmara escura. Dentro da placa foi colocado um pequeno pedaço de papel com água deionizada para umedecer a câmara;
3. A lâmina foi transferida para a placa de *Petri* e, para fixar a amostra, foram adicionados 10 µL de metanol sobre cada poço. O tempo de 10 min foi aguardado para secagem das alíquotas;
4. Na ausência de luz (apagou-se a luz da sala de microbiologia), uma gota do reagente de detecção (tampa azul) e uma gota do contra corante (tampa verde) do *kit* Merifluor® foram adicionadas em cada poço, totalizando dois poços. A placa de *Petri* foi fechada e, em seguida, levada para a incubadora por 30 min a 37°C;
5. A solução de lavagem do *kit* Merifluor® (tampa transparente) foi preparada em uma proporção de 1:20 com água ultrapura (Milli-Q), ou seja, uma parte da solução do *kit* Merifluor® e 19 partes de água ultrapura;
6. A lâmina foi retirada da placa de *Petri* e, ainda na ausência de luz, cada poço foi lavado três vezes com 50 µL da solução de lavagem (preparada no item 55). A lavagem foi feita em uma inclinação de $\pm 30^\circ$ para que o líquido escorresse pela lâmina, o excesso era retirado com papel absorvente;
7. A lâmina foi retornada à placa de *Petri* para que fosse adicionada duas gotas do *Fluoroshield with DAPI* (Sigma – F6057) em cada poço. A placa foi novamente fechada e mantida por 10 min para fixação do produto;
8. Decorrido o tempo de contato, foi adicionado 10 µL de IP (iodeto de propídio, Sigma P4170), volume proporcional à quantidade de suspensão inoculada em cada poço (considerando 5 µL de *Giardia spp.* e 5 µL de *Cryptosporidium spp.*, totalizando 10 µL). A placa foi novamente fechada e mantida por 5 min;
9. A lâmina foi retirada da placa de *Petri* e, ainda na ausência de luz, cada poço foi lavado três vezes com 50 µL de HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*, Sigma –H9269). O excesso da lavagem era retirado com papel absorvente;
10. Em cada poço foi feita uma lavagem com 50 µL de água ultrapura, com a finalidade de evitar a formação de cristais nas lâminas;

11. A lâmina foi novamente colocada na placa de *Petri* e, em cada poço, foi adicionada uma gota do meio de montagem do *kit* Merifluor® (tampa cinza). Foi feito com cuidado para que se evitasse a formação de bolhas. Para isso, a gota era adicionada na lâmina inclinada a $\pm 45^\circ$;
12. Em seguida, uma lamínula foi colocada, com cautela, sobre cada poço e selada nas extremidades com o selante *CoverSlip Sealant*.