

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

KAMILA JESSIE SAMMARRO SILVA

**Métodos de recuperação e estimativa de viabilidade de cistos de *Giardia*
spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em resíduos do tratamento de água
de consumo**

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos –SP
2019

(Página intencionalmente deixada em branco).

KAMILA JESSIE SAMMARRO SILVA

Métodos de recuperação e estimativa de viabilidade de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em resíduos do tratamento de água de consumo

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

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos - SP

2019

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.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

S586m Silva, Kamila Jessie Sammarro
Métodos de recuperação e estimativa de viabilidade de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em resíduos do tratamento de água de consumo / Kamila Jessie Sammarro Silva; orientadora Lyda Patrícia Sabogal Paz. São Carlos, 2019.

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, 2019.

1. protozoários. 2. lodo de tratamento de água. 3. água de lavagem de filtros. 4. iodeto de propídio. 5. separação imunomagnética. 6. cloreto de polialumínio. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **KAMILA JÉSSIE SAMMARRO SILVA**.

Título da dissertação: "Método de recuperação e estimativa de viabilidade de cistos de Giardia SPP. e Oocistos de Cryptosporidium SPP. em resíduos do tratamento de água de consumo".

Data da defesa: 25/02/2019.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Lutz Antonio Daniel
(Presidente Designado)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

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

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

Resultado:

APROVADA

APROVADA

Aprovada

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

Decano da Comissão de Pós-Graduação;
Prof. Titular **Humberto Breves Coda**

Dedico este trabalho à minha mãe,
minha Maria,
Adelina.

AGRADECIMENTOS

Palavras falham para falar de ciência e colocar no papel o que saiu da bancada, mas falham mais ainda em transmitir a emoção do trabalho concluído, os sentimentos do convívio pessoal, os desafios vencidos e a vontade de ir além. Cabe a mim, no mínimo, citar brevemente aqueles que auxiliaram na minha pesquisa e bem-estar no início desta jornada acadêmica e das andanças por São Carlos. Vocês foram e são fundamentais em uma infinidade de aspectos.

Obrigada à minha orientadora Lyda Patrícia Sabogal Paz, por quem nutro imenso respeito e admiração. Agradeço por ter sido presente e prontamente disposta a me ajudar, mesmo diante da distância física durante a pesquisa e por ter confiado em mim.

Agradeço à banca examinadora desta dissertação de mestrado, pela disposição em avaliar este trabalho. Especialmente, ao Raphael Corrêa Medeiros, também meu colega, à professora Cali Laguna Achon, e ao professor Luiz Antônio Daniel: obrigada pelas contribuições e valiosas sugestões no exame de qualificação e, ao professor Daniel, agradeço duplamente por topiar presidir a banca avaliadora e também pela constante atenção e serenidade que transmite aos alunos no LATAR.

Aos professores da Hidráulica e Saneamento, por constituírem tamanho exemplo, e aos funcionários do departamento, sobretudo Priscila Toselli de Almeida, Maria Auxiliadora Altieri Pin e Rosemeire Aparecida de Jesus, por toda disposição e gentileza. E também aos professores que passaram na minha vida em outras etapas, mas que deixaram a vontade e o gosto para que seguisse na academia.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro no projeto temático nº 2012/50522-0. Do mesmo modo, à empresa Quimisa S/A por ter fornecido o cloreto de polialumínio utilizado nesta pesquisa.

Ao Hugo Silva e Allan Ogura, que me receberam e, claro, aos amigos e companheiros do LATAR (incluindo egressos e recém-chegados), por me inserirem nesta equipe capaz, unida e agradabilíssima: Ana Paula Sueitt, Bruno Freitas, Gabriela Laila, Paulo Maciel, Gabriel Sacchi (também meu supervisor PAE) e Emmanuele Maia. Mais estreitamente, ao Fernando Andreoli, Ulisses Terin, e a (não menos prezada) Priscila Ribeiro e toda sua paciência para tirar minhas dúvidas sobre protozoários. Luan Leite e Bárbara Freitas, vocês se tornaram meus grandes amigos, imprescindíveis nesta jornada: obrigadinha pela troca de ideias em meio aos experimentos e pelos nossos cafés que salvam o humor da tarde. E, mais

recentemente, Gustavo Nunes, Natália Nasser e Raphael Medeiros, igualmente queridos, presentes e muito admirados. À técnica do laboratório, Maria Tereza Hoffman, obrigada por todo seu cuidado e amabilidade ao longo da pesquisa. Gosto muito de todos vocês.

Expresso também minha gratidão e afeto pelos demais amigos que o PPGSHS me trouxe, em especial à Lídia Moura, minha parceira fiel, e ao José Mello, que à sua maneira me trouxeram ternura, alento e coragem. E à Raquel Lima e Jean Oliveira, por aquecerem meu coração nos momentos difíceis e nos felizes também. Vocês são incríveis.

À tão presente Ingrid del Tedesco, à Laís Salles, Larissa Lima, Robert Ullrich, Kamilla Aguiar, meus amigos de perto e de longe, de curta e longa data, obrigada. Torço por dias bons, que propaguem a energia bonita que temos no apoio uns aos outros. E a tantos amigos não citados aqui, onde o espaço é limitado para verbalizar minha gratidão.

Agradeço, finalmente, aos meus pais, Adelina Maria Sammarro e Jefferson Silva, que são meu maior privilégio e minha definição mais básica de amor. Obrigada.

“So much universe and so little time”.

Terry Pratchett

RESUMO

SILVA, K. J. S. (2019) **Métodos de recuperação e estimativa de viabilidade de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em resíduos do tratamento de água de consumo.** Dissertação de mestrado. 127 p. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Esta pesquisa comparou a incorporação de iodeto de propídio (IP) com a avaliação simultânea de corantes indicativos de danificação em membrana e atividade enzimática (*Live/Dead Cell Assay*®) para a estimar a viabilidade de cistos de *Giardia muris* e oocistos de *Cryptosporidium parvum*. Além disso, foram testados métodos de recuperação de (oo)cistos em amostras de lodo e água de lavagem de filtros (ALF) geradas em escala de bancada, simulando tratamento de água por ciclo completo com decantação. Dentre os métodos estudados para a detecção de *G. muris* e *C. parvum* inoculados em amostras de lodo, destacou-se a floculação com sulfato férrico, seguida de separação imunomagnética (IMS). Realizou-se, portanto, ensaio de qualidade analítica com ColorSeed™, para este método, tendo atendido ao requerido pelo Método 1623.1 da USEPA (2012) para *Giardia* spp. (32,25%; CV=9,00%), mas não tendo sido suficiente para *Cryptosporidium* spp. (11,00%; CV=47,67%). O teste com ColorSeed™ em amostras de ALF reproduziu o procedimento de filtração em membrana (FM) com raspagem utilizando Tween® 80 (45°C, 0,1%) seguido de IMS, tendo atendido ao Método 1623.1 para *Giardia* spp. (13,00%, CV=19,61%), mas não tendo sido suficiente para *Cryptosporidium* spp. (2,00%; CV=93,54%). Optou-se por este procedimento na avaliação de qualidade analítica, pois o inóculo prévio de suspensões comerciais seguido de recuperação por FM sem IMS superou 100% para *C. parvum*, devido à utilização de fator de multiplicação. O desempenho do *Live/Dead Cell Assay*® sobre suspensões comerciais de (oo)cistos foi subjetivo, sobretudo para visualização de organismos enzimaticamente ativos, de modo que optou-se pela inclusão de IP como parâmetro para estimar o efeito dos métodos de recuperação sobre a viabilidade. Em função da baixa recuperação e fluorescência de *G. muris*, a incorporação de IP foi avaliada apenas em *C. parvum*. Os resultados reiteraram a dificuldade na recuperação de protozoários em lodo e ALF e o fato de que as particularidades destes procedimentos analíticos podem prejudicar a interpretação de dados de viabilidade.

Palavras-chave: protozoários; lodo de tratamento de água; água de lavagem de filtros; iodeto de propídio; separação imunomagnética; cloreto de polialumínio

ABSTRACT

SILVA, K. J. S. (2019) **Recovery methods and viability assessment of *Giardia* spp. e oocistos cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in water treatment residues.** Dissertação de mestrado. MSc dissertation. 127 p. São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, São Carlos, 2019.

This study compared the incorporation of propidium iodide (PI) with the simultaneous evaluation of dyes that indicate both membrane damage and enzymatic activity (Live/Dead Cell Assay®) to assess the viability of *Giardia muris* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts. In addition, methods of recovering protozoan cysts and oocysts from sludge and filter backwash water (FBW) samples generated on bench scale, simulating conventional water treatment with decantation, were tested. Among the studied methods for detection of *G. muris* and *C. parvum* spiked into sludge samples, ferric sulphate flocculation followed by immunomagnetic separation (IMS) lead to higher recoveries. An analytical quality assay was therefore carried out with ColorSeed™, having met the USEPA Method 1623.1 (2012) recommendation for *Giardia* spp. (32.25%, CV=9.00%) but not for *Cryptosporidium* spp. (11.00%, CV = 47.67%). The quality assay test for FBW samples replicated the membrane filtration (MF) procedure using Tween® 80 (45 °C, 0.1%) followed by IMS, having complied with Method 1623.1 for *Giardia* spp. (13.00%, CV=19.61%) but again not for *Cryptosporidium* spp. (2.00%; CV=93.54%). This procedure was chosen for the analytical quality exam, since the previous inoculum of commercial suspensions followed by MF without IMS exceeded 100% recovery for *C. parvum*, due to the use of a multiplication factor. The Live/Dead Cell Assay® performance on commercial suspensions of cysts and oocysts was subjective, especially for visualizing enzymatically active organisms, thus PI inclusion was chosen as the parameter to estimate the effect of recovery methods on the organisms' viability. Due to the low recovery and poor fluorescence of *G. muris*, IP inclusion was evaluated only in *C. parvum*. The results reiterated the difficulty in the recovery of protozoa from sludge and FBW and the possibility of these analytical procedures hinder the interpretation of cysts and oocysts viability.

Key words: protozoa; water treatment sludge; filter backwash water; propidium iodide; immunomagnetic separation; polialuminum chloride

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros avaliados nos ensaios de tratabilidade para seleção das melhores condições de mistura.....	44
Tabela 2 - Remoção média percentual de turbidez e cor aparente para diferentes velocidades de sedimentação	70
Tabela 3 - Parâmetros operacionais "ótimos", adotados nos ensaios de tratabilidade definitivos	70
Tabela 4 - Coliformes totais e Escherichia coli detectados nas matrizes em estudo.	72
Tabela 5 - Comparação entre os parâmetros de qualidade do lodo bruto (LB) e do lodo adensado (LA).....	74
Tabela 6 - Caracterização físico-química e biológica dos resíduos gerados em tratamento em comparação à água bruta.....	74
Tabela 7 - Contagem de (oo)cistos visualizados em FITC e WG mediante o procedimento A para estimativa de viabilidade.....	77
Tabela 8- Recuperação de (oo)cistos na amostra de lodo submetida a CD + ICN7X + IMS, em função das dissociações ácidas.	83
Tabela 9- Recuperação de (oo)cistos na amostra de lodo submetida a remoção de sais metálicos pelo MPC TM -1, seguida de CD + ICN7X + IMS, em função das dissociações ácidas.	86
Tabela 10 - Recuperação de (oo)cistos em amostras de lodo submetida a FCCa sem etapa de purificação.....	87
Tabela 11- Recuperação de (oo)cistos na amostra de lodo submetida a FCCa + IMS, em função das dissociações ácidas.	89
Tabela 12- Recuperação de (oo)cistos na amostra de lodo submetida a Fe ₂ (SO ₄) ₃ seguida de IMS, em função das dissociações ácidas.	90
Tabela 13 - Recuperação de (oo)cistos na amostra de lodo submetida a Al ₂ (SO ₄) ₃ seguida de IMS, em função das dissociações ácidas	91
Tabela 14 - Recuperação de cistos e oocistos de suspensões inoculadas em lodo, em função do método aplicado	94
Tabela 15 - Comparação dos métodos de recuperação de oocistos em lodo por análise estatística (teste t em que P<0,05 foi considerado significativo).....	94
Tabela 16 - Recuperação de (oo)cistos provenientes de ColorSeed TM em amostras de lodo com floculação em Fe ₂ (SO ₄) ₃ seguida de IMS, em função das dissociações ácidas.	95
Tabela 17 - Recuperação de (oo)cistos na amostra de ALF submetida a FM sem etapa de purificação.....	97
Tabela 18- Recuperação de (oo)cistos em amostras de ALF submetidas a FM + IMS, em função das dissociações ácidas.	99

Tabela 19 - Recuperação de cistos e oocistos de suspensões inoculadas em ALF, em função do método aplicado.....	100
Tabela 20 - Recuperação de (oo)cistos provenientes de ColorSeed™ em amostras de ALF submetidas a FM + IMS, em função das dissociações ácidas.	101
Tabela 21 - Percentual de oocistos de <i>Cryptosporidium parvum</i> corados com iodeto de propídio (IP), em função do método de recuperação aplicado.....	103
Tabela 22 - Custo unitário de reagentes consumíveis na recuperação de (oo)cistos em função das etapas de análise.....	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Inóculo de cistos e oocistos provenientes de (a) suspensões comerciais; (b) ColorSeed™	52
Figura 2- Amostras de lodo com inóculo de protozoário para concentração por FCCa: (a) sob agitação; (b) após precipitação química.....	54
Figura 3 - Amostras de água de lavagem de filtros com inóculo de protozoários sob agitação	60
Figura 4 - Itens aplicados na concentração de protozoários por FM: (a) Membranas de ésteres de celulose - 47 mm / 3µm; (b) conjunto porta filtro	60
Figura 5- (a) Montagem experimental para raspagem das membranas com Tween® 80 aquecido; (b) Detalhes da raspagem de membrana usada.....	61
Figura 6- Etapas da purificação da ALF por IMS: (a) reagentes do kit Dynabeads™; (b) homogeneização em mixer rotatório; (c) TLP no MPC™-1; (d) esferas magnéticas e protozoários retidos pelo ímã do MPC™-1; (e) tubos de microcentrífuga no MPC™-2.....	62
Figura 7- Jarros contendo água clarificada nos ensaios preliminares para definição de dosagens a serem aplicadas na construção dos diagramas de coagulação	65
Figura 8- Diagrama de coagulação para remoção de turbidez nas condições: dose de PAC entre 5 e 15 mg L ⁻¹ , Gmr = 1000 s ⁻¹ , Tmr = 10 s, Gml= 30 s ⁻¹ , Tf: 20 min, Vs = 2,0 cm min ⁻¹	66
Figura 9 - Diagrama de coagulação para remoção de turbidez nas condições: dose de PAC entre 5 e 15 mg L ⁻¹ , Gmr = 1000 s ⁻¹ , Tmr = 10 s, Gml= 30 s ⁻¹ , Tf: 20 min, Vs = 1,0 cm min ⁻¹	66
Figura 10 - Diagrama de coagulação para remoção de cor nas condições: dosagem de PAC entre 5 e 15 mg L ⁻¹ , Gmr = 1000 s ⁻¹ , Tmr = 10 s, Gml= 30 s ⁻¹ , Tf: 20 min, Vs = 2,0 cm min ⁻¹	67
Figura 11 - Diagrama de coagulação para remoção de cor nas condições: dosagem de PAC entre 5 e 15 mg L ⁻¹ , Gmr = 1000 s ⁻¹ , Tmr = 10 s, Gml= 30 s ⁻¹ , Tf: 20 min, Vs = 1,0 cm min ⁻¹	67
Figura 12 - Remoções de cor aparente e turbidez em função dos parâmetros operacionais de mistura rápida: (a) gradiente médio de velocidade de mistura, e; (b) tempo de mistura rápida	68
Figura 13 - Remoções de cor aparente e turbidez em função dos parâmetros operacionais de floculação: (a) gradiente médio de velocidade de mistura, e; (b) tempo de mistura lenta.....	69
Figura 14 - Turbidez da água filtrada ao longo da carreira de filtração em comparação às exigências da PRC nº 5 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017)	71
Figura 15 - Remoção de turbidez e cor ao longo das etapas de tratamento	71
Figura 16- Interface sólido-líquido do lodo em proveta graduada no tempo (a) zero, e; (b) 40 min	72

Figura 17- Curva de espessamento do lodo por gravidade, em função da altura da interface sólido-líquido ao longo do tempo.....	73
Figura 18 - Adensamento do lodo: (a) LB em t = 0; (b) LB em t = 19 min; (c) logo após a remoção do clarificado e homogeneização do remanescente, e; (d) comparação entre o sobrenadante removido.....	73
Figura 19 - Cistos de <i>Giardia muris</i> tratados com Merifluor® e Fluoroshield™ com DAPI, sem adição de corantes vitais, sob (a) DAPI; (b) FITC, e (c) DIC (800x).....	76
Figura 20 - Cisto de <i>G. muris</i> considerado viável, mediante tratamento com reagentes Merifluor®, Fluoroshield™ com DAPI e <i>Live/Dead Cell Assay</i> sob aumento de 400x em (a) DAPI, (b) FITC e (c) WG.....	77
Figura 21- Cistos de <i>G. muris</i> e oocistos de <i>C. parvum</i> tratados com Merifluor®, Fluoroshield™ com DAPI e reagentes do <i>Live/Dead Cell Assay</i> sob aumento de 400x em (a) DAPI, (b) FITC e (c) WG.....	78
Figura 22 - Cistos de <i>G. muris</i> tratados com Merifluor®, Fluoroshield™ com DAPI e reagentes do <i>Live/Dead Cell Assay</i> positivos para incorporação de corante impermeável à membrana e também fluorecendo em verde sob aumento de 400x em (a) FITC (b) WG.....	78
Figura 23 - Oocistos de <i>Cryptosporidium parvum</i> fluorecendo em verde, sendo (a) com interferência de sujidades e (b) sem interferentes, sob aumento de 400X no filtro FITC.....	79
Figura 24- Aglomerado de oocistos de <i>C. parvum</i> ocultados por sujidades, sob aumento de 400X no filtro FITC apresentando baixa fluorescência	79
Figura 25- Oocisto viável e suposto oocisto não viável de <i>Cryptosporidium parvum</i> (assinalado pela seta), sob aumento de 400X no filtro FITC	80
Figura 26- Cistos de <i>G. muris</i> tratados com Fluoroshield™ com DAPI e reagentes do <i>Live/Dead Cell Assay</i> , apresentando coloração vermelha sob aumento de 400x em (a) DAPI; (b) FITC; (c) WG.....	81
Figura 27- Aglomerado de cistos de <i>Giardia muris</i> tratados unicamente com o reagente do <i>Live/Dead Cell Assay</i> , visualizados com aumento de 400X sob (a) DIC; (b) FITC e; (c) WG.	82
Figura 28- Sujidades e esferas magnéticas prejudicando a visualização de (oo)cistos após primeira dissociação ácida e recuperação com CD + ICN 7X seguida de IMS. Visualização com aumento de 400x em: (a) DAPI; (b) DIC; (c) FITC; (d) WG.....	84
Figura 29- Alíquotas de lodo concentrado por FCCa sem etapa de purificação: (a) recém-inoculadas no poço de microscopia; (b) após preparo com os reagentes de RID	88
Figura 30- Cisto de <i>Giardia muris</i> recuperado do lodo submetido à $Fe_2(SO_4)_3$ + IMS, visualizado com aumento de 800x em (a) FITC; (b) DAPI; (c) DIC e; (d) WG.....	90
Figura 31- Cisto de <i>Giardia</i> sp. recuperado do lodo submetido à $Al_2(SO_4)_3$ + IMS, visualizado com aumento de 800x em (a) FITC; (b) DAPI; (c) DIC e; (d) WG.....	92
Figura 32 - Cistos de <i>G. muris</i> desagregados com tampão ácido, visualizados sob aumento de 400x em FITC.....	93
Figura 33- Oocistos de <i>C. parvum</i> recuperados da ALF recuperados por FM. Visualização com aumento de 400x em (a) DAPI; (b) FITC.....	97

Figura 34 - Cisto de <i>G. muris</i> recuperado da ALF por FM. Visualização com aumento de 400x em (a) DAPI; (b) FITC, e; Aumento de 800 x em (c) DAPI; (d) FITC.....	98
Figura 35 - Oocistos de <i>C. parvum</i> recuperados da ALF recuperados por FM + IMS. Visualização com aumento de 400x em (a) DAPI; (b) FITC.	99
Figura 36 - Aglomerado de <i>G. muris</i> e sujidades encontradas na suspensão visualizados em FITC sob aumento de (a) 200x, e; (b) 400x.....	100
Figura 37- Aspecto de cisto recuperado em amostra de ALF sob aumento de 400x em (a) FITC, (b) WG; (c) DAPI e; (d) DIC	102
Figura 38 - Aspecto de oocisto recuperado em amostra de ALF sob aumento de 400x em (a) FITC, (b) WG.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS

- AB – Água bruta
- ALF – Água de lavagem de filtros
- APHA – *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*
- CD – Centrifugação direta
- ICN 7X – solução de dispersão detergente
- 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
- FITC – Isotiocianato de fluoresceína
- FCCa – Floculação em carbonato de cálcio
- FLA – Filtro de laboratório de areia
- FM – Filtração em membranas
- HBSS - *Hanks' Balanced Salt Solution*
- IMS – Separação imunomagnética
- IP – Iodeto de propídio
- LATAR – Laboratório de Tratamento Avançado e Reúso de Água
- LA – Lodo adensado
- LB – Lodo bruto
- MPCTM-1 – Concentrador de partículas magnéticas 1
- MPCTM-2 – Concentrador de partículas magnéticas 2
- PAC – Cloreto de polialumínio
- PBS – Solução salina de fosfato
- SHS – Departamento de Hidráulica e Saneamento
- TLP – Tubo de lado plano
- USEPA – Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos
- USP – Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ – Sulfato de alumínio

CaCl_2 – Cloreto de cálcio

CaCO_3 – Carbonato de cálcio

$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ – Sulfato férrico

G_f – Gradiente de velocidade floculação

G_{mr} – Gradiente de velocidade de mistura rápida

H_2SO_4 – Ácido sulfúrico

H_3NSO_3 – Ácido sulfâmico

HCl – Ácido clorídrico

NaHCO_3 – Bicarbonato de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

pH – Potencial hidrogeniônico

pZ – Potencial zeta

rpm – Rotação por minuto

T_f – Tempo de mistura lenta

T_{mr} – Tempo de mistura rápida

uH – Unidade de cor (unidade Hazen)

uT – Unidade de turbidez (unidade nefolométrica de turbidez)

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	23
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1.	<i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp.....	25
2.2.	Remoção dos protozoários em tecnologias de ciclo completo	26
2.3.	Problemática dos resíduos gerados em estações de tratamento de água (ETAs)	28
2.3.1.	Lodo gerado no tratamento de água.....	28
2.3.2.	Água de lavagem de filtros	30
2.4.	Recuperação e detecção de protozoários em matrizes ambientais.....	31
2.4.1.	Concentração de protozoários em amostras	32
2.4.2.	Purificação	36
2.4.3.	Identificação e enumeração	37
2.5.	Estimativas de viabilidade de (oo)cistos.....	38
2.5.1.	Excitação	39
2.5.2.	Inclusão/exclusão de corantes.....	40
3.	OBJETIVOS.....	42
3.1.	Objetivos específicos	42
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1.	Coleta e armazenamento da água bruta	43
4.2.	Ensaio de tratabilidade e seleção de parâmetros operacionais para jartest ...	43
4.3.	Ensaio de tratabilidade com filtros de laboratório acoplados.....	44
4.4.	Geração de resíduos de tratamento em escala de bancada.....	46
4.4.1.	Lodo	46
4.4.2.	Água de lavagem dos filtros (ALF)	47
4.5.	Preparo de lâminas de microscopia.....	47

4.6.	Ensaio de viabilidade utilizando as suspensões.....	49
4.6.1.	Kit ab115347 <i>Live/Dead Cell Assay</i> (Abcam®).....	50
4.6.2.	Iodeto de propídio (IP)	51
4.7.	Métodos aplicados para a recuperação de protozoários no lodo	51
4.7.1.	Centrifugação direta com inserção de solução de dispersão (CD + ICN 7X), seguida de separação imunomagnética (IMS).....	53
4.7.2.	CD + ICN7X + IMS com etapa de remoção de partículas magnéticas....	53
4.7.3.	Floculação com carbonato de cálcio (FCCa)	54
4.7.4.	Floculação com carbonato de cálcio (FCCa) seguida de separação imunomagnética (IMS).....	56
4.7.5.	Floculação com sulfato férrico ($Fe_2(SO_4)_3$) seguida de separação imunomagnética (IMS).....	56
4.7.6.	Floculação com sulfato de alumínio ($Al_2(SO_4)_3$) seguida de separação imunomagnética (IMS).....	58
4.7.7.	Investigação do efeito do tampão de lise sobre cistos.....	58
4.8.	Métodos aplicados para a recuperação de protozoários na ALF.....	58
4.8.1.	Método de filtração em membrana (FM), utilizando suspensões de (oo)cistos	59
4.8.2.	Método de filtração em membrana, seguido de separação imunomagnética, (FM+IMS) utilizando suspensões de (oo)cistos.....	62
4.9.	Estimativa de viabilidade dos métodos de recuperação	63
4.10.	Avaliação de custos dos métodos de recuperação	63
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
5.1.	Tratabilidade da água simulando a tecnologia de ciclo completo com decantação.....	65
5.1.1.	Diagramas de coagulação com policloreto de alumínio (PAC).....	65
5.1.2.	Definição dos parâmetros de operação dos ensaios de tratabilidade	68
5.1.3.	Ensaio de filtração	70
5.1.4.	Análise da tecnologia proposta para a água em estudo.....	71

5.2. Geração e caracterização dos resíduos de tratamento de água	72
5.2.1. Adensamento do lodo	72
5.2.2. Caracterização geral dos resíduos de tratamento	74
5.3. Testes de viabilidade em (oo)cistos	75
5.3.1. Desempenho do kit ab115347 <i>Live/Dead Cell Assay</i> (Abcam®).....	76
5.3.2. Desempenho do iodeto de propídio (IP)	82
5.4. Recuperação de protozoários no lodo contendo volumes de suspensões de (oo)cistos.....	83
5.4.1. Resultados para centrifugação direta com inserção de solução de dispersão (CD + ICN 7X), seguida de separação imunomagnética (IMS)	83
5.4.2. Resultados obtidos por CD + ICN7X + IMS com etapa de remoção de partículas magnéticas	86
5.4.3. Resultados da concentração por floculação em carbonato de cálcio (FCCa).....	86
5.4.4. Resultados para FCCa + IMS com prévia remoção de partículas magnéticas.....	88
5.4.5. Resultados para floculação com $Fe_2(SO_4)_3$ + IMS	89
5.4.6. Resultados para floculação com $Al_2(SO_4)_3$ +IMS	91
5.4.7. Análise do efeito do tampão de lise sobre cistos de <i>Giardia muris</i>	92
5.4.8. Análise estatística dos métodos de recuperação aplicados para o lodo	93
5.5. Recuperação de protozoários no lodo com ColorSeed™ por $Fe_2(SO_4)_3$ + IMS.....	95
5.6. Recuperação de protozoários na água de lavagem de filtros (ALF), contendo volumes de suspensões de (oo)cistos	96
5.6.1. Resultados obtidos por FM + raspagem com Tween® 80 (0,1%, 45°)	96
5.6.2. Resultados obtidos pela FM + raspagem com Tween® 80 (0,1%, 45°) + IMS.....	98
5.7. Recuperação de protozoários na água de lavagem de filtros (ALF) contendo ColorSeed™	100

5.8. Estimativa de viabilidade dos métodos de recuperação aplicados	102
5.9. Estimativa de custo dos métodos de recuperação de protozoários.....	103
5. CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS	108
ANEXO 1 – Laudo técnico de análise do cloreto de polialumínio.....	118
ANEXO 2 – Especificação e laudo de análise da suspensão de <i>Cryptosporidium parvum</i>	119
ANEXO 3 – Especificação e laudo de análise da suspensão de <i>Giardia muris</i>	120
ANEXO 4 – Especificação e laudo de análise do inóculo ColorSeed™	121
ANEXO 5 – Certificado de análise do kit Dynabeads®	122
ANEXO 6 – Orçamentos e notas dos reagentes e materiais avaliados em termos de custos.....	124

1. INTRODUÇÃO

Infecções parasíticas são responsáveis por quadros de mortalidade e morbidade, sendo debilitantes devido à diarreia aguda. Estes casos ocorrem em grande parte da população, sobretudo de baixa renda em países em desenvolvimento, sendo então chamadas de “doenças tropicais negligenciadas”, dentre as quais se destacam as causadas por bactérias, helmintos e protozoários (COELHO et al., 2017; GENETU BAYIH et al., 2017; HOTEZ et al., 2007).

Os gêneros de protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium* incluem os parasitas entéricos mais comumente encontrados, responsáveis por doenças gastrointestinais causadoras de desequilíbrios nutricionais e problemas de saúde severos, principalmente em crianças e em pessoas com deficiências imunológicas (THOMPSON; ASH, 2016). As doenças transmitidas por *Giardia* e *Cryptosporidium* são chamadas giardíase e criptosporidiose, respectivamente.

Estudos recentes tratam da giardíase e da criptosporidiose na América do Norte (HOTEZ, 2008), na Europa (HOTEZ; GURWITH, 2011), na Ásia (CHO et al., 2013; KUMAR et al., 2016; MAHMOUDI; ONGERTH; KARANIS, 2017), na África (ALDEYARBI; ABU EL-EZZ; KARANIS, 2016; SQUIRE; RYAN, 2017), e especificamente no Brasil (COELHO et al., 2017), associando tais doenças à baixa renda familiar, populações vulneráveis e à falta de infraestrutura de saneamento. Isto porque efluentes e resíduos constituem fontes de disseminação de microrganismos no ambiente, podendo conter alta concentração de cistos e oocistos, promovendo a contaminação de corpos d'água e impactando principalmente os de abastecimento público (DE ARAÚJO et al., 2018; HOFSTRA; VERMEULEN, 2016). Estas parasitoses ocasionam um ciclo vicioso de exposição à pobreza e insalubridade, pois comprometem o desenvolvimento infantil e a produtividade dos trabalhadores (HOTEZ, 2008), o que exige maior atenção dos setores de saneamento e saúde pública.

Desde o tratamento da água há dificuldades na remoção de cistos e oocistos (HIJNEN et al., 2010; KARANIS; SCHOENEN; SEITZ, 1998). Mas na concepção do sistema de tratamento por ciclo completo, predominante no Brasil (IBGE, 2011), as maiores vias de remoção são a decantação (ou flotação) e a filtração, as quais envolvem a geração de resíduos (lodo e água de lavagem de filtros), onde são concentradas as impurezas e os microrganismos de dimensões semelhantes (ANDREOLI; SABOGAL-PAZ, 2017; FREITAS et al., 2010).

A ausência de manejo adequado destes resíduos implica risco à saúde pública, em especial, devido ao cenário brasileiro onde ocorre uma predominância no despejo indevido de lodo em corpos d'água (ACHON; BARROSO; CORDEIRO, 2013; ACHON; CORDEIRO,

2016) e no retorno de água de lavagem de filtros (ALF) ao sistema, sem que haja tratamento da mesma (FREITAS et al., 2010). Isso incentiva que a caracterização microbiológica dessas matrizes seja efetuada, com o objetivo de expor o risco a elas associado e, por consequência, incentivar sua gestão.

A detecção de cistos e oocistos de protozoários, contudo, representa um desafio, pois, além dos altos custos envolvidos, há uma limitação analítica nos métodos de recuperação, que apresentam baixa reprodutibilidade (FENG et al., 2011; FRANCO et al., 2012; FREGONESI et al., 2012). No caso de águas (superficiais, subterrâneas, tratadas, etc), segue-se o Método 1623.1, estabelecido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 2012), cuja qualidade analítica exige recuperação mínima de 8% para *Giardia* spp. e 32% para *Cryptosporidium* spp., o que em si constitui valores baixos, podendo subestimar a presença dos referidos protozoários na água. Conforme os valores de turbidez e a concentração de sólidos aumentam, a identificação dos organismos-alvo torna-se ainda mais difícil (EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017b). No caso de resíduos gerados em estações de tratamento de águas (ETAs), que possuem diferentes características físico-químicas, não há procedimento definido para detecção de (oo)cistos (GIGLIO; SABOGAL-PAZ, 2018), o que implica em subjetividade ainda maior na interpretação de dados de ocorrência de protozoários.

Além disso, a eficiência de alguns tipos de tratamento ou desinfecção é verificada por meio da inativação de microrganismos, o que não apresenta um parâmetro consensual (NETUSCHIL et al., 2014), principalmente para cistos e oocistos. Embora os métodos *in vitro* (desencistamento induzido, incorporação ou exclusão de corantes, etc) e *in vivo* (ensaios com animais) tenham sido desenvolvidos para avaliar a viabilidade e a infectividade de (oo)cistos, atualmente nenhum destes parece ser adequado para análises de rotina em estações de tratamento de água, de esgoto, ou na indústria de alimentos (ROUSSEAU et al., 2018), indicando uma lacuna metodológica a ser explorada.

Neste contexto, a motivação desta pesquisa se voltou para o fato de que a investigação de métodos de recuperação de protozoários em resíduos de ETA pode fornecer ferramentas para sua caracterização microbiológica, podendo avaliar seu risco e, desta forma, estimular o adequado tratamento e disposição de lodo e ALF. Além disso, investigar demais técnicas de estimativa de viabilidade, principalmente voltadas para inclusão e exclusão de corantes, pode apresentar uma alternativa simplificada que permita, por exemplo, avaliar o desempenho de sistemas de desinfecção.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.

Cryptosporidium e *Giardia* são gêneros de protozoários patogênicos que constituem uma das principais causas de surtos de doenças entéricas transmitidas pela água no mundo (EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017a). As formas infectantes destes patógenos são os cistos e oocistos, respectivamente, que são eliminados no ambiente por hospedeiros infectados. Oocistos de *Cryptosporidium* possuem morfologia esférica de aproximadamente 3 a 8 µm de diâmetro e cistos de *Giardia* variam entre 8 a 12 µm de comprimento por 5 a 10 µm de largura, apresentando morfologia oval (USEPA, 2012).

A taxonomia de *Giardia* e *Cryptosporidium* apresentava controvérsias principalmente devido à ampla gama de hospedeiros de ambos e à escassez de características morfológicas confiáveis para definir as espécies no âmbito da microscopia. Esses problemas foram resolvidos até certo ponto com a aplicação de ferramentas de biologia molecular. No entanto, a contribuição mais valiosa dessas ferramentas tem sido voltada para uma melhor compreensão da epidemiologia das infecções (MONIS; CACCIO; THOMPSON, 2009; THOMPSON; ASH, 2016).

Atualmente, com base em dados morfológicos e moleculares, 31 espécies de *Cryptosporidium* são reconhecidas como válidas, sendo que 20 foram encontradas no homem, possivelmente como hospedeiro acidental. Isto pois, dentre elas, *C. hominis* e *C. parvum* são responsáveis pelas infecções em humanos (CHECKLEY et al., 2015; KVÁČ et al., 2016; LI et al., 2015; ZAHEDI et al., 2016).

No caso de *Giardia*, seis espécies são reconhecidas no gênero, uma em anfíbios (*G. agilis*), duas em aves (*G. ardeae* e *G. psittaci*), duas em roedores (*G. muris* e *G. microti*) e uma em mamíferos (*G. duodenalis*). No caso de *G. duodenalis*, dois sinônimos também estão em uso por razões históricas: *Giardia intestinalis* e *Giardia lamblia*. Além da variação morfológica dos cistos e trofozoítos, que é a base da taxonomia, existe extensa variação genética entre e dentro de cada espécie, como demonstrado por estudos de proteínas (MONIS et al., 2003) e polimorfismos de DNA (CACCIÒ et al., 2008), de modo que *G. duodenalis*, especificamente, é organizada em termos de grupos genotípicos, i. e. *assemblages*. Há oito grupos particularmente relacionados (*assemblages* A a H) dentro de *G. duodenalis*, dos quais dois (A e B) são majoritariamente responsáveis por infecções em humanos (CERTAD et al., 2017; EINARSSON; MA'AYEH; SVÄRD, 2016).

De modo geral, estes parasitos vêm sendo repetidamente identificados em águas superficiais e em sistemas de tratamento (CASTRO-HERMIDA et al., 2009; CHUAH et al., 2016; DE ARAÚJO et al., 2018; GRACZYK et al., 2008; KUMAR et al., 2016; ONICHANDRAN et al., 2014; RAMO et al., 2017; WICKI; SVOBODA; TANNER, 2009) e sua presença no ambiente apresenta riscos significantes à saúde humana, sendo capazes de sobreviver por meses em águas superficiais e solos (GALLAS-LINDEMANN et al., 2013).

Dentre os fatores que contribuem para o sucesso destes organismos como parasitos, estão o fato de cistos e oocistos constituírem estruturas resistentes (BOUZID et al., 2013), principalmente pois *Giardia* spp. apresenta dupla parede (0,3 a 0,5 μm de espessura) (ERLANDSEN et al., 1996; ERLANDSEN; BEMRICK; PAWLEY, 1989) e *Cryptosporidium* spp. e demais organismos do filo Apicomplexa apresentam proteínas de superfície (TEMPLETON, 2004).

Estas formas infectantes são excretadas no ambiente em grande número por indivíduos infectados (e.g. da ordem de 10^9 oocistos de *Cryptosporidium* g^{-1} de fezes de bezerros), sendo que a dose infectante é teoricamente baixa e os oocistos são facilmente dispersos, principalmente por meio de água contaminada (ROUSSEAU et al., 2018; RYAN et al., 2016). Compilando dados secundários referentes à dose infectante destes parasitos, Rousseau et al., (2018) identificaram que o ID_{50} (número de (oo)cistos necessário para infectar 50% das pessoas expostas) foi estimado como sendo entre 10 e 83 oocistos para *C. hominis* e entre 10 e 2000 oocistos para *C. parvum*. Similarmente, o ID_{50} para cistos de *G. duodenalis* foi de 10 a 100 para que os indivíduos manifestassem sintomas, devendo-se considerar também que há casos assintomáticos.

2.2. Remoção dos protozoários em tecnologias de ciclo completo

O conceito de múltiplas barreiras guia o fornecimento seguro de água, envolvendo desde a proteção dos mananciais, até a otimização dos processos de tratamento e manutenção apropriada dos sistemas de distribuição (BETANCOURT; ROSE, 2004). De acordo com a Pesquisa Nacional de Saneamento Básico, 83,4% do total de ETAs brasileiras operam por meio da tecnologia de ciclo completo (IBGE, 2010), a qual engloba as etapas de pré-tratamento químico, coagulação, floculação, decantação ou flotação e filtração, seguidas de desinfecção e correção do pH.

A otimização do processo de coagulação, especificamente, promove melhora na eficiência das etapas seguintes do tratamento de ciclo completo, facilitando a remoção de

protozoários (LECHEVALLIER; AU, 2004). Ensaio de tratabilidade com a elaboração de diagramas de coagulação apresentam-se, portanto, como uma ferramenta para a seleção dos parâmetros operacionais, considerando o tipo de coagulante, pH de coagulação e dosagens, de modo a verificar as condições apropriadas para o tratamento com um objetivo específico (DI BERNARDO; DANTAS; VOLTAN, 2011).

Sais inorgânicos como sulfato de alumínio, sulfato férrico, cloreto férrico e sulfato ferroso clorado são comuns no processo de coagulação e floculação. Dentre esses coagulantes inorgânicos, os sais de ferro tendem a apresentar maior eficiência no tratamento (AMOKRANE; COMEL; VERON, 1997). Apesar disso, recentemente, vem ocorrendo um aumento no uso de formas poliméricas de coagulantes metálicos, tais como o cloreto de polialumínio (PAC). (GHAFARI et al., 2009; JUNG et al., 2016; NAIR; AHAMMED, 2015; SINHA et al., 2004).

Em comparação aos coagulantes convencionais, produtos poliméricos como o PAC apresentam algumas vantagens como ampla capacidade de remover partículas, turbidez ou matéria orgânica sem o consumo de alcalinidade do sistema e gerando menor volume de lodo (SINHA et al., 2004). Em uma pesquisa utilizando água simulada com caulinita e ensaios de tratabilidade em jarreste, Maciel e Sabogal-Paz (2017) verificaram desempenho satisfatório do PAC para a remoção de turbidez, mesmo diante da menor dosagem estudada (25 mg L⁻¹ de produto comercial equivalentes a 2,34 mg L⁻¹ de Al³⁺), não tendo exigido ajuste de pH. Além disso, diante de estudo com sua aplicação em escala de bancada para tratamento em ciclo completo, foram verificados valores positivos de potencial zeta e remoções de até 2-log para cistos de *Giardia* spp. e oocistos *Cryptosporidium* spp. (MACIEL; SABOGAL-PAZ, 2016).

Adicionalmente, a filtração desempenha papel fundamental na remoção de cistos e oocistos, principalmente por constituir uma barreira física (GALLAS-LINDEMANN et al., 2013). Entretanto, cistos de *Giardia* spp. apresentam dimensões entre 8 e 18 µm de diâmetro e oocistos de *Cryptosporidium* spp. variam entre 4 e 6 µm (USEPA, 2012). Dados esses tamanhos, os (oo)cistos são potencialmente removíveis pelos filtros, mas os oocistos possuem capacidade de compressibilidade (LI; GOODRICH; OWENS, 1995), o que pode facilitar sua passagem pelo meio filtrante e presença na água filtrada. O mecanismo de coagulação aplicado previamente, a taxa de filtração, a espessura do leito, o tamanho dos grãos do meio filtrante (LECHEVALLIER; AU, 2004) e o estado de amadurecimento do filtro, seja por fatores abióticos ou crescimento de biofilme (PAPINEAU et al., 2010) constituem fatores intervenientes na eficiência de remoção de protozoários e, portanto, devem ser estudados para o desempenho adequado do tratamento e garantia de qualidade da água tratada.

2.3. Problemática dos resíduos gerados em estações de tratamento de água (ETAs)

Os resíduos gerados nas ETAs de ciclo completo por decantação são predominantemente o lodo dos decantadores e a água de lavagem de filtros (ALF). No primeiro caso, trata-se de um resíduo sólido com alto teor de umidade, categorizado como tal pela Norma Brasileira NBR 10.004 (ABNT, 2004). A ALF, por sua vez, constitui-se de um efluente líquido, proveniente da lavagem para expansão do leito filtrante e remoção de impurezas.

2.3.1. Lodo gerado no tratamento de água

O lodo produzido no tratamento de água é caracterizado por alta concentração de substâncias inorgânicas, principalmente precipitados de hidróxidos, derivados de coagulantes metálicos, metais e material suspenso provenientes do solo do manancial de captação e também microrganismos concentrados no processo de tratamento (ZHOU et al., 2015). Devido a estas características, bem como o alto teor de umidade, o tratamento geralmente envolve desaguamento, visando a redução de volume a ser disposto, o que pode ser feito por lagoas e leitos de secagem, adensamento mecânico em centrífugas, filtros-prensa, dentre outros (ANDREOLI, 2001; QI; THAPA; HOADLEY, 2011).

Considerando o caráter de resíduo sólido, o manejo da torta de lodo deve ser feito de acordo com a Lei 12.305 (BRASIL, 2010), que institui a Política Nacional dos Resíduos Sólidos, de modo que a disposição em aterro após o desaguamento é um método comum de descarte. No entanto, o lodo não constitui um rejeito, e esta disposição não é mais adequada, tampouco a mais prática devido à demanda de espaço e os custos de operação de aterros sanitários (AHMAD; AHMAD; ALAM, 2016). A crescente preocupação com a poluição ambiental e o controle efetivo dos resíduos incentivam pesquisas em estratégias alternativas de manejo (JUNG et al., 2016).

Em função da concentração de precipitados provenientes do uso de coagulantes baseados em ferro ou alumínio, há estudos que abordam o aproveitamento do lodo de ETA visando a recuperação de coagulantes (CHENG et al., 2012; KEELEY et al., 2016; NAIR; AHAMMED, 2015). Outras opções incluem seu uso como coagulante no tratamento de efluentes, adsorvente de metais pesados, meio suporte em *wetlands* construídos, constituinte na produção de cimento, tijolos e cerâmica, dentre outros (ABO-EL-ENEIN; SHEBL; ABO EL-DAHAB, 2017; BAI et al., 2014; LI et al., 2016; YUAN; WANG; PEI, 2016).

Apesar do potencial descrito, este cenário de aproveitamento do lodo não se aplica em países em desenvolvimento, em que esta matriz tende a ser ambientalmente negligenciada, despejada diretamente em rios ou no sistema de drenagem (que também retorna ao corpo d'água). Isso promove dano direto à qualidade da água, levando ao aumento acumulado no nível de alumínio e outros metais (AHMAD; AHMAD; ALAM, 2016). Além disso, o despejo do lodo pode causar contaminação microbiológica, em função da concentração de microrganismos no resíduo, principalmente cistos e oocistos, os quais constituem formas resistentes, capazes de sobreviver por longos períodos de tempo e em diferentes condições ambientais (KEEGAN et al., 2008).

No Brasil, especificamente, ainda é comum a disposição final do lodo diretamente nos recursos hídricos, sem que haja o tratamento adequado (IBGE, 2010). Achon e Cordeiro (2016), em um estudo que avaliou a destinação do lodo proveniente de 22 ETAs de uma mesma sub-bacia localizada no Estado de São Paulo, confirmaram que prevalece a disposição *in natura* nos corpos d'água, sendo 77% do lodo lançado diretamente nos corpos receptores sem tratamento prévio e, no caso das ETAs que possuem tratamento, 14% do lodo desaguado é disposto em aterro e 9% é disposto de forma inadequada.

Novamente, cabe destacar que as características dos resíduos do tratamento de água estão diretamente relacionadas à qualidade do manancial (IPPOLITO; BARBARICK; ELLIOTT, 2011), o qual pode apresentar risco microbiológico, principalmente em função de contaminações. Em análise realizada por 19 meses em 28 locais situados em 10 diferentes bacias do estado de São Paulo, foram detectados cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 27,5 e 2,5% das amostras coletadas, respectivamente (HACHICH et al., 2004). Em 2011, uma pesquisa similar também no estado de São Paulo, detectou 41,6% de amostras de água superficial e esgoto positivas para *Giardia duodenalis*, com a verificação da presença do genótipo tipo AII, associado à giardiase humana (FERNANDES et al., 2011). Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram encontrados em 42,8% de amostras coletadas no rio Atibaia e 85,7% no rio Capivari. *Giardia* spp. foi detectada em 100% das amostras de ambos os rios, que são mananciais abastecedores na cidade de Campinas (FRANCO et al., 2016).

Andreoli e Sabogal-Paz (2017), em ensaios em escala de bancada simulando o tratamento por ciclo completo por flotação com ar dissolvido, mostraram que aproximadamente 18% dos cistos de *Giardia* spp. e 82% de oocistos de *Cryptosporidium* spp. presentes na água bruta ficam presentes no lodo da flotação. Diante do cenário de contaminação, espera-se a ocorrência de cistos e oocistos no lodo de ETAs seja ainda mais

acentuada, indicando a necessidade de caracterizar o lodo de ETA em termos de parâmetros microbiológicos, incentivando seu tratamento e a disposição adequada.

2.3.2. Água de lavagem de filtros

Enquanto o lodo se destaca como resíduo em termos mássicos, a água de lavagem de filtros (ALF), em uma estação de tratamento de água (ETA) por ciclo completo, representa a maior quantidade de resíduos em volume (LUSTOSA et al., 2017), o que pode corresponder a aproximadamente 5% do volume total de água tratada pela ETA (FREITAS et al., 2010).

Considerando o volume gerado, é uma tendência que estações de tratamento realizem a recirculação da ALF, que significa retorná-la ao canal de chegada de água bruta (AB). Entretanto, a esta prática pode acarretar maior risco microbiológico principalmente, pois os filtros constituem barreira para partículas com tamanho correspondente a cistos e oocistos (LECHEVALLIER; AU, 2004). A ALF, portanto, tende a conter (oo)cistos retidos no meio granular (quando presentes no manancial), o que pode implicar em concentrações até mesmo maiores do que as obtidas na água bruta (FREITAS et al., 2010; GALLAS-LINDEMANN et al., 2013).

Com o intuito de avaliar o potencial de contaminação por cistos e oocistos, Karanis, Schoenen e Seitz (1996) examinaram amostras de AB do manancial abastecedor de uma estação de ciclo completo por decantação e amostras de água de lavagem dos filtros. Os resultados para AB foram positivos para *Giardia* spp. em 83% das amostras e para *Cryptosporidium* spp. em 67%. Na ALF, 87% das amostras apresentaram cistos de *Giardia* spp. e 84% continham oocistos, o que corrobora a indicação da presença de patógenos nesta matriz. Similarmente, Andreoli e Sabogal-Paz (2017) identificaram presença expressiva de protozoários na água de lavagem de filtros de laboratório (FLA), ao simular o ciclo completo com flotação em escala de bancada, trabalhando com água simulada com caulinita e ácido húmico e inóculo de cistos e oocistos. No caso, comparando a média dos organismos presentes na água clarificada com o encontrado na ALF, esta continha 63,71% dos cistos de *Giardia* spp. e 83,16% dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., entendidos como o conteúdo retido no meio filtrante.

Demais estudos, como os de Di Giovanni et al. (1999) e Gibbons, Rigi, Awad-Ei-Kariem (1998) também trataram das questões microbiológicas associadas a (oo)cistos em água de lavagem de filtros. Entretanto, estes trabalhos tiveram ênfase na detecção dos protozoários, em função da ausência de protocolo padrão para esta matriz (discutido em detalhes no item 2.4). Por conta disso, foi realizado inóculo diretamente na água de lavagem,

não constituindo dado sobre a presença autóctone na AB e a concentração dos organismos na ALF.

2.4. Recuperação e detecção de protozoários em matrizes ambientais

Os procedimentos aplicados na detecção de protozoários, especialmente oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos *Giardia* spp., representam um desafio. Isto porque, além dos custos envolvidos em termos de insumos e equipamentos e a complexidade analítica dos exames (ANDREOLI; SABOGAL-PAZ, 2017), há grande variabilidade e baixa reprodutibilidade (FRANCO et al., 2012; FREGONESI et al., 2012).

Atualmente, existe um protocolo padrão estabelecido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, o Método 1623.1 (USEPA, 2012), indicado para a análise de amostras de água, sendo aplicável para água superficial, subterrânea, tratada, etc. Entretanto, demais matrizes, tais como efluentes em geral e lodo diferem das amostras de água quanto a número de parasitos, turbidez, concentração de material suspenso e metais, dentre outros parâmetros de qualidade (BONATTI; FRANCO; NETO, 2007), que podem comprometer o desempenho do protocolo da USEPA, não fornecendo uma recuperação razoável para cistos e oocistos.

No caso de matrizes complexas, a não existência de um procedimento padrão reforça o desafio de detecção, podendo subestimar riscos microbiológicos. Com isso, pesquisas vêm buscando ajustar os métodos existentes, com o objetivo de estabelecer um protocolo específico que considere as particularidades das amostras ambientais em estudo, e. g. esgoto bruto e tratado (MEDEIROS; DANIEL, 2015), amostras de água ao longo das etapas de tratamento (ANDREOLI; SABOGAL-PAZ, 2017; KEEGAN et al., 2008), resíduos de tratamento de água (GIGLIO; SABOGAL-PAZ, 2018), dentre outras.

Avaliar a eficiência de recuperação de (oo)cistos de protozoários é essencial para realizar uma comparação realista entre dados e garantir a confiabilidade dos resultados (ONGERTH, 2013). A ausência da avaliação de qualidade analítica do método de detecção implica a possibilidade de conclusões errôneas e imprecisas (EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017b), principalmente quanto a dados de monitoramento ou desinfecção. No caso de matrizes ambientais diversas, esta avaliação é ainda mais pertinente. Nessas avaliações, recomenda-se que o inóculo seja feito com suspensões comerciais com número conhecido de organismos, como BTF EasySeedTM ou Waterborne AccupikeTM recomendados pelo Método 1623.1 ou BTF ColorSeedTM indicado pelo Método 1693 (USEPA, 2012, 2014).

De modo geral, independentemente do protocolo aplicado, pode-se dizer que a identificação e detecção de cistos e oocistos em amostras requer três etapas: concentração, purificação e enumeração. Alguns dos procedimentos utilizados são apresentados a seguir.

2.4.1. Concentração de protozoários em amostras

A etapa de concentração tem por objetivo a redução de volume da amostra, de modo a, justamente, concentrar partículas maiores que um tamanho mínimo ou que apresentem uma determinada velocidade de sedimentação associadas aos organismos-alvo (EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017b). Dentre as técnicas disponíveis, podem ser utilizadas diferentes formas de floculação, filtração, centrifugação e diferentes combinações destes procedimentos.

2.4.1.1. Filtração

O procedimento mais popular visando isolar protozoários de amostras de água tem sido a filtração (EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017b). O método 1623.1 da USEPA (2012) o recomenda para a concentração de amostras, reconhecendo sistemas de filtração em cápsulas contendo filtros de polisulfona (Environcheck® e FiltaMax®), em que, finalizada a filtração, é feita a eluição da espuma filtrante com soluções de tamponamento contendo Tween® 80. Entretanto, devido ao custo dos equipamentos, baixas eficiências de recuperação e pouca praticidade no campo, há intensa exploração de alternativas para filtração, em especial incluindo membranas (EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017b).

No caso da filtração por membranas (FM), há relatos de seu uso na concentração de amostras para recuperar *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água incluindo diferentes tipos: membranas de policarbonato de 142 mm com poros de 1 µm, de acetato de celulose de 47 mm e 1,2 µm de porosidade nominal (ALMEIDA et al., 2015), ésteres mistos de celulose de 47 mm e 3 µm (FRANCO; ROCHA-EBERHARDT; CANTUSIO NETO, 2001; GUIMARÃES et al., 2014), dentre outras.

No tocante a outras matrizes, há pesquisas que aplicaram membranas de ésteres de celulose (47 mm; 3 µm) na concentração de efluentes de reator anaeróbio (SANTOS; DANIEL, 2017) e de sistemas de lodos ativados (MEDEIROS; DANIEL, 2015). Com isso, apesar da limitação relacionada a matrizes turvas exigirem um maior número de membranas (FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012), há clara aplicabilidade do método para amostras de baixa e média turbidez.

Após a FM, independentemente do tipo de membrana usada, é realizada a extração mecânica do material retido (por meio de raspagem), utilizando solução eluidora Tween® 80 a 0,1% e posterior concentração do eluato por centrifugação. Há também a possibilidade de raspar as membranas utilizando Tween® 80 0,1% aquecido a 45° (FRANCO et al., 2016).

2.4.1.2. Floculação

A ideia de concentração por floculação é baseada no ajuste de pH de uma amostra e utilização de reagente salino que permita a formação de flocos e sua sedimentação por precipitação química.

Uma técnica de floculação foi desenvolvida por Vesey et al. (1993) com o objetivo de concentrar oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de volume de 10 litros de água. Neste procedimento, a amostra era submetida à agitação rápida com a adição de 100 ml de soluções de cloreto de cálcio (1M) e bicarbonato de sódio (1M). A seguir, o pH era elevado até 10 aplicando com solução de hidróxido de sódio a 1M. A amostra era então deixada em repouso *overnight*, para que o sobrenadante fosse descartado. O precipitado era então homogeneizado com auxílio de 200 mL de ácido sulfâmico (H_3NSO_3) a 10% e, depois, concentrado por sucessivas centrifugações (3000 G; 10 min) até a obtenção de um sedimento a ser aliquoteado.

Este procedimento foi posteriormente adaptado por Feng et al., (2011), que determinou que o sedimento formado por FCCa (floculação em carbonato de cálcio), utilizando matrizes com a mesma qualidade que em testes de concentração por filtração em membranas, foi consideravelmente maior, podendo chegar a 4 mL. Isto dificulta a realização de etapas de purificação por separação imunomagnética (apresentada com maior detalhe no item 2.4.2), o que pode constituir um inconveniente analítico.

Ajustes da técnica de FCCa foram também empregados em pesquisas recentes, utilizando volumes menores da matriz investigada, como em Andreoli e Sabogal-Paz (2017), que verificaram a presença de cistos de *Giardia* spp e oocistos de *Cryptosporidium* spp. ao longo das etapas do tratamento de água por ciclo completo com flotação e obtiveram recuperações de 31,5% para *Giardia* spp. e 70,3% para *Cryptosporidium* spp. ao avaliar a qualidade analítica do método empregado em água sintética com alta turbidez, inoculada com (oo)cistos provenientes do kit comercial AccuPike®, reconhecido pela USEPA para avaliação de qualidade analítica de métodos de recuperação.

Vantagem da floculação com carbonato de cálcio é a possibilidade de ser usada em matrizes com alta turbidez. Exemplo recente da aplicação deste procedimento foi sua investigação em resíduos de tratamento de água, na concentração de amostras de 1 L, com

centrifugação com gradiente reduzido (1500 G; 20 min), onde houve recuperação de $60,2\% \pm 26,2$ para oocistos de *Cryptosporidium* spp. e $46,1\% \pm 5$ para cistos de *Giardia* spp. em volumes predefinidos de suspensões comerciais contendo (oo)cistos purificados (GIGLIO; SABOGAL-PAZ, 2018).

Entretanto, este método possui limitações relacionadas à alteração da viabilidade, à perda de organismos no descarte do sobrenadante e à possibilidade de resultados falso-negativos ou falso-positivos, devido a alterações morfológicas nos protozoários, que podem ocorrer em decorrência do pH básico utilizado para facilitar a precipitação química (FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012).

Sais metálicos como o sulfato férrico e o sulfato de alumínio também constituem possíveis floculantes que podem ser aplicados na concentração de protozoários em amostras (GALLAS-LINDEMANN et al., 2013; KARANIS; KIMURA, 2002; KOURENTI et al., 2003; VESEY et al., 1993; WICKI; SVOBODA; TANNER, 2009). O estudo de Vesey et al. (1993) que avaliou o carbonato de cálcio como agente floculante incluiu também estes sais metálicos. Houve, contudo, menos de 10% de recuperação de oocistos com sulfato férrico e, apesar de ter sido obtido 59% de recuperação com o uso de sulfato de alumínio, verificou-se interferência na microscopia de imunofluorescência, havendo dificuldade de leitura.

Pesquisas posteriores, de Karanis e Kimura (2002) compararam a recuperação de oocistos de *Cryptosporidium parvum* também para a concentração com sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) e carbonato de cálcio. No caso, houve melhores recuperações para sulfato férrico (61,5%), seguido de sulfato de alumínio (58,1%) e então FCCa (38,8%). O fator diferencial neste estudo em comparação ao de Vesey et al. (1993) foi o pH, que inicialmente havia sido básico (9,0) e, nos ensaios de Karanis e Kimura (2002), foi levemente ácido.

O procedimento de floculação ácida relatado consistiu no ajuste de pH da matriz (água inoculada com protozoários das ordens de 10^5 e 10^6 oocistos L^{-1}) para 6,0, no caso do sulfato férrico e 5,4 para o sulfato de alumínio e na inserção de volumes das respectivas soluções salinas para gerar as concentrações de $5 \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$ e $16 \text{ mg L}^{-1} \text{ Al}^{3+}$, respectivamente. Após a remoção dos sobrenadantes, a centrifugação dos precipitados era feita com resfriamento a 4°C e sob gradiente de 2000 G por 10 min. Ambos os sedimentos formados eram dissolvidos em tampão ácido com pH 4,7 (KARANIS; KIMURA, 2002).

Dentre as limitações do uso de agentes floculantes que utilizam ácidos para a dissolução do precipitado estão a redução da fluorescência dos cistos e oocistos nas amostras e à ineficiência em matrizes de baixa turbidez (menos que 1 UT), como a água tratada

(FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012). Contudo, estes métodos foram reproduzidos por Kourenti et al. (2003) para a detecção de *Toxoplasma gondii* em água, apresentando recuperação de 96,5% com o uso de $Al_2(SO_4)_3$ e 93,1% com $Fe_2(SO_4)_3$. O procedimento foi utilizado também para concentrar amostras ambientais visando verificar a ocorrência de cistos de *Giardia duodenalis* em córregos (WICKI; SVOBODA; TANNER, 2009) e em águas residuárias (GALLAS-LINDEMANN et al., 2013), tornando-o interessante na investigação de matrizes diversas.

2.4.1.3. Centrifugação

A manutenção da viabilidade dos parasitos é algo fundamental nos métodos usados para recuperar protozoários, uma vez que esta inferência é utilizada para avaliar o risco microbiológico de amostras e o desempenho de sistemas de tratamento ou desinfecção (ROCHELLE et al., 1999). Neste contexto, há a centrifugação direta para a concentração de amostras (ASSAVASILAVASUKUL et al., 2008; ZUCKERMAN; TZIPORI, 2006).

Pesquisas que trabalham com centrifugação buscam investigar os tempos requeridos, temperatura e gradiente, a exemplo dos testes realizados por Kourenti et al. (2003) com a forma esporulada de *Toxoplasma gondii*. Seu estudo, no caso, indicou recuperações satisfatórias na existência de grande número de oocistos (da ordem de 10^5), tendo diminuído em situações de prevalência menor. Além disso, houve maior recuperação média na utilização de gradientes altos ($G \geq 2000$), o que não foi estatisticamente inferido, reiterando a baixa reprodutibilidade de experimentos com protozoários.

Dentre as vantagens deste procedimento, cita-se a simplicidade laboratorial, principalmente para amostras de maior volume, pois não exige serviços laboriosos como a troca de membranas colmatadas ou eluições sucessivas, além de não alterar a viabilidade dos organismos-alvo (EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017b). Isto torna a centrifugação uma alternativa principalmente no que concerne matrizes turvas, conforme recomendado pelo Método 1693 da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, como alternativa à filtração na concentração de amostras para recuperar protozoários em águas residuárias desinfetadas (USEPA, 2014).

Exemplo da aplicação deste procedimento foi a pesquisa de Medeiros e Daniel (2015), utilizando esgoto bruto submetido à tripla centrifugação (1500 G, 15 min). Este experimento (seguido de purificação) promoveu $85,0\% \pm 12,9$ e $20,0\% \pm 8,2$ de recuperação de cistos e oocistos, respectivamente, provenientes de inóculo com ColorSeed™ na matriz, com turbidez média de 165 uT. Outra adaptação do método incluiu a utilização de solução de dispersão detergente ICN 7X na centrifugação de lodo simulado de tratamento de água (1500 G, 20

min) inoculado com suspensões comerciais de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., tendo sido recuperados $41,2\% \pm 43,3$ e $37,9\% \pm 52,9$ de cistos. e oocistos, respectivamente (GIGLIO; SABOGAL-PAZ, 2018).

2.4.2. Purificação

Em função da matriz e/ou do método de concentração empregado, é possível que as amostras contenham sujidades que podem dificultar a identificação dos protozoários. O acréscimo da etapa de purificação, também chamada de concentração seletiva, visa remover tais impurezas por meio de separação por gradientes de densidade ou técnicas que utilizam anticorpos específicos (EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017b; ZARLENGA; TROUT, 2004).

A concentração seletiva foi adaptada dos procedimentos de exame para detecção de parasitos em fezes, que em geral se baseavam em flotação com sulfato de zinco ou outros meios gradientes como citrato de potássio ou sacarose. No caso da sacarose, especificamente, há pesquisas que a utilizaram na recuperação de cistos e oocistos em amostras de água (KIMURA et al., 2000), esgoto bruto (MCCUIN; CLANCY, 2005), efluentes tratados por lodo ativado (BONATTI; FRANCO; NETO, 2007), dentre outras amostras ambientais. Contudo, a técnica, apesar de apresentar custo reduzido como vantagem, apresentou baixas recuperações e resultados variáveis nestes estudos, além de considerável transporte de sujidades. Isto cedeu espaço às técnicas que envolviam o uso de anticorpos (MCCUIN; CLANCY, 2005).

A técnica apontada pelos Métodos 1623.1 e 1693 para amostras de água e esgoto desinfetado, respectivamente (USEPA, 2012, 2014), é a separação imunomagnética (IMS – *immunomagnetic separation*) realizada por meio do kit comercial Dynabeads® GC Combo. O procedimento consiste em usar microesferas magnetizadas (*beads*) baseadas em sais metálicos superparamagnéticos associadas a macromoléculas (AUSTIN; PAGOTTO, 2003). No caso, estas macromoléculas são anticorpos monoclonais específicos, permitindo a captura dos cistos e oocistos. O protocolo, atualizado pelo fabricante, envolveu sugestões em termos de volume da amostra e sua turbidez, tempo de rotação e contato com os reagentes, pH, concentração de *beads* e técnicas de dissociação, compiladas em revisão de literatura realizada por Efstratiou, Ongerth e Karanis (2017b).

As limitações da IMS estão relacionadas principalmente a seu custo elevado e complexidade analítica (ANDREOLI; SABOGAL-PAZ, 2017; MACIEL; SABOGAL-PAZ, 2016). Além disso, a dissociação dos (oo)cistos das esferas magnéticas pode ser realizada por

meio de via térmica ou ácida, de forma que ambas atuam com condições ambientais invasivas, que podem interferir na viabilidade dos organismos.

2.4.3. Identificação e enumeração

A etapa de enumeração envolve a identificação e quantificação dos protozoários. No monitoramento de cistos e oocistos em água, há relatos de grande variedade de técnicas, mas clara predominância nas baseadas em biologia molecular ou microscopia (EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017b).

Quanto aos métodos que envolvem genética, Adeyemo et al. (2018), em uma revisão que contemplou diversas técnicas de detecção, destacaram vantagens como a especificidade e confiabilidade dos ensaios, o que permite atuação mais direcionada no controle de epidemias e ações preventivas. Os autores verificaram que a identificação de genótipos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. têm sido realizada em amostras ambientais por meio de FISH (*fluorescence in situ hybridization*), PCR (*polymerase chain reaction*) e qPCR (*quantitative PCR*). Contudo, apesar de promissoras, estas técnicas avançadas de biologia molecular ainda são relativamente incipientes em países em desenvolvimento, principalmente devido aos seus custos (ADEYEMO et al., 2018).

Técnicas de microscopia aplicadas para a visualização de cistos e oocistos têm sido exploradas em campo claro (BF – *bright-field*), contraste interferencial diferencial (DIC – *differential interferential contrast*) e fluorescência (EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017b). Os primeiros métodos para visualização em BF foram baseados na fixação da amostra com Lugol e visualização sem adição de corantes, o que pode prejudicar a detecção de organismos em amostras que apresentem sujidades ou baixa concentração de parasitos. Alguns corantes foram estudados para visualização de (oo)cistos em campo claro, mas há dificuldades vinculadas a parâmetros como a técnica de coração, preparo do reagente, variabilidade na incorporação de corantes e não seletividade (ZARLENGA; TROUT, 2004).

Ainda sob a luz visível, é possível visualizar cistos e oocistos por contraste de fase ou contraste diferencial interferencial (DIC), sendo que ambas as técnicas fornecem maior contraste entre o espécime e o fundo da imagem, o que auxilia significativamente na visualização das estruturas do organismo e sua morfologia, provendo, conseqüentemente, melhor identificação comparada à microscopia de campo claro (EFSTRATIOU; ONGERTH; KARANIS, 2017b).

Métodos imunológicos com visualização em microscopia de fluorescência oferecem várias vantagens sobre as técnicas usadas para luz visível, principalmente em termos de

sensibilidade e especificidade na detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em vários tipos de amostras (KOEHLER et al., 2014). Apesar de não ser possível identificar a espécie do organismo, esta técnica analítica é considerada melhor e mais precisa do que a visualização tradicional em microscopia de campo claro (BRESCHIA et al., 2009).

Neste contexto, há destaque para a reação de imunofluorescência direta (RID), que envolve o uso de reagentes contendo anticorpos monoclonais com corantes combinados ao fluorocromo FITC (isotiocianato de fluoresceína) para análise em fluorescência (JOHNSTON et al., 2003). Este teste apresenta especificidade, não requer longo tempo e também é considerado mais simples de executar, além de que, em termos analíticos, a qualidade dos reagentes resulta em pouca fluorescência no *background* e mínima coração não-específica, o que facilita a identificação dos organismos-alvo (VOHRA; SHARMA; CHAUDHARY, 2012).

A RID se tornou largamente utilizada e atualmente é reconhecida pelo Método 1623.1 da USEPA (2012) como exame padrão para detecção de (oo)cistos, junto ao teste confirmatório da morfologia por DIC e empregando a coração com DAPI (4',6-diamino-2fenil-indol), que tingem o material genético dos organismos, evidenciando seus núcleos. Para a análise da RID em FITC, o Método 1623.1 reconhece os kits comerciais Merifluor® *Cryptosporidium/Giardia*, Aqua-Glo™ G/C Direct FL, Crypt-a-Glo™ e Giardi-a-Glo™, e EasyStain™ C&G. Estudos que compararam o desempenho dos diversos kits indicaram que o Merifluor® é mais sensível e engloba uma maior especificidade de cistos de *Giardia* spp. que os demais (ALDERISIO et al., 2017; JOHNSTON et al., 2003).

2.5. Estimativas de viabilidade de (oo)cistos

A verificação da eficiência de tratamentos e a análise de qualidade microbiológica de amostras ambientais, água e resíduos está atrelada à estimativa da viabilidade e infectividade dos patógenos. Há, contudo, imprecisão na definição de estados viáveis de organismos, criando debates em diferentes níveis, pois células em uma mesma população podem apresentar diversos estágios entre o “vivo” e o “morto”, que constituem extremos difíceis de definir (DAVEY, 2011; NETUSCHIL et al., 2014).

A infectividade define a capacidade de que o parasito complete seu ciclo de vida em hospedeiro. Testes de infectividade animal são considerados onerosos e dispendiosos para análises de rotina, além de demandar uma concentração de (oo)cistos mínima e levantar

questões vinculadas à ética com pesquisas em animais (KOEHLER et al., 2014; ROUSSEAU et al., 2018).

A viabilidade, por sua vez, constitui-se de uma inferência quanto à quantidade de células vivas, com base na sua atividade metabólica ou integridade celular. Contudo, (oo)cistos intactos e metabolicamente funcionais não são necessariamente infecciosos, pois seus esporozoítos/trofozoítos podem falhar em causar infecções nos hospedeiros. Com isso, este tipo de análise pode subestimar a eficiência de tratamentos, o que é vantajoso do ponto de vista de saúde pública, pois superestima o risco e considera o pior cenário (ROUSSEAU et al., 2018).

Este tipo de estimativa pode ser realizada por meio de técnicas como excistação (desencistamento) *in vitro* (PECKOVÁ et al., 2016; SMITH; NICHOLS; GRIMASON, 2005) ou a exclusão/inclusão de corantes (GÓMEZ-COUSO et al., 2009; GRIT et al., 2012; KINYUA et al., 2016; ROBERTSON et al., 2014).

2.5.1. Excistação

Considerando que a excistação (desencistamento) é necessário para a transmissão da giardíase e da criptosporidiose, a capacidade de realizar este processo pode indicar uma estimativa da viabilidade do organismo (BOUCHER; GILLIN, 1990). Em laboratório, os ensaios *in vitro* imitam as condições ambientais em que o desencistamento ocorre, por meio de exposição a meio ácido e posterior incubação em sais biliares, agentes redutores e enzimas proteases a 37°C, reproduzindo as condições às quais os parasitos estariam submetidos na transição entre o estômago e o intestino do hospedeiro (PECKOVÁ et al., 2016; ROUSSEAU et al., 2018).

Pecková et al. (2016) compararam diferentes protocolos para desencistamento induzido de oocistos de *Cryptosporidium parvum*, os quais diferiam em suas respectivas etapas de pré-incubação química, meios de excistação ou tempo de incubação. O estudo indicou diferenças significativas para a recuperação de oocistos viáveis ao modificar os procedimentos de pré-incubação, mas as demais variáveis estudadas não apresentaram viabilidade significativamente diferente do ponto de vista estatístico.

A hierarquia e os sinergismos dos fatores que promovem o desencistamento não são completamente compreendidos, na medida em que há uma variedade de protocolos apresentados na literatura e ausência de procedimento padrão (SMITH; NICHOLS; GRIMASON, 2005). Outra limitação do método de excistação *in vitro* requer um grande

número de (oo)cistos purificados, o que não costuma ser um cenário realista em amostras ambientais (ROUSSEAU et al., 2018).

2.5.2. Inclusão/exclusão de corantes

Dentre os ensaios para inferir sobre a viabilidade por meio de aplicação de corantes vitais, podem ser citadas: a verificação de reações mediadas por enzimas após incorporação do substrato (corando células “vivas” ou supostamente viáveis) e/ou de inclusão de corantes, o que definirá a integridade da membrana da célula (corando células “mortas”/não-viáveis). Em função das dificuldades analíticas vinculadas principalmente à visualização dos (oo)cistos, cabe investigar diferentes opções de corantes vitais.

O azul tripano apresenta-se como exemplo de corante vital incorporado por células com membrana danificada, as quais podem ser consideradas frágeis ou supostamente inviáveis. Boni (2016) aplicou tal corante para estimar a viabilidade de (oo)cistos de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. presentes em água filtrada obtida após tratamento de ciclo completo por flotação e apontou como vantagem o exame ser de fácil execução e poder ser realizado entre 5 e 10 min. Contudo, este fato implicou também dificuldade analítica, em virtude da rápida perda da coloração nos (oo)cistos, bem como a dificuldade de identificação dos mesmos em microscopia de campo claro, dado que são facilmente confundíveis com sujidades.

Corantes fluorescentes apresentam melhor visualização em microscopia. Como exemplo, há os corantes de etídio e propídio, que apresentam alta afinidade com ácidos nucleicos, mas são impermeáveis à membrana plasmática das células. Sua incorporação ocorre de forma físico-química passiva, indicando que há danificação na membrana celular, corando células que podem estar inviáveis, enfraquecidas ou mortas (NETUSCHIL et al., 2014). O iodeto de propídio (IP) pode ser aplicado junto a anticorpos monoclonais - FITC, trabalhando com o DAPI como teste confirmatório, conforme a recomendação do Método 1623.1 da USEPA (2012). Este corante vem sendo empregado em matrizes como efluentes de reatores anaeróbios (KINYUA et al., 2016), resíduos de pecuária (GRIT et al., 2012) e água de abastecimento (GÓMEZ-COUSO et al., 2009). Sua aplicação pode ser feita na suspensão ou diretamente na lâmina para microscopia (ROBERTSON et al., 2014).

Outra opção para estimativa de viabilidade com corantes é a utilização de substratos de esterase, uma enzima intracelular. Nesse caso, a viabilidade é inferida tanto pela atividade enzimática, a qual é necessária para promover a fluorescência, quanto pela integridade da membrana celular, que é requerida para a retenção dos produtos fluorescentes dentro da

célula. Por se tratarem de moléculas eletricamente neutras, os substratos da esterase entram livremente nas células por difusão. Uma vez dentro da célula, essas moléculas não-fluorescentes são convertidas em produtos fluorescentes que são, então, retidos pelos organismos com membranas plasmáticas intactas. Contrariamente, os substratos que não são hidrolisados e seus produtos rapidamente vazam das células com membranas danificadas, mesmo quando ainda há uma atividade residual das enzimas esterases (NETUSCHIL et al., 2014). Como exemplo, há o diacetato de carboxifluoresceína (DC), o qual gera fluorescência verde em células consideradas viáveis. Este corante tem sido aplicado na verificação de viabilidade de bactérias em biofilmes (NETUSCHIL et al., 2014) e algas (MACINTYRE; CULLEN, 2016), inclusive em sistemas de tratamento de água de lastro com desinfecção por radiação ultravioleta (SUN; BLATCHLEY, 2017), sendo cabível sua investigação como corante vital para análise de viabilidade de (oo)cistos em microscopia de fluorescência.

Com o objetivo de superar as deficiências nas técnicas que utilizam corantes, a combinação de corantes vitais pode ser aplicada, visando associar os métodos de exclusão/inclusão, em que um corante não fluorescente é incorporado e metabolizado para fluorescer em células vivas, e outro é incorporado por células com membranas danificadas (ROUSSEAU et al., 2018). Este efeito é esperado por alguns kits comerciais, que sugerem a visualização simultânea de células consideradas “vivas” e “mortas”. Novamente, trata-se de uma estimativa de viabilidade, contudo a abordagem é simplificada para tal terminologia.

3. OBJETIVOS

Avaliar métodos de recuperação de protozoários em amostras de lodo e água de lavagem de filtros (ALF) resultantes do tratamento de água de manancial superficial por ciclo completo com decantação em escala de bancada.

3.1. Objetivos específicos

- Avaliar a tratabilidade de água de manancial superficial utilizando cloreto de polialumínio (PAC), simulando a tecnologia de ciclo completo com decantação;

- Avaliar o desempenho de corantes vitais de análise simultânea na estimativa de viabilidade de cistos e oocistos de protozoários em comparação à incorporação de iodeto de propídio (IP);

- Comparar a recuperação de cistos e oocistos de protozoários em amostras de lodo por técnicas de concentração por centrifugação direta e floculação seguidas de separação imunomagnética (IMS);

- Comparar a recuperação de cistos e oocistos em amostras de ALF por filtração em membranas com raspagem utilizando Tween® 80 aquecido a 45°C, seguida ou não de IMS;

- Avaliar a influência dos métodos de recuperação de protozoários sobre a estimativa de viabilidade de cistos e oocistos.

- Comparar os custos dos métodos de recuperação de (oo)cistos em lodo e ALF.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As atividades foram desenvolvidas no Laboratório de Tratamento Avançado e Reuso de Águas - LATAR da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo - EESC/USP.

4.1. Coleta e armazenamento da água bruta

A água bruta (AB) utilizada para a geração dos resíduos de tratamento em escala de bancada foi proveniente do Córrego Monjolinho, um manancial superficial localizado no município de São Carlos, SP. Os parâmetros de qualidade foram avaliados tanto para a água, quanto para os resíduos gerados. A água coletada pela adutora que passa no LATAR foi armazenada em reservatório de polipropileno, com capacidade de 500 L, previamente desinfetado por solução de hipoclorito de sódio entre 10 e 12% com tempo de contato de 48 horas. Os ensaios de tratabilidade com a AB armazenada foram precedidos de homogeneização da água por meio de mistura manual, visando conservar as características iniciais e evitar sedimentação de sólidos no reservatório. O período de armazenamento foi de aproximadamente dois meses, incluindo a elaboração dos diagramas de coagulação e geração dos resíduos de tratabilidade.

A caracterização da água do manancial envolveu mensurar parâmetros físico-químicos e biológicos, sendo eles: temperatura, turbidez, pH, alcalinidade total, condutividade elétrica, potencial zeta, carbono orgânico total dissolvido, cor aparente, cor verdadeira, dureza, coliformes totais e *Escherichia coli*. Os procedimentos para a caracterização da água foram realizados de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA; AWWA; WEF, 2012)

4.2. Ensaios de tratabilidade e seleção de parâmetros operacionais para jartest

Os ensaios de tratabilidade foram realizados em escala de bancada, em jarteste, conforme o método indicado por Di Bernardo, Dantas e Voltan (2011) com o objetivo de gerar diagramas de coagulação. Estes gráficos apresentam-se como uma ferramenta para a seleção da dose adequada de coagulante associada a um pH de coagulação, de modo a obter água clarificada com menores valores de cor aparente e turbidez.

O policloreto de alumínio (PAC) foi aplicado como coagulante, com teor de 17,51% de Al_2O_3 de densidade de $1,36 \text{ g mL}^{-1}$, conforme laudo técnico do fabricante (QUIMISA S/A), apresentado no anexo 1. Em ensaios preliminares, foram avaliadas as dosagens de 10, 15, 20, 25 e 30 mg L^{-1} , posteriormente reduzidas para o intervalo entre 5 e 15 mg L^{-1} de coagulante. Quanto às condições de pH, considerou-se o pH natural da água (neutro), bem como variações entre 6 e 10, por meio da utilização de ácido sulfúrico (volumes de aproximadamente 2 mL de H_2SO_4 a 0,25 N) como acidulante e hidróxido de sódio (volumes entre 0,2 e 5,5 mL de NaOH a 0,1 N) como alcalinizante em cada jarro.

Os gradientes e tempos de mistura rápida e lenta foram inicialmente adotados com base em Andreoli e Sabogal-Paz (2017) e Maciel e Sabogal-Paz (2017) respectivamente, os quais aplicaram PAC como coagulante em matrizes similares. Desta forma, a elaboração do diagrama de coagulação considerou o gradiente de velocidade médio na mistura rápida (G_{mr}) de 1000 s^{-1} (500 rpm) por 10 s e gradiente de floculação, i. e., de mistura lenta (G_f) de 30 s^{-1} (35 rpm) por 20 min.

Os parâmetros operacionais foram reavaliados em seguida, com ensaios em triplicata para cada condição, conforme descrito na Tabela 1, aplicando-se o pH de coagulação e a dosagem de coagulante definidos nos ensaios preliminares. Os parâmetros “otimizados”, isto é, os mais adequados para as condições de trabalho, foram posteriormente aplicados em novo ensaio de jarreste com filtros de laboratório (FLA) acoplados, conforme o item 4.3.

Tabela 1 - Parâmetros avaliados nos ensaios de tratabilidade para seleção das melhores condições de mistura

Parâmetros	Valor	Unidade
Dosagem de coagulante	Selecionado no diagrama preliminar	mg L^{-1} ou $\text{mg Al}^{3+} \text{ L}^{-1}$
pH de coagulação	Selecionado no diagrama preliminar	-
Gradiente de velocidade médio na mistura rápida – G_{mr}	700; 800; 900; 1000	s^{-1}
Tempo de mistura rápida – T_{mr}	10; 20; 25; 30	s
Gradiente de velocidade médio na mistura lenta – G_f	10; 20; 30; 40; 50; 30/20 (escalonado)	s^{-1}
Tempo de mistura lenta – T_f	10; 15; 20; 25; 30	min
Velocidade de sedimentação – V_s	2,0; 1,5; 1,0	cm min^{-1}

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3. Ensaios de tratabilidade com filtros de laboratório acoplados

Os filtros de laboratório (FLA) acoplados ao equipamento jarreste constituíram-se de tubos acrílicos graduados com 19 mm de diâmetro interno, 40 cm de altura e uma malha metálica como suporte ao meio filtrante. Os FLA foram preenchidos com areia peneirada para

a granulometria entre 0,30 a 0,59 mm e tamanho efetivo dos grãos de 0,42 mm. Esta configuração refere-se ao recomendado por Di Bernardo, Dantas e Voltan (2011) para o FLA1 (filtro de laboratório do tipo 1).

A montagem dos filtros envolveu a utilização de água deionizada para facilitar a transferência da areia (previamente seca em estufa a 100 °C por 24 horas) para o interior do FLA até a marcação de 15 cm. O procedimento foi realizado cuidadosamente, para evitar que ocorresse a formação de bolsões de ar nos filtros. Além disso, certificou-se que os FLA em repouso estivessem preenchidos com água deionizada até a altura da saída do filtro, acima do topo da areia, para evitar que secassem.

As primeiras filtrações foram realizadas com o fim de confirmar a remoção de turbidez e cor aparente pelo filtro e o atendimento ao padrão de potabilidade da água filtrada, de acordo com a PRC nº 5 de 2017 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017). Também foi avaliado o potencial zeta (PZ) da água filtrada, em comparação ao da água bruta e da coagulada. Em seguida, conduziram-se repetidos ensaios de tratabilidade com FLA, visando exclusivamente a gerar os resíduos para tratamento, conforme descrito em maiores detalhes no item 4.4.

Quanto aos procedimentos em laboratório, vale citar que após a etapa de decantação, vinculado à velocidade de sedimentação escolhida, havia um tempo de coleta, de modo que a água clarificada nesse tempo foi rapidamente retirada de cada jarro pelos coletores simultâneos e por sifonamento, até a marcação de 1 L de cada cuba. Esta água clarificada por decantação foi utilizada em seguida para a filtração, após o lodo ser removido (item 4.4) e os jarros serem novamente preenchidos exclusivamente com água clarificada destinada à filtração. Este procedimento foi realizado com o intuito de evitar comprometer (melhorar) a qualidade da água por sedimentação dos flocos nos jarros durante o processo de filtração, mantendo uniformes os parâmetros com os quais os filtros tinham contato.

A operação dos FLA foi realizada com taxa de filtração aproximada de $100 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (GIGLIO; SABOGAL-PAZ, 2017). Isto quer dizer que, no período de 60 s, deveriam ser produzidos aproximadamente 20 mL de água filtrada, verificados regularmente por meio do preenchimento de proveta graduada em tempo cronometrado. Os FLA funcionavam, portanto, com taxa constante e nível variável, na medida em que a taxa de filtração era mantida pelo ajuste dos registros de saída dos jarros e de saída dos filtros, mas a colmatação influenciava sutilmente no nível dos FLA.

A lavagem dos filtros era realizada após a filtração de aproximadamente 350 mL de água clarificada. Isso corresponde a 2,5 min de estabilização do FLA e 15 minutos de filtração

sob a taxa máxima de $100 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. O procedimento de lavagem é descrito em detalhes no item 4.4.

4.4. Geração de resíduos de tratamento em escala de bancada

As matrizes de interesse (lodo e água de lavagem dos filtros - ALF) foram constituídas de amostras compostas, geradas a partir de diversos ensaios de tratabilidade nas condições previamente definidas (itens 4.2 e 4.3), os quais simulavam o tratamento de água por ciclo completo.

A caracterização dos resíduos envolveu parâmetros físico-químicos e biológicos, sendo eles: demanda química de oxigênio (DQO), carbono orgânico total (COT) dissolvido (exceto para o lodo), sólidos suspensos e sedimentáveis, temperatura, pH, condutividade elétrica, alumínio, ferro, coliformes totais e *Escherichia coli*, determinados de acordo com APHA et al., (2012).

O procedimento para geração de cada uma das matrizes é descrito a seguir:

4.4.1. Lodo

O lodo bruto refere-se ao material sedimentado nos jarros do equipamento jarteste após a decantação, constituído de um volume aproximado de 100 mL. Finalizada a etapa de decantação, a água clarificada era direcionada para a filtração e o sobrenadante que permanecia no jarro era cuidadosamente removido por sifonamento, com o auxílio de mangueiras de silicone e seringa para gerar um gradiente de pressão. Deste modo, no jarro remanesce apenas um volume de aproximadamente 100 mL.

O material referente ao lodo bruto era homogeneizado com bastão de vidro dentro da própria cuba do jarteste, cujo conteúdo era então vertido para um balde plástico graduado. De modo a simular tratamento por adensamento por gravidade, este lodo era deixado em repouso, gerando o lodo adensado. Para tal, utilizava-se um jarro de jarteste, preenchido com lodo bruto (utilizando proveta graduada para 2 L), aguardava-se um tempo de sedimentação e em seguida o sobrenadante era removido pela mangueira plástica posicionada na marcação de 1 L do recipiente, de forma a concentrar os sólidos da amostra e diminuir o volume da matriz.

O tempo de sedimentação para o adensamento foi definido por meio da análise da interface sólido-líquido do lodo em relação ao tempo, isto é, da curva de cinética de espessamento do lodo por gravidade. A curva foi construída conforme o método de Di

Bernardo, Dantas e Voltan (2011), utilizando-se uma coluna de sedimentação (proveta) e um cronômetro.

O lodo adensado, obtido por amostras compostas, foi caracterizado e armazenado em bombonas opacas de 10 L previamente desinfetadas com hipoclorito de sódio 10-20% por 48 horas. Estes recipientes, umedecidos com Tween® 80 a 0,1%, foram acondicionados em câmara fria, para que a matriz fosse posteriormente usada para inóculo de protozoários a serem recuperados por diferentes métodos (item 4.8).

4.4.2. Água de lavagem dos filtros (ALF)

A ALF foi obtida depois de concluídos os ensaios de tratabilidade com filtração, quando foi realizada a retrolavagem dos filtros de laboratório (FLA). O procedimento consistiu na inserção de água deionizada em sentido ascensional por meio da utilização de uma seringa graduada de 50 mL. Em seguida, todo o conteúdo do filtro (areia e água intersticial) foi vertido em um béquer e acrescentou-se 100 mL de água deionizada para lavar o remanescente no FLA e reunir o conteúdo no béquer. O sobrenadante do béquer (aproximadamente 150 mL) foi considerado ALF. A areia correspondente a cada filtro era então transferida para uma cápsula de evaporação e seca em estufa a 100 °C por 24 horas para ser reutilizada nos FLA, conforme procedimento descrito no item 4.3.

As amostras de ALF foram caracterizadas e armazenadas em câmara fria (em bombonas plásticas de 20 L, previamente desinfetadas com hipoclorito de sódio 10-20% por 48 horas) e lavadas com Tween® 80 a 0,1% para posterior inóculo de protozoários e ensaios de desinfecção.

4.5. Preparo de lâminas de microscopia

A visualização de protozoários e sua contagem foi realizada mediante a montagem de lâminas de microscopia, independentemente do tipo de inóculo ou método de recuperação. Com isso, seguiu-se um protocolo de preparo de lâminas indicado pelo fabricante do kit Merifluor®, acrescentando Fluoroshield™ com DAPI para testes confirmatórios e algum corante vital, fosse iodeto de propídio (IP) ou corante de ação simultânea (*Live/Dead Cell Assay* – Abcam®). Ao longo do presente texto, apontou-se a existência de qualquer alteração no protocolo de montagem das lâminas, recomendado por Boni (2016) e Freitas (2017), e empregado por Giglio e Sabogal-Paz (2018).

Antecedendo o preparo das lâminas, os reagentes do kit Merifluor® e os corantes foram deixados em repouso para que atingissem a temperatura ambiente. Simulou-se uma câmara escura e úmida por meio da utilização de placas de Petri envoltas em papel alumínio (tanto a tampa quanto a parte inferior). No interior das placas, inseriu-se um pedaço de papel absorvente dobrado e umedecido com água deionizada. As lâminas foram colocadas dentro das placas de Petri, devidamente identificadas. Cabe destacar que cada lâmina de imunofluorescência apresenta três poços, e apenas os das extremidades foram utilizados, de modo a evitar contaminações entre as amostras.

Após secagem da amostra sobre os poços de microscopia (período mínimo de quatro horas), foram usados 10 µL metanol anidro 99,8% para fixação na lâmina, mediante aguardar 10 min. Em ausência de luz direta, uma gota do reagente de detecção do kit Merifluor® foi colocada no centro de cada poço contendo a amostra. Em seguida, adicionou-se uma gota do contra corante do mesmo kit. Cada placa de Petri foi tampada e incubada por 30 min a 37 °C.

Decorrido o repouso e ainda em ausência de luz direta, as lâminas foram removidas das respectivas placas de Petri. Em seguida, nos poços contendo as amostras, foram realizadas três lavagens com 50 µL de solução tampão diluída, i. e. solução tampão do kit Merifluor® diluída na proporção 20:1, utilizando água ultrapura. As lavagens foram realizadas posicionando as lâminas sobre papel absorvente em um ângulo de aproximadamente 30° com a bancada. Posteriormente, as lâminas foram recolocadas nas respectivas placas de Petri.

Duas gotas do corante Fluoroshield™ com DAPI foram inseridas em cada poço de microscopia contendo amostra e manteve-se um tempo de contato de 10 min com as placas de Petri fechadas. Em seguida, as lâminas foram novamente removidas das placas e, ainda em ausência de luz, realizou-se lavagem dos poços com solução salina balanceada de Hanks (HBSS), utilizando três repetições de 50 µL. Depois da lavagem, inseriu-se o corante vital selecionado para a verificação de viabilidade (volume igual ao da amostra no poço) e aguardou-se o período de contato respectivo ao reagente, após o qual mais três lavagens com 50 µL de HBSS foram feitas, seguidas de 50 µL de água ultrapura, evitando formação de cristais.

A finalização da montagem das lâminas foi feita mediante a inserção de uma gota do meio de montagem do kit Merifluor® no centro de cada poço de microscopia, que foi coberto com lamínula, selada com Coverslip®. Por fim, as lâminas prontas foram transferidas para as respectivas placas de Petri, que serão tampadas e mantidas em refrigeração, entre 2 e 8°C, até serem encaminhadas para a leitura em microscópio.

O equipamento utilizado para microscopia foi o Olympus® BX51, sob aumento de 200x a 800x, com o qual se realizou a identificação por reação de imunofluorescência direta (RID). A contagem de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e a de cistos de *Giardia* spp., foram realizadas simultaneamente. No mesmo procedimento, foram avaliados os organismos que incorporaram, excluíram ou metabolizaram o corante vital de interesse, de modo a estimar a viabilidade. Desta forma, além da análise com filtro FITC (isotiocianato de fluoresceína), os (oo)cistos foram contados mediante DAPI (4',6-diamino-2fenil-indol) para confirmação de aspectos morfológicos, DIC (contraste interferencial diferencial) e WG.

4.6. Ensaios de viabilidade utilizando as suspensões

Os testes de viabilidade tiveram por objetivo definir uma maneira de estimar a concentração de (oo)cistos viáveis em amostras, de modo a permitir inferências mais claras quanto ao efeito dos métodos de recuperação aplicados em matrizes ambientais sobre os organismos. O corante vital iodeto de propídio (IP) foi testado em comparação ao kit comercial ab115347 *Live/Dead Cell Assay* (Abcam®), utilizando suspensões purificadas de (oo)cistos de *Giardia muris* e *Cryptosporidium parvum* adquiridas da Waterborne (Nova Orleans – LA, EUA). As suspensões recém-adquiridas foram analisadas com o kit Merifluor®, para que seu aspecto fosse verificado antes dos testes de viabilidade propriamente ditos, de modo a estabelecer um “branco”.

Alíquotas de 5 µL de cada suspensão de cistos e de oocistos foram colocadas em um único poço da lâmina de microscopia de imunofluorescência e os organismos viáveis e não viáveis foram analisados qualitativamente e quantificados mediante a incorporação dos corantes vitais. A escolha do melhor corante foi motivada por questões tais quais a facilidade de execução do procedimento e clareza na visualização dos (oo)cistos, de modo que o melhor método foi adotado para as próximas etapas da pesquisa.

A visualização de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. seguiu as recomendações estabelecidas pelo Método 1623.1 da USEPA (2012), havendo identificação em microscopia de fluorescência. O preparo das lâminas foi realizado conforme o protocolo do kit Merifluor®. O controle positivo do kit Merifluor® em uso também foi avaliado, de modo a certificar o desempenho apropriado dos reagentes.

4.6.1. Kit ab115347 *Live/Dead Cell Assay* (Abcam®)

Em virtude da ausência de relatos da utilização do *Live/Dead Cell Assay* para visualização de (oo)cistos, especificamente, foram adotadas as recomendações do fabricante, associadas ao Método 1623.1 da USEPA (2012) para detecção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. Três diferentes procedimentos foram testados com o reagente do *Live/Dead Cell Assay*, visando excluir possíveis interferências na sua ação.

O preparo do reagente para os ensaios de viabilidade com microscopia exigiu que o corante fosse diluído em PBS (solução salina tamponada, pH 7,4) para que fosse adicionado à amostra, gerando uma concentração de 5:1 em volume. As soluções foram preparadas em frasco de micro centrifugação (Eppendorf®) de 0,2mL de volume, protegidos da luminosidade por papel alumínio. Novas soluções foram preparadas antes de cada teste, para uso imediato.

4.6.1.1. Procedimento A: *Live/Dead Cell Assay* com Merifluor® e Fluoroshield™ com DAPI

Inicialmente, foi testado o corante associado ao kit Merifluor® e Fluoroshield™ com DAPI. Nesta avaliação, houve inóculo de 5µL de cistos da suspensão de *Giardia muris* e 5 µL de *Cryptosporidium parvum* no mesmo poço de microscopia, o que foi realizado em triplicata para a contagem de (oo)cistos. O tempo de contato do corante foi de 10 min.

4.6.1.2. Procedimento B: *Live/Dead Cell Assay* associado ao Fluoroshield™ com DAPI

O segundo método, considerou a utilização do *Live/Dead Cell Assay* associado ao Fluoroshield™ com DAPI, mantendo o mesmo tempo de contato. A não-utilização do kit Merifluor® teve o objetivo de avaliar se a fluorescência verde dos reagentes interferia na visualização dos (oo)cistos sob o filtro FITC. Visando definir a fonte dos interferentes, os cistos e oocistos foram inoculados em poços diferentes da lâmina de microscopia, isto é, 5 µL da suspensão de *Giardia muris* em um dos poços e 5 µL de *Cryptosporidium parvum* em outro.

4.6.1.3. Procedimento C: Live/Dead Cell Assay aplicado diretamente nos (oo)cistos

Um terceiro método foi investigado, avaliando o reagente do *Live/Dead Cell Assay* diretamente nos (oo)cistos inoculados nos poços de microscopia, sem que a amostra fosse fixada com metanol, tampouco que houvesse adição de quaisquer outros corantes ou meios de montagem. Esta abordagem mais simplificada seguiu o indicado pelo fabricante, no que se refere à direta adição do reagente às células, em contato com a lâmina por 10 minutos, sem nenhuma lavagem específica ou fixação.

4.6.2. Iodeto de propídio (IP)

A estimativa de viabilidade por incorporação de iodeto de propídio (IP) (P4170 Sigma-Aldrich®) foi realizada utilizando inóculo das suspensões comerciais, tratadas segundo o protocolo de do kit Merifluor® para reação de imunofluorescência direta (RID), acrescido de uma etapa de adição de IP correspondente ao volume inoculado em cada poço de microscopia. Seguiu-se o procedimento apresentado no item 4.5, com 5 min de tempo de contato do corante.

Desta forma, foram utilizadas alíquotas de 5µL de suspensões contendo cistos de *Giardia muris* e oocistos *Cryptosporidium parvum*. Os resultados foram contabilizados mediante contagem de (oo)cistos identificados em FITC e o percentual de corados em vermelho sob o filtro WG, indicando a incorporação de iodeto de propídio por organismos com membrana danificada. (Oo)cistos positivos para IP, isto é, corados, foram classificados como não-viáveis.

4.7. Métodos aplicados para a recuperação de protozoários no lodo

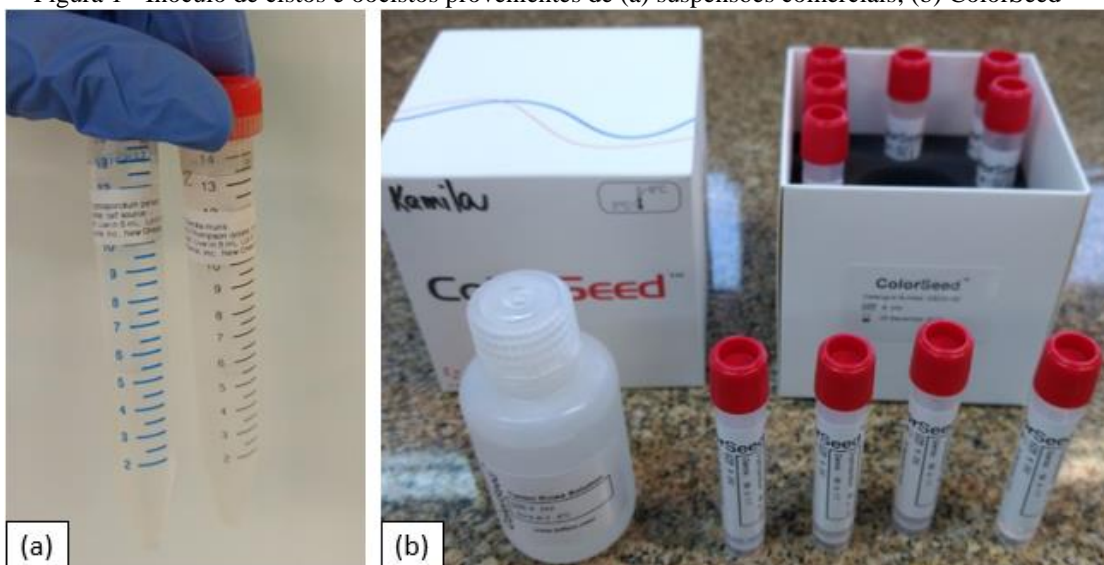
Os testes iniciais foram realizados visando recuperar cistos e oocistos provenientes de suspensões comerciais de *Giardia muris* e *Cryptosporidium parvum* suspensos em PBS (Figura 1 a, anexos 2 e 3), os quais foram inoculados na matriz para diferentes métodos. Considerando as características do lodo, optou-se por avaliar o desempenho de concentração por: centrifugação direta com solução de dispersão detergente; floculação com carbonato de cálcio, e; floculações ácidas com sulfato férrico e sulfato de alumínio. Todos os procedimentos aplicados incluíram purificação por separação imunomagnética (IMS), com exceção de uma das floculações, como teste exploratório para verificação da necessidade de inclusão desta etapa.

As recuperações obtidas foram agrupadas e analisadas entre si para verificar a normalidade dos dados por meio de teste Shapiro-Wilk no software PAST. Em seguida, utilizando o pacote de análise de dados do Microsoft Office® Excel, comparou-se a diferença entre as médias por meio de teste *t* de Student, baseado na hipótese nula de igual média de recuperação para os métodos. Considerando os resultados e sua significância estatística ($P < 0,05$), foi selecionado um dos métodos para que houvesse inóculo de (oo)cistos provenientes de ColorSeed™, seguindo os requisitos da USEPA (2012) para validação de qualidade analítica do método de recuperação. As suspensões de ColorSeed™ (Figura 1 b) apresentam valor médio de 100 cistos de *Giardia* spp. e 100 oocistos de *Cryptosporidium* spp., conforme atestado pelo fabricante (anexo 4).

Cada teste realizado com as suspensões envolveu contagem de (oo)cistos realizada paralelamente, de modo a estimar o número de organismos presentes no volume inoculado. Para tal, o mesmo volume inoculado nas amostras de lodo foi disposto diretamente em poço da lâmina de microscopia, em triplicata.

No caso do inóculo realizado com ColorSeed™, seguiu-se o procedimento do fabricante, no qual o material é diretamente despejado na matriz de interesse, mediante a utilização de 2 mL de solução de lavagem de Tween® 20 a 0,5% presente no kit. Em seguida, três lavagens do recipiente com 1 mL de água ultrapura. A montagem de lâminas com amostras contendo ColorSeed™ não envolveu a etapa de adição de iodeto de propídio (IP).

Figura 1 - Inóculo de cistos e oocistos provenientes de (a) suspensões comerciais; (b) ColorSeed™



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7.1. Centrifugação direta com inserção de solução de dispersão (CD + ICN 7X), seguida de separação imunomagnética (IMS)

O Método 1693 (USEPA, 2014) indica que algumas amostras não devem ser filtradas devido a alta turbidez ou presença excessiva de material particulado. Com isso, a centrifugação direta (CD) apresenta-se como uma alternativa (OGURA, 2018; SILVA, 2018).

O procedimento adotado contemplou o volume total de lodo em que houve o inóculo de protozoários, isto é, 100 mL, com quatro repetições e uma amostra sem (oo)cistos (branco). Realizou-se homogeneização dos organismos na matriz pelo período de 30 minutos, após o qual, transferiu-se o conteúdo referente a cada amostra para dois tubos de centrífuga (Falcon® de 50 mL de capacidade), devidamente identificados. De modo a evitar perda de amostra, realizou-se uma lavagem dos béqueres que continham o lodo com inóculo, utilizando Tween® 80 a 0,1%, cujo volume também foi transferido para os tubos Falcon®.

As amostras foram então submetidas a centrifugação a 1500 G por 20 min (Eppendorf® Centrifuge 5810). Decorrido isto, removeu-se o sobrenadante de cada tubo até a marcação de 5 mL, levando-os em seguida ao misturador vórtex para homogeneização do sedimento. Os volumes residuais de 5 mL dos dois tubos Falcon® foram combinados em um único tubo, resultando em um volume de 10 mL para cada repetição. O tubo vazio foi então enxaguado duas vezes com 2,5 mL de solução de dispersão detergente ICN 7X (MP BIO®) e este conteúdo foi adicionado ao tubo ocupado, totalizando 15 mL para cada amostra (n=4 + branco), submetidos à segunda centrifugação (1500 G, 20 min).

Findas as centrifugações, removeu-se o sobrenadante de cada um dos cinco tubos até a marcação de 5 mL, realizando-se novamente a desagregação do sedimento por agitação em vórtex. O concentrado foi encaminhado à etapa de purificação por separação imunomagnética (IMS), que foi conduzida de acordo com o procedimento descrito pelo fabricante (kit Dynabeads™).

Válido ressaltar que a realização da IMS requer a transferência da amostra concentrada para um tubo de lado plano (Dyna™ TLP). Neste momento, adaptou-se o protocolo de lavagem dos tubos de centrífuga, de modo que, em vez de utilizar água ultrapura, 1 mL do detergente ICN 7X foi utilizado em três enxagues.

4.7.2. CD + ICN7X + IMS com etapa de remoção de partículas magnéticas

As amostras de lodo contendo inóculo foram concentradas conforme apresentado no item 4.7.1, resultando em um volume de 5 mL a ser destinado para a purificação por separação imunomagnética (IMS). Em virtude de resultados obtidos ao longo da

experimentação, considerou-se uma etapa adicional que antecedeu a adição dos reagentes do kit Dynabeads™ para IMS.

Cada amostra de lodo concentrado foi homogeneizada, de modo a ressuspender o sedimento obtido após a CD e transferida para tubo de lado plano (Dynal™ TLP). Cada TLP foi então acoplado a um concentrador magnético (Dynal MPC™-1), para que fossem realizados movimentos manuais, visando aderir eventuais partículas magnéticas (e.g. precipitados de sais metálicos) ao ímã do concentrador, removendo-as da amostra de lodo. O volume de todas as amostras foi preservado, sendo retransferido para o respectivo TLP após a lavagem do lado plano com água deionizada.

Em seguida, realizou-se a purificação por IMS, onde foi aplicada a solução de dispersão detergente ICN 7X (MP BIO®) a 1% para a lavagem dos tubos de centrífuga. Esta etapa do método foi realizada também conforme o item 4.7.1.

4.7.3. Floculação com carbonato de cálcio (FCCa)

O procedimento iniciou-se com a homogeneização do inóculo de (oo)cistos na matriz por 30 min, com auxílio de agitador magnético. As amostras constituíram-se de 100 mL de lodo adensado (n=4 e branco, i. e., ausência de inóculo). Todo o material utilizado foi inicialmente lavado com solução eluidora Tween® 80 a 0,1%. Conforme pode ser verificado na Figura 2, placas de Petri foram utilizadas para cobrir os béqueres que continham as amostras com inóculo, visando evitar contaminações provenientes de gotículas liberadas pela agitação. Além disso, a amostra contendo o branco foi mantida afastada das demais.

Figura 2- Amostras de lodo com inóculo de protozoário para concentração por FCCa: (a) sob agitação; (b) após precipitação química



Fonte: Elaborado pelo autor.

A concentração foi realizada por floculação em carbonato de cálcio (VESEY et al., 1993), envolvendo a adição de 1 mL de cloreto de cálcio (CaCl_2) a 1M, seguida de 1 mL de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 1M, mantendo-se a agitação por 10 min, i. e. volumes proporcionais à amostra. Posteriormente, foi adicionado o volume de hidróxido de sódio (NaOH) necessário para elevar pH das amostras para 10 (10 μL), facilitando a precipitação, o que foi verificado preliminarmente, antes do inóculo de protozoários.

As amostras foram mantidas em repouso por um período de 4 horas (Figura 2 b) e então o sobrenadante foi removido com auxílio de pipeta de 10 mL até a indicação de 30 mL (previamente marcada na vidraria), evitando perturbar o sedimento. Os residuais das amostras foram então homogeneizados com auxílio do agitador magnético por 10 min.

Em seguida, adicionaram-se 2 mL de ácido sulfâmico (H_3NSO_3) a 10% mantidos sob agitação por 5 min. Com o auxílio de uma pipeta de 10 mL, cada amostra foi transferida para um tubo de centrifuga de 50 mL (Falcon®). O béquer utilizado foi lavado com solução Tween® 80 a 0,1%, cujo volume utilizado também foi reunido no tubo de centrifuga referente à respectiva amostra. Os tubos foram completados com água ultrapura.

O volume reunido foi então submetido à centrifugação a 1500 G por 20 minutos (Eppendorf® Centrifuge 5810). O sobrenadante da centrifugação foi removido até a marcação de 10 mL e ressuspendeu-se o sedimento com auxílio de vórtex e pipeta Pasteur, com seguidas sucções e dispensas, para então adicionar-se água ultrapura até a marcação de 50 mL. Centrifugou-se a amostra mais uma vez e houve novo descarte do sobrenadante, até a marcação de 5 mL e o sobrenadante foi novamente ressuspendido. Completou-se o volume do tubo com solução fosfato salina (PBS) de pH 7,4, visando retornar o pH à neutralidade e foi realizada uma terceira centrifugação.

O sobrenadante da terceira centrifugação foi descartado até a marcação aproximada de 1 mL no tubo Falcon® e o sedimento foi ressuspendido e homogeneizado. Com isso, obteve-se a amostra concentrada, da qual foram retiradas as alíquotas para microscopia.

A recuperação dos (oo)cistos foi calculada por meio da Equação 1, considerando que o sedimento não foi completamente analisado, isto é, apenas uma alíquota deste. Com isso, foi aplicado um fator de correção (ANDREOLI; SABOGAL-PAZ, 2017; GIGLIO; SABOGAL-PAZ, 2018), comparando o volume concentrado com o volume encaminhado para RID.

$$R = \left(\frac{\sum_{i=1}^{i=n} P \times F}{NP} \right) \times 100\% \quad (\text{Equação 1})$$

Em que:

P = número de (oo)cistos identificados em cada poço de microscopia contendo alíquotas do sedimento;

NP = número médio de protozoários inoculados na matriz;

F = fator de correção igual a 10, calculado pela razão entre o volume da amostra concentrada (1 mL) e a alíquota em estudo (0,1 mL).

4.7.4. Flocculação com carbonato de cálcio (FCCa) seguida de separação imunomagnética (IMS)

Após o inóculo de protozoários nas amostras em quatro repetições (n=4 e branco), foi realizada a concentração por meio de FCCa (item 4.7.3). Posteriormente, foi realizada a purificação por separação imunomagnética. O protocolo de IMS foi seguido conforme recomendações do fabricante (kit Dynabeads™). Tal como descrito em 4.7.2, este procedimento considerou remoção de partículas magnéticas e precipitados metálicos por meio da colocação das amostras de lodo no MPC™-1, previamente à purificação.

4.7.5. Flocculação com sulfato férrico (Fe₂(SO₄)₃) seguida de separação imunomagnética (IMS)

A homogeneização do inóculo de (oo)cistos na matriz foi realizada por 30 min, com auxílio de agitador magnético. O volume de lodo adensado utilizado foi de 100 mL para cada repetição (n=4 e branco, i. e., ausência de inóculo). Todo o material utilizado foi inicialmente lavado com Tween® 80 a 0,1% e os béqueres foram cobertos com tampas de placas de Petri visando evitar respingos e contaminações cruzadas.

O procedimento de concentração com sulfato férrico foi adaptado de Karanis e Kimura (2002) e Kourenti et al. (2003). Desta forma, adicionou-se primeiramente 0,5 mL de Fe₂(SO₄)₃, gerando uma concentração final de Fe³⁺ de 5 mgL⁻¹ nas amostras sob agitação. Em seguida, acrescentou-se o volume de ácido clorídrico necessário para diminuir o pH das amostras para 6,0 (0,2 mL de HCl a 0,1N), verificado antes do inóculo de protozoários.

As amostras foram mantidas em repouso por um período de 4 horas e então o sobrenadante foi removido com auxílio de pipeta de até a indicação aproximada de 25 mL

(previamente marcada na vidraria), evitando perturbar o sedimento. Os precipitados de interesse, remanescente das amostras, foram então homogeneizados com auxílio do agitador magnético por 10 min e transferidos para tubo de centrifuga de 50 mL (Falcon®), previamente lavado com Tween® 80 a 0,1%. Cada béquer usado para as amostras de lodo foi lavado com solução Tween® 80 a 0,1%, cujo volume utilizado também foi reunido no tubo de centrifuga respectivo à amostra. Os tubos foram completados com água ultrapura para balanceamento prévio à centrifugação.

O volume reunido, referente a cada amostra, foi então submetido à centrifugação a 2000 G por 10 minutos, com resfriamento a 4°C (centrifuga refrigerada modelo Megafuge 8R Thermo Scientific™). O sobrenadante da centrifugação foi removido até a marcação de 1 mL e ressuspendeu-se o sedimento com auxílio de agitador vórtex e pipeta Pasteur, com seguidas sucções e dispensas, para então adicionar-se 1 mL de tampão de lise, com o qual o sedimento de cada amostra permaneceu em contato por 60 minutos, sendo agitado em vórtex em intervalos de 15 minutos.

O referido tampão de lise constituiu-se de uma solução ácida (tamponada para pH 4,7), a base de ácido cítrico monohidratado e citrato de sódio. O preparo desta solução foi realizado anteriormente aos ensaios com protozoários, demandando a diluição de 8,4 g de ácido cítrico monohidratado e 17,64 g de citrato de sódio para 100 mL de água ultrapura.

Três lavagens com água ultrapura foram realizadas, de modo a retirar possíveis gotículas de amostra na parede do tubo Falcon® e aumentar o volume para aproximadamente 5 mL. Centrifugou-se a amostra novamente (2000 G, 10 min, 4 °C) e descartou-se o sobrenadante até a marcação de 1 mL. Em seguida, adicionou-se solução fosfato salina (PBS – pH 7,4) até a marcação de 5 mL do tubo de centrifuga e homogeneizou-se o conteúdo em vórtex. O pH de cada uma das amostras foi aferido para verificar se foi alcançada a neutralidade. Caso negativo, acrescentou-se volume maior de PBS e submeteu-se a amostra à nova centrifugação. Caso o pH estivesse neutro, preservou-se o volume de 5 mL, a ser encaminhado à etapa de purificação por separação imunomagnética (IMS).

O protocolo de IMS foi seguido conforme recomendações do fabricante (kit Dynabeads™). Tal como descrito no item 4.7.2, este procedimento considerou remoção prévia de partículas magnéticas e precipitados metálicos por meio da colocação das amostras de lodo no MPC™-1, antes da adição dos reagentes do kit.

4.7.6. Floculação com sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) seguida de separação imunomagnética (IMS)

O procedimento de floculação com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, adaptado de Kimura (2002) e Kourenti et al. (2003) assemelha-se ao apresentado no item 4.7.5, diferindo apenas na concentração de sal empregado e no pH de floculação. Utilizou-se, para a amostra de lodo adensado de 100 mL inoculada com protozoários, 0,12 mL de sulfato de alumínio (concentração final de Al^{3+} na amostra de 16 mg L^{-1}), cujo pH foi ajustado para 5,4 mediante adição de 0,25 mL de ácido clorídrico (HCl a 0,1N), testado antes do inóculo dos protozoários. As etapas de repouso, descarte do sobrenadante, centrifugação, lise, ajuste de pH e separação imunomagnética podem ser verificadas no item 4.7.5.

4.7.7. Investigação do efeito do tampão de lise sobre cistos

Um teste exploratório foi realizado após os ensaios de recuperação com sulfato férrico e sulfato de alumínio seguidos de purificação, com o objetivo de verificar efeitos diretos do meio ácido sobre cistos de *Giardia muris*. A pertinência desta análise complementar relacionou-se à particularidade de a solução ser fortemente ácida (pH 4,7), podendo apresentar implicações sobre a integridade dos cistos, tendo favorecido ou não sua recuperação e interferido em sua viabilidade.

Com o objetivo de corroborar esta inferência, uma alíquota de 5 μL de suspensão comercial de *Giardia muris*, a mesma utilizada nos testes de recuperação com inóculo de suspensão, foi inserida em um volume de 5 mL de água ultrapura, dentro de um tubo de centrifuga (Falcon®) previamente ambientado com Tween® 80 a 0,1%. Este conteúdo foi submetido à centrifugação a 2000 G por 10 min (4°C) e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado até a marcação de 1 mL, repetindo o método aplicado à matriz em ensaios com floculações ácidas. Em seguida, acrescentou-se 1 mL da solução de lise (tampão, pH 4,7), a qual ficou em contato com a amostra por 1 h, com agitações em vórtex a cada 15 min, seguindo o protocolo original. Após lavagem com água ultrapura e nova centrifugação, foram retiradas duas alíquotas de 50 μL , respectivamente, do concentrado de 1 mL no tubo Falcon®. Tais alíquotas foram encaminhadas à reação de imunofluorescência direta (RID) para visualização do aspecto dos cistos de *G. muris*.

4.8. Métodos aplicados para a recuperação de protozoários na ALF

Em função das características da água de lavagem de filtros (ALF), foram testados métodos de recuperação com base na concentração por filtração por membrana, conveniente em matrizes com baixa turbidez e concentração de sólidos (MEDEIROS; DANIEL, 2015). Este método foi adotado com a adaptação de Franco et al. (2016), utilizando solução eluidora Tween® 80 (0,1%) aquecido, seguido ou não de purificação por separação imunomagnética (IMS).

Inicialmente, foram recuperados protozoários provenientes de inóculo de volumes de suspensão comercial de *Giardia muris* e *Cryptosporidium parvum*, definidos com base em estimativa da densidade de (oo)cistos. A enumeração foi indicada com base na contagem realizada em triplicata, de alíquotas retiradas da suspensão paralelamente ao inóculo, isto é, derivadas da mesma homogeneização do momento do ensaio. Os resultados obtidos foram testados por Shapiro-Wilk no software PAST, para identificar se estavam adequados à distribuição normal. Em seguida, os dados foram analisados estatisticamente pelo teste *t* de Student, utilizando o pacote de análise de dados do Microsoft Office® Excel.

Considerando a significância da comparação de médias pelo teste *t*, com 95% de confiabilidade, selecionou-se um dos procedimentos para aplicação na ALF inoculada com ColorSeed™, seguindo os requisitos da USEPA (2012) para validação de qualidade analítica do método de recuperação. A montagem de lâminas com amostras contendo ColorSeed™ não envolveu a etapa de adição de iodeto de propídio (IP).

4.8.1. Método de filtração em membrana (FM), utilizando suspensões de (oo)cistos

A concentração das amostras de água de lavagem de filtros (ALF) por filtração em membranas, foi realizada sempre no intervalo de um dia de trabalho, conforme recomendações do Método 1623.1 (USEPA, 2012). Adotou-se o procedimento descrito por Franco et al. (2016).

O protocolo baseou-se na filtração de amostras de 1 L de ALF (amostra composta de várias lavagens de filtros de laboratório), onde foram inoculados (oo)cistos. As amostras consistiram em quatro repetições, bem como o “branco”, isto é, 1 L de ALF sem adição de protozoários, conforme pode ser visualizado na Figura 3, que exhibe as amostras sob agitação para dispersão dos (oo)cistos na matriz (aproximadamente 30 minutos).

Figura 3 - Amostras de água de lavagem de filtros com inóculo de protozoários sob agitação



Fonte: Elaborado pelo autor.

A filtração foi realizada com membranas de ésteres mistos de celulose, com diâmetro de 47 mm e porosidade nominal de 3 μm (Millipore®). Utilizou-se bomba a vácuo (Marconi®) com fluxo de 4 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e pressão em torno de 500 mmHg. Todos os materiais utilizados (Figura 4) incluindo béqueres, pinças e o kit de filtração foram umedecidos com solução eluidora Tween® 80 a 0,1%.

Figura 4 - Itens aplicados na concentração de protozoários por FM: (a) Membranas de ésteres de celulose - 47 mm / 3 μm ; (b) conjunto porta filtro



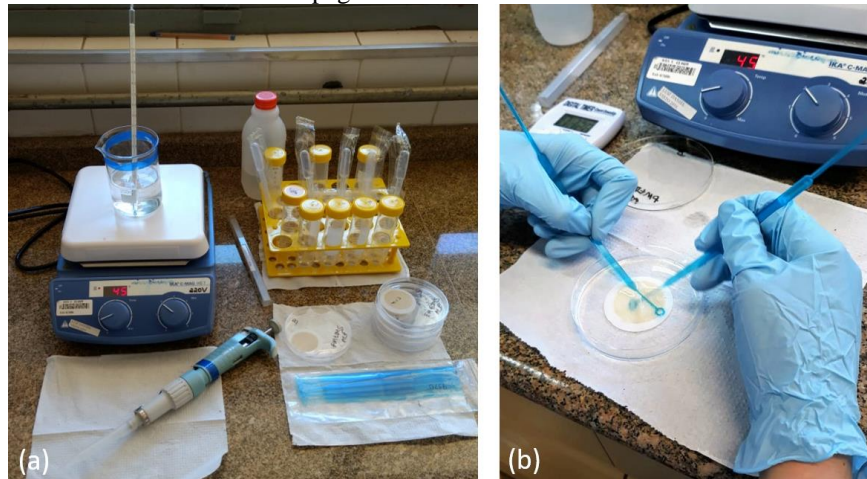
Fonte: Elaborado pelo autor.

A quantidade de membranas utilizadas variou em função da sua colmatção, verificada pela diminuição da velocidade do fluxo. Optou-se por não forçar a filtração por longos períodos em virtude da capacidade de compressibilidade de oocistos (LI; GOODRICH; OWENS, 1995), os quais poderiam ficar retidos nos interstícios da membrana e não serem recuperados. Após a filtração, cada membrana foi transferida para uma placa Petri, contendo 5 mL de Tween® 80 a 0,1%.

As membranas utilizadas foram então raspadas com auxílio de hastas plásticas (provenientes do kit Merifluor®), visando a extração mecânica dos (oo)cistos. As raspagens

foram realizadas conforme Franco et al. (2016) e o desenho experimental do processo é exibido na Figura 5.

Figura 5- (a) Montagem experimental para raspagem das membranas com Tween® 80 aquecido; (b) Detalhes da raspagem de membrana usada.



Fonte: Elaborado pelo autor.

De modo mais detalhado, pode-se dizer que esta etapa consistiu no descarte do volume de Tween® 80 a 0,1% contido na placa para um tubo Falcon® (tubo de centrifugação com capacidade de 50 mL) e três raspagens seguidas da membrana, cada qual utilizando 5 mL de Tween® 80 a 0,1% aquecido a 45°C pelo período de 3 min. Em seguida, foram feitas duas lavagens com aproximadamente 2 mL da solução eluidora. Entre cada uma das raspagens, o volume foi transferido para o tubo de centrifugação, com auxílio de pipeta Pasteur plástica. O procedimento permitiu reunir um volume de aproximadamente 22 mL por membrana, demandando aproximadamente 15 min para cada.

O volume resultante das raspagens das membranas foi então submetido à dupla centrifugação com gradiente de 1500 G por 15 minutos (Eppendorf® Centrifuge 5810). Após a primeira centrifugação, foi descartado o sobrenadante até a marcação de 5 mL e completado com água ultrapura (Milli-Q®). O sobrenadante da segunda centrifugação, por sua vez, foi cuidadosamente descartado até a marcação de 0,5 mL, preservando o sedimento formado. Este pellet foi ressuspensionado por meio de homogeneização em vórtex e auxílio de pipeta Pasteur plástica, e deste conteúdo foram retiradas duas alíquotas de 50 µL, dispostas em dois poços de microscopia para secagem e posterior preparo para reação de imunofluorescência direta (RID).

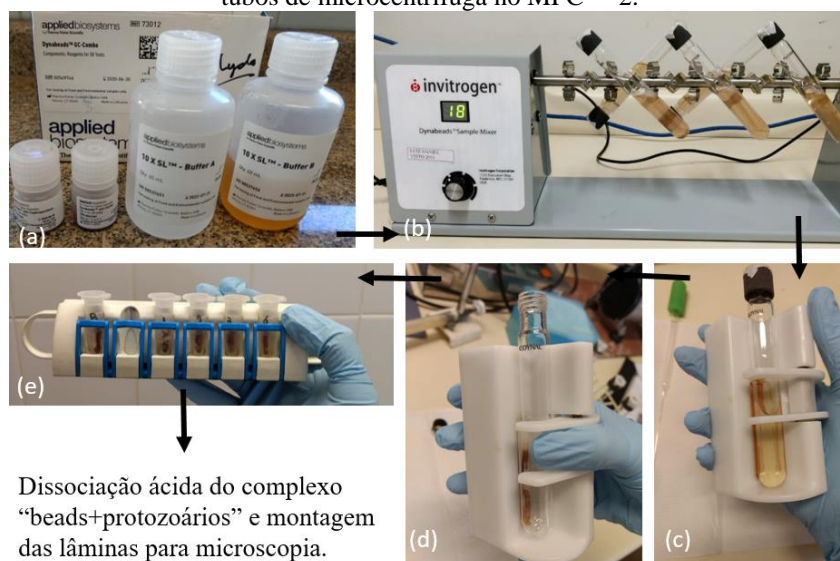
A recuperação dos (oo)cistos foi calculada por meio da Equação 1, aplicável em situações em que o sedimento não foi completamente analisado. O fator de correção (ANDREOLI; SABOGAL-PAZ, 2017; GIGLIO; SABOGAL-PAZ, 2018), no caso do pellet

proveniente da raspagem das membranas seguida de centrifugação foi igual a 5, calculado pela razão entre o volume da amostra concentrada (0,5 mL) e a alíquota em estudo (0,1 mL).

4.8.2. Método de filtração em membrana, seguido de separação imunomagnética, (FM+IMS) utilizando suspensões de (oo)cistos

O procedimento de FM+ IMS consistiu na filtração por membrana, seguida de raspagem com Tween® 80 a 0,1% aquecido a 45°C e dupla centrifugação, conforme descrito no item 4.8.1. Contudo, o presente método incluiu a etapa de purificação, realizada por separação imunomagnética (IMS). Com isso, foi utilizado o volume de 5 mL remanescente no tubo de centrifugação, após retirada do sobrenadante e ressuspensão do sedimento por homogeneização em vórtex e agitação com pipeta plástica. Este conteúdo foi encaminhado para o tubo de lado plano (DynaTM-TLP) para adição dos reagentes do kit DynabeadsTM (Figura 6 (a)).

Figura 6- Etapas da purificação da ALF por IMS: (a) reagentes do kit DynabeadsTM; (b) homogeneização em mixer rotatório; (c) TLP no MPCTM-1; (d) esferas magnéticas e protozoários retidos pelo ímã do MPCTM-1; (e) tubos de microcentrifuga no MPCTM-2.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A IMS foi realizada de acordo com o procedimento descrito pelo fabricante (kit DynabeadsTM). Resumidamente, as etapas adotadas com a ALF são apresentadas na Figura 6: homogeneização dos reagentes (anticorpos anti-*Giardia* e anti-*Cryptosporidium* aderidos a esferas magnéticas e soluções tampão); agitação em mixer rotatório por 1 hora a 18 rpm; concentração do complexo “protozoários-beads” pelo primeiro concentrador magnético (MPCTM-1); descarte do sobrenadante do TLP e direcionamento para os tubos de microcentrifuga; concentração do complexo “protozoários-beads” pelo segundo concentrador

magnético (MPCTM-2). Em seguida, utilizando três dissociações ácidas de 50 µL de ácido clorídrico (HCl) a 0,1 N (Sigma-Aldrich®), neutralizadas por 5µL de hidróxido de sódio (NaOH) a 1N (Sigma-Aldrich®) dispostos nos poços das lâminas para microscopia de imunofluorescência.

4.9. Estimativa de viabilidade dos métodos de recuperação

Com base na escolha do corante vital (item 4.6), seguiram-se os métodos de recuperação utilizando o protocolo selecionado. Os resultados obtidos foram compilados em termos de oocistos corados, visando verificar o efeito dos métodos de recuperação sobre a estimativa de viabilidade. Para isso, comparou-se o percentual de oocistos ditos não-viáveis na amostra recuperada com a estimativa de viabilidade média presente no inóculo utilizado. O incremento percentual de oocistos positivos para o protocolo selecionado indicou a perda de viabilidade vinculada a cada método de recuperação.

Os resultados analisados foram provenientes dos testes de recuperação com inóculo de volumes de suspensões comerciais. Não foram considerados os dados do kit ColorSeedTM, utilizado para avaliação de qualidade analítica, pois, além de ter sido aplicado apenas para um dos métodos testados em cada matriz, seu inóculo contém (oo)cistos permanentemente corados, o que impede verificar a incorporação de corantes vermelhos. Além disso, excluiu-se *Giardia muris* como organismo de interesse para investigação de viabilidade, devido à dificuldade de visualização identificada, analisando-se, portanto, exclusivamente *Cryptosporidium parvum*.

Quanto aos métodos tratados, não foram considerados os dados obtidos para a primeira tentativa de recuperação por centrifugação direta com inserção de solução de dispersão seguida de separação imunomagnética (CD+ICN7X+IMS, descrita no item 4.7.1), em que não houve etapa de remoção de partículas magnéticas. Tampouco foram contabilizados os resultados para floculação por carbonato de cálcio (FCCa) sem etapa de purificação (item 4.7.3). Nestes procedimentos, a recuperação obtida para *C.parvum* foi insuficiente para verificar a incorporação de corante.

4.10. Avaliação de custos dos métodos de recuperação

Os custos dos métodos de recuperação de protozoários foram levantados com base nos reagentes utilizados nas etapas de concentração, purificação e detecção. Os dados foram

corrigidos para dezembro de 2018, considerando o índice geral de preços de mercado (IGP-M/FGV), por meio da multiplicação do valor original pelo fator acumulado do índice de referência. Não foram considerados equipamentos, tampouco infraestrutura necessária, sendo contabilizados apenas consumíveis durante os procedimentos de recuperação.

A concentração de amostras que utilizaram sais de cálcio, ferro ou alumínio não foram contabilizadas nos custos de recuperação, visto que são reagentes de uso de rotina em laboratórios, comercializados em quantidade, em geral, mínima de 500 g, com prazo de expiração em torno de dois anos ou mais. Igualmente, o preparo das soluções para precipitação química e tampão envolve diluição de pequenas quantidades dos referidos materiais, sendo irrelevante em comparação aos demais a longo prazo. O mesmo ocorre para o detergente ICN 7X (MP BIO®) aplicado na centrifugação direta com adição de solução de dispersão. No caso da concentração por filtração em membranas, foi contabilizado o valor unitário das mesmas, posto que amostras turvas, que demandam grande troca de membranas podem inviabilizar a utilização da técnica por aumentar a dificuldade de execução do método e torná-lo mais oneroso.

A etapa de purificação, realizada por separação imunomagnética, foi quantificada em função do custo do kit Dynabeads™, suficiente para 50 testes de acordo com a informação do fabricante. Dado que o número de dissociações ácidas não está vinculado ao volume de anticorpos combinados às esferas magnéticas, o valor total foi dividido pelo número de testes do kit, fornecendo o custo unitário.

Cálculo similar foi feito para a detecção, utilizando os reagentes do kit Merifluor® e do corante para teste confirmatório de morfologia (DAPI com Fluoroshield™). Contudo, no que concerne aos testes de detecção, a quantidade de reagentes utilizada (contabilizada em termos de gotas) varia conforme o número de poços de microscopia. Deste modo, no caso de amostra purificada e aplicação de três dissociações ácidas, por exemplo, são necessárias três utilizações de Merifluor® (custo do kit, dividido por cinquenta testes, multiplicado por três utilizações) e seis gotas do corante DAPI (custo do frasco, dividido pelo volume do mesmo, multiplicado pelo volume de duas gotas e o número de poços). No caso de amostras não purificadas, nas quais é analisada alíquota do sedimento concentrado, foram contabilizadas duas utilizações de Merifluor® (referentes a dois poços de microscopia) e, portanto, quatro gotas de DAPI por análise.

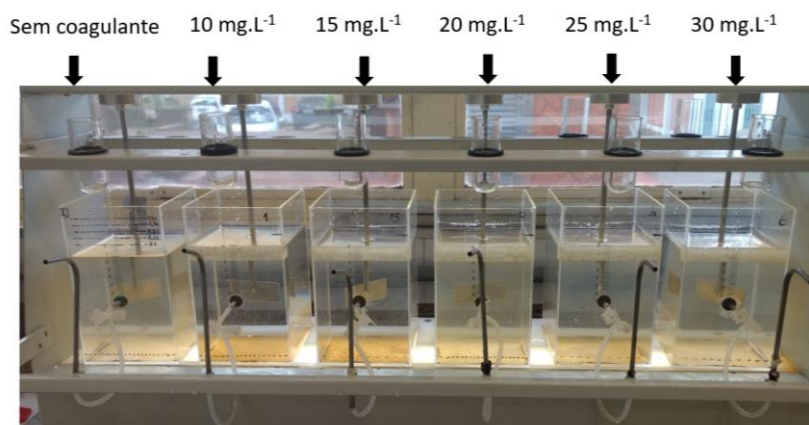
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Tratabilidade da água simulando a tecnologia de ciclo completo com decantação

5.1.1. Diagramas de coagulação com policloreto de alumínio (PAC)

O ensaio de tratabilidade realizado inicialmente considerou dosagens de policloreto de alumínio (PAC) entre 10 e 30 mg L⁻¹, sem quaisquer alterações de pH. A remoção de turbidez foi de 81,8% para a dosagem de 10 mg L⁻¹, 82,3% para 15 mg L⁻¹ e menor que 40% para as demais dosagens de PAC testadas, o que pode ser visualmente inferido pela Figura 7. Estes resultados preliminares sugeriram que o mecanismo de coagulação predominante foi a adsorção e neutralização de cargas, de modo que se seguiram ensaios de tratabilidade envolvendo menores dosagens de coagulante, em virtude também da baixa turbidez da água do manancial. As doses testadas em seguida foram de 5, 7,5, 10, 12,5 e 15 mg L⁻¹ de PAC em comparação à sedimentação natural, pela não utilização do coagulante.

Figura 7- Jarros contendo água clarificada nos ensaios preliminares para definição de dosagens a serem aplicadas na construção dos diagramas de coagulação

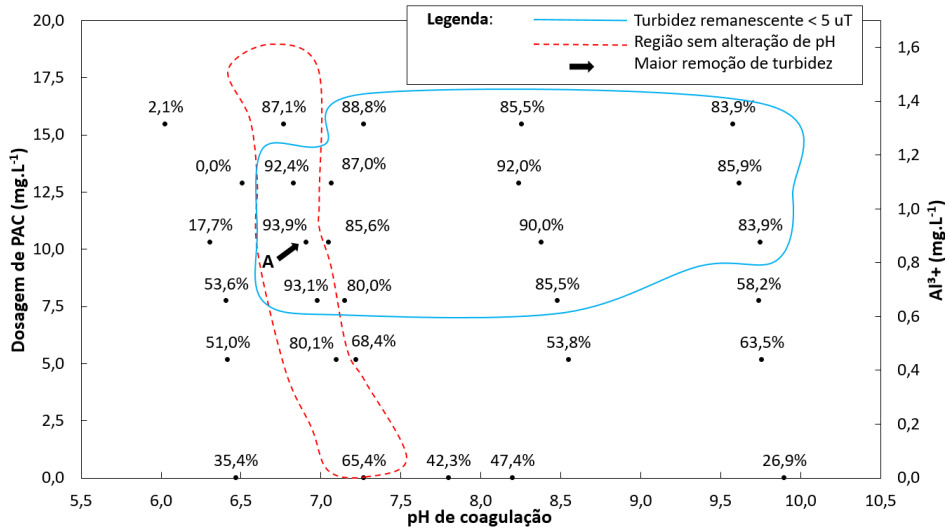


Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 8 e a Figura 9 exibem os diagramas de coagulação elaborados para remoção de turbidez em função do pH de coagulação e dosagem de PAC, considerando a velocidade de sedimentação (V_s) de 2,0 cm min⁻¹ e 1,0 cm min⁻¹, respectivamente. Em cada gráfico, a região delimitada com linha contínua em azul refere-se à turbidez remanescente menor que 5,0 uT, isto é, o valor recomendado para encaminhamento ao sistema de filtração em um tratamento convencional (DI BERNARDO; SABOGAL-PAZ, 2008). As remoções indicadas pela linha tracejada em vermelho referem-se aos pontos em que não houve alteração de pH.

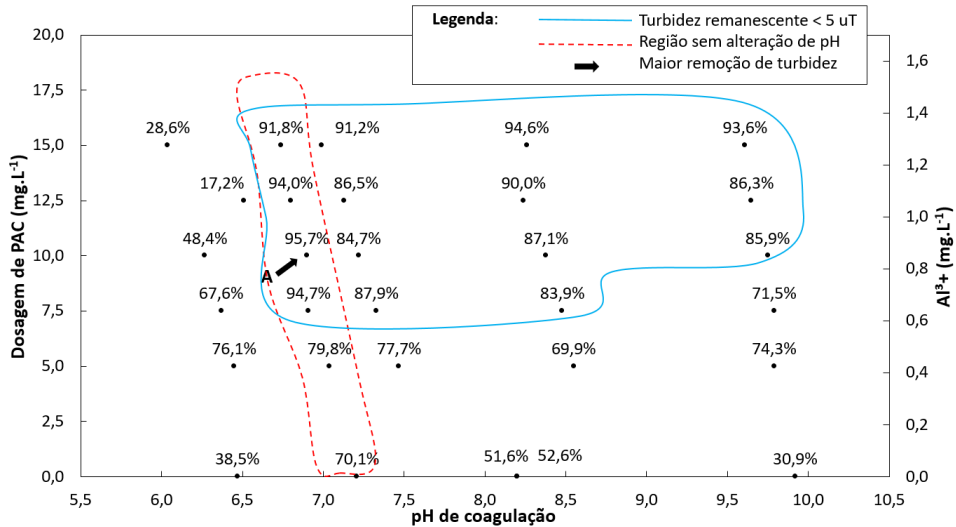
O ponto A indicado na Figura 8 e na Figura 9 refere-se à dosagem de 10 mg L⁻¹ de PAC, sem que tenha havido alteração de pH da água bruta (AB). Esta condição proveu a melhor remoção de turbidez tanto na velocidade de sedimentação de 2,0 cm min⁻¹ (93,9%) quanto na de 1,0 cm min⁻¹ (95,7%).

Figura 8- Diagrama de coagulação para remoção de turbidez nas condições: dose de PAC entre 5 e 15 mg L⁻¹, G_{mr} = 1000 s⁻¹, T_{mr} = 10 s, G_{ml}= 30 s⁻¹, T_f: 20 min, V_s = 2,0 cm min⁻¹



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9 - Diagrama de coagulação para remoção de turbidez nas condições: dose de PAC entre 5 e 15 mg L⁻¹, G_{mr} = 1000 s⁻¹, T_{mr} = 10 s, G_{ml}= 30 s⁻¹, T_f: 20 min, V_s = 1,0 cm min⁻¹



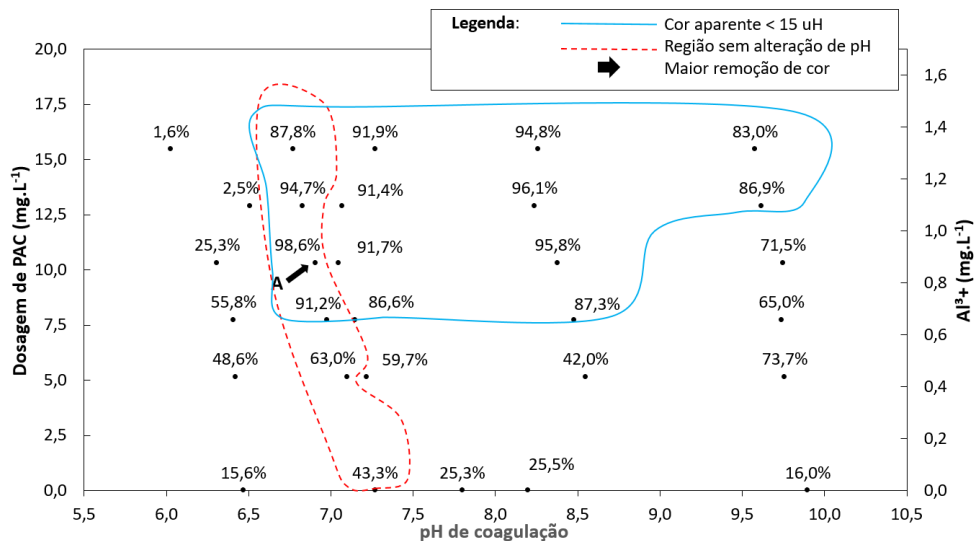
Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 9 e Figura 10, por sua vez, apresentam os diagramas de coagulação desenvolvidos para remoção de cor aparente, considerando a velocidade de sedimentação (V_s) de 2,0 cm min⁻¹ e 1,0 cm min⁻¹, respectivamente. Em cada gráfico, a região delimitada com linha contínua em azul refere-se à cor remanescente menor que 15 uH, isto é, o VMP para

padrões organolépticos citado pela PRC nº 5 de 2017 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017). As remoções indicadas pela linha tracejada em vermelho referem-se aos pontos em que não houve ajuste de pH.

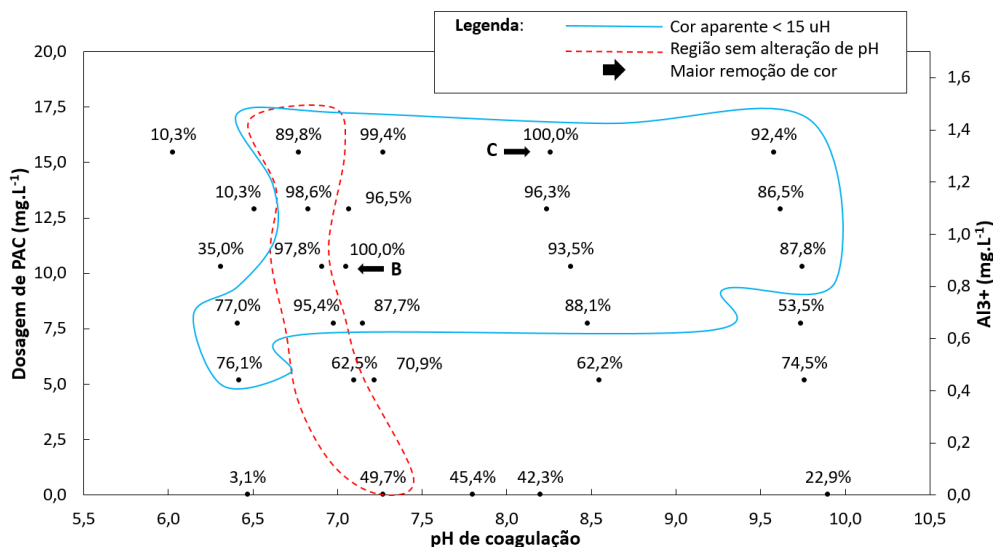
Quanto aos destaques de cada diagrama, o ponto A deve ser novamente ressaltado, desta vez na Figura 10, onde apresentou a melhor remoção de cor aparente para $V_s = 2,0 \text{ cm min}^{-1}$ e dosagem de coagulante igual a 10 mg L^{-1} , sem adição de acidulante ou alcalinizante. Os pontos B e C referem-se às melhores remoções de cor a $1,0 \text{ cm min}^{-1}$, sob a dosagem de 10 mg L^{-1} e 15 mg L^{-1} e pH inicialmente ajustado para 8 e 9, respectivamente, com a adição de hidróxido de sódio.

Figura 10 - Diagrama de coagulação para remoção de cor nas condições: dosagem de PAC entre 5 e 15 mg L^{-1} , $G_{mr} = 1000 \text{ s}^{-1}$, $T_{mr} = 10 \text{ s}$, $G_{ml} = 30 \text{ s}^{-1}$, $T_f: 20 \text{ min}$, $V_s = 2,0 \text{ cm min}^{-1}$



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 - Diagrama de coagulação para remoção de cor nas condições: dosagem de PAC entre 5 e 15 mg L^{-1} , $G_{mr} = 1000 \text{ s}^{-1}$, $T_{mr} = 10 \text{ s}$, $G_{ml} = 30 \text{ s}^{-1}$, $T_f: 20 \text{ min}$, $V_s = 1,0 \text{ cm min}^{-1}$



Fonte: Elaborado pelo autor.

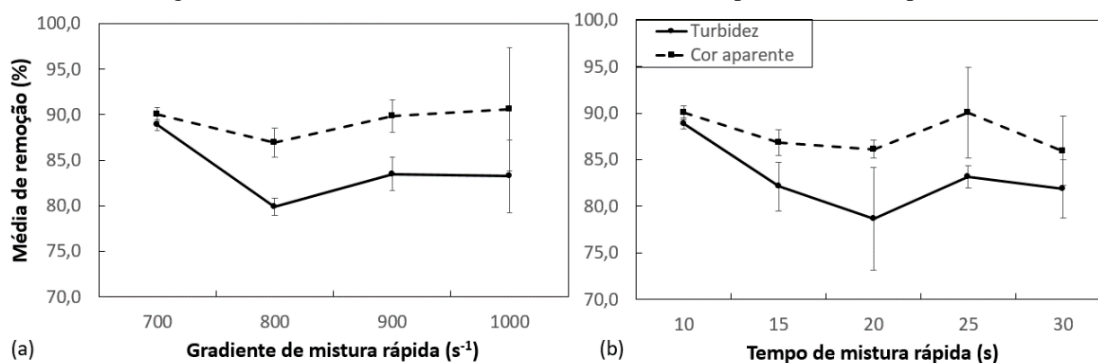
A análise dos diagramas apresentados nas figuras 8, 9, 10 e 11 como um todo, permite afirmar que o PAC é um coagulante eficiente para o tratamento da água do manancial de estudo por decantação. Tal afirmação se baseia na amplitude de pH na qual o coagulante apresentou-se aplicável, promovendo remoções de turbidez e cor satisfatórias ($< 5\text{uT}$ e $< 15\text{uH}$, respectivamente).

Para dar prosseguimento à seleção dos parâmetros de mistura adequados, optou-se pela utilização da dosagem de 10 mg L^{-1} de coagulante, sem correção de pH da água bruta, em que foram obtidas remoções de turbidez e cor aparente dentro do intervalo de interesse. Esta condição refere-se ao obtido no ponto A, para o qual a água clarificada apresentou cor e turbidez remanescentes de $1,8\text{ uT}$ e $1,7\text{ uH}$ a $2,0\text{ cm min}^{-1}$ e $1,3\text{ uT}$ e $1,1\text{ uH}$ a $1,0\text{ cm min}^{-1}$.

5.1.2. Definição dos parâmetros de operação dos ensaios de tratabilidade

A definição dos parâmetros de mistura rápida baseou-se nos resultados apresentados na Figura 12, onde é possível verificar a remoção de turbidez e de cor aparente em função de (a) gradiente de velocidade para a mistura rápida e (b) tempo de mistura rápida. Os gradientes adotados foram de $700, 800, 900$ e 1000 s^{-1} e foram considerados os tempos de $10, 15, 20, 25$ e 30 s .

Figura 12 - Remoções de cor aparente e turbidez em função dos parâmetros operacionais de mistura rápida: (a) gradiente médio de velocidade de mistura, e; (b) tempo de mistura rápida



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Parâmetros operacionais em (a): Gmr: variável; Tmr: 10 s ; Gf: 30 s^{-1} ; Tf: 20 min ; Vs: 2 cm min^{-1} ; Parâmetros operacionais em (b): Gmr: selecionado 700 s^{-1} ; Tmr: variável; Gf: 30 s^{-1} ; Tf: 20 min ; Vs: 2 cm min^{-1} .

Todos os gradientes de mistura rápida testados apresentaram remoções acima de $85,0\%$ para cor aparente e $79,0\%$ para turbidez. Optou-se por dar seguimento aos ensaios utilizando o gradiente médio de 700 s^{-1} equivalente à rotação de 380 rpm no equipamento), em que houve remoção média de $88,9\%$ de turbidez e $90,0\%$ de cor aparente. Além disso, a turbidez média remanescente obtida foi a menor dentre as demais verificadas, de $3,46\text{ uT} \pm$

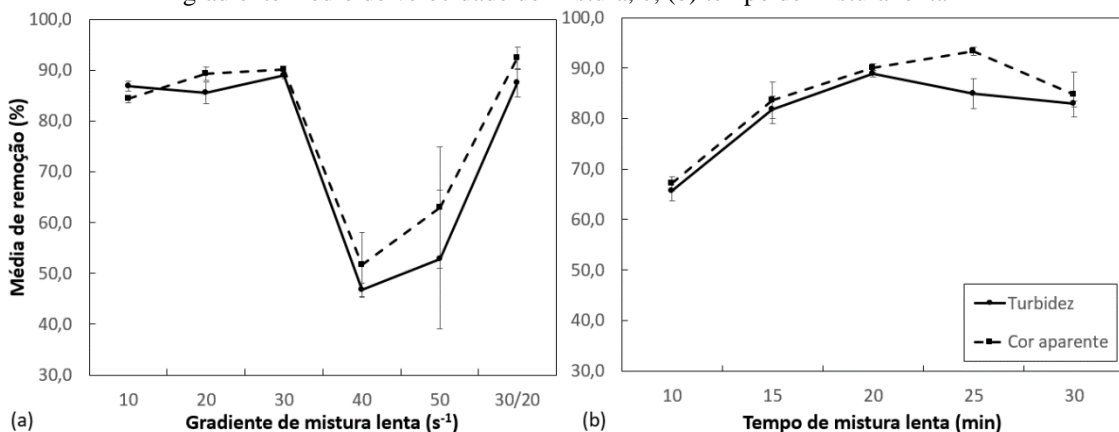
0,19, atendendo a recomendação de Di Bernardo e Sabogal-Paz (2008) para o encaminhamento de água clarificada para os filtros.

Quanto ao tempo de mistura rápida, apresentado na Figura 12 (b), houve destaque para os tempos de 10 s e 25 s, os quais apresentaram remoções médias de turbidez em torno de 90,0%. Nesta comparação, o tempo de 10 s foi considerado mais adequado, devido à maior remoção de cor aparente e menor desvio padrão dos resultados obtidos.

A Figura 13 (a) exibe os resultados de remoção de turbidez e cor aparente nas condições de gradiente de mistura lenta (G_f) iguais a 10, 20, 30, 40, 50 s^{-1} e escalonado de 30 a 20 s^{-1} . O tempo de mistura considerado nessa etapa de seleção de parâmetros foi de 20 min e, no caso da condição escalonada, utilizou-se 10 min para cada gradiente. Gradientes menores favoreceram a clarificação da água, tendo havido destaque para o de 30 s^{-1} (88,9 % \pm 0,60 de remoção de turbidez e 90,0 % \pm 0,76 de remoção de cor aparente) e para a floculação com gradiente escalonado. Para dar seguimento aos ensaios, foi selecionado o G_f de 30 s^{-1} por conta do menor desvio padrão apresentado em relação ao de 30/20 s^{-1} (87,4 % \pm 2,76 de remoção de turbidez e 92,3 % \pm 2,24 de remoção de cor aparente).

No que se refere ao tempo de mistura lenta, a Figura 13 (b) mostra os resultados para os ensaios de jarreste com tempos entre 10 e 30 min. O tempo de 10 min apresentou as menores remoções médias de cor aparente e turbidez, o que indica que este período não permitiu a formação apropriada dos flocos. Nele, a turbidez remanescente média foi de 9,15 \pm 0,49 e a cor de 24,3 \pm 1,01, de modo que nenhum dos dois parâmetros atendeu às expectativas de remoção para água clarificada. Apesar disso, verificou-se uma tendência crescente de remoção dos parâmetros analisados em função do aumento do tempo de floculação até o período de 20 min, tendo este sido selecionado como tempo “ótimo” de mistura lenta.

Figura 13 - Remoções de cor aparente e turbidez em função dos parâmetros operacionais de floculação: (a) gradiente médio de velocidade de mistura, e; (b) tempo de mistura lenta



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Parâmetros operacionais em (a): Gmr: 700 s⁻¹; Tmr: 10 s; Gf: variável; Tf: 20 min; Vs: 2 cm min⁻¹; Parâmetros operacionais em (b): Gmr: 700 s⁻¹; Tmr: 10 s; Gf: selecionado 30 s⁻¹; Tf: variável; Vs: 2 cm min⁻¹.

Por fim, foi definida a velocidade de sedimentação (Vs) de 2,0 cm min⁻¹, em virtude dos resultados de remoção de turbidez e cor aparente apresentados na Tabela 2. Apesar de Vs igual a 1,0 cm min⁻¹ apresentar maiores remoções para os parâmetros de interesse, esta velocidade é menos interessante ao pensar em migração dos parâmetros operacionais para escala plena, exigindo maiores instalações para unidades de decantação. No caso de escala de bancada, trabalhar com Vs baixa implica um maior tempo de coleta das amostras em jarreste, tornando os ensaios mais demorados.

Tabela 2 - Remoção média percentual de turbidez e cor aparente para diferentes velocidades de sedimentação

Vs (cm min ⁻¹)	Remoção de turbidez (%)	Remoção de cor aparente (%)
2,0	88,9 ± 0,60	90,0 ± 0,76
1,5	87,2 ± 1,56	89,9 ± 1,65
1,0	89,7 ± 1,43	92,9 ± 0,32

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Parâmetros operacionais: Gmr: 700 s⁻¹; Tmr: 10 s; Gf: 30 s⁻¹; Tf: 20 min; Vs: variável.

Os parâmetros operacionais selecionados para os demais ensaios de tratabilidade são apresentados na Tabela 3, a partir dos quais se seguiram testes com filtros acoplados. Estes valores foram adotados para testes sucessivos, visando a geração dos resíduos de tratamento (água de lavagem de filtros – ALF e lodo).

Tabela 3 - Parâmetros operacionais "ótimos", adotados nos ensaios de tratabilidade definitivos

Parâmetros	Valor	Unidade
Gradiente de velocidade médio na mistura rápida – Gmr	700	s ⁻¹
Tempo de mistura rápida – Tmr	10	s
Gradiente de velocidade médio na mistura lenta – Gf	30	s ⁻¹
Tempo de mistura lenta – Tf	20	min
Velocidade de sedimentação – Vs	2,0	cm.min ⁻¹

Fonte: Elaborado pelo autor.

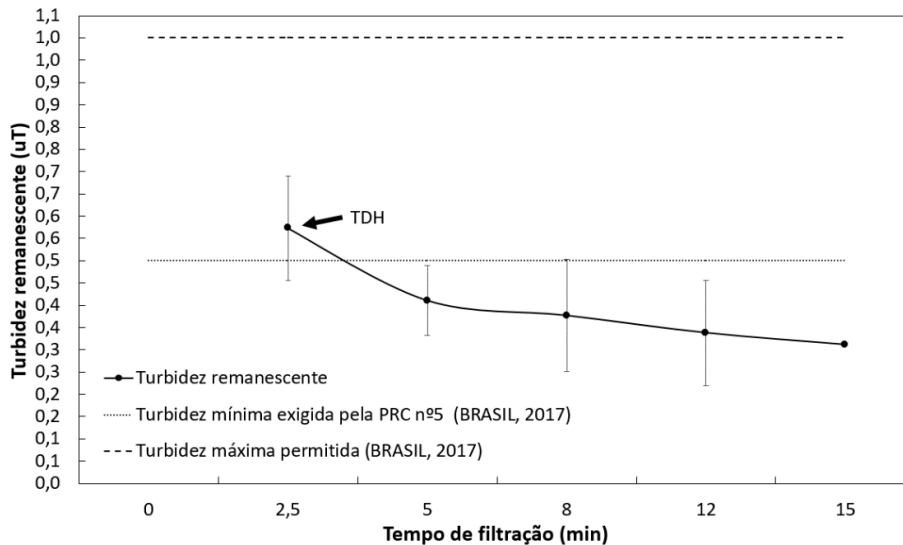
5.1.3. Ensaios de filtração

Com base nas características da água decantada mediante as condições estabelecidas conforme o item 5.1.2, verificou-se que a matriz era compatível para encaminhamento aos filtros de laboratório do tipo FLA1: turbidez ≤ 10 uT e cor verdadeira ≤ 20 uH ou turbidez ≤ 5 uT e cor verdadeira ≤ 100 uH (DI BERNARDO; DANTAS; VOLTAN, 2011).

A água filtrada (AF) atendeu aos requisitos da Portaria de Consolidação MS nº 5 (2017), dado que a cor aparente se apresentou abaixo do limite de detecção dentre os tempos

de coleta investigados e a turbidez atingiu o mínimo exigido de 1,0 uT, conforme pode ser verificado no gráfico da Figura 14.

Figura 14 - Turbidez da água filtrada ao longo da carreira de filtração em comparação às exigências da PRC nº 5 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017)



Fonte: Elaborado pelo autor.

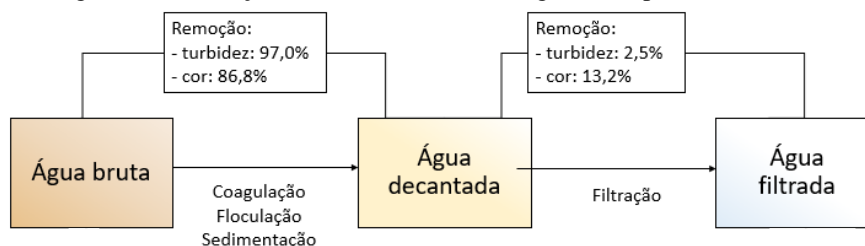
Nota: TDH = Tempo de detenção hidráulica experimental de 2,6 min (GIGLIO; SABOGAL-PAZ, 2017).

5.1.4. Análise da tecnologia proposta para a água em estudo

O potencial zeta (PZ) das amostras de água bruta, decantada e filtrada foi de -17,80 mV, -2,49 mV e -0,22 mV, respectivamente. Para águas naturais, o PZ é negativo, variando geralmente entre -8 e -20 mV (RICHTER, 2009), compatível com os resultados obtidos para a água bruta. A coagulação foi efetiva, na medida em que se obteve uma redução no módulo do PZ, o que ocorre mediante o aumento da concentração iônica, indicando redução na repulsão de cargas e facilitação da aglomeração de partículas em flocos.

Com base nos dados de cor e turbidez analisados ao longo do tratamento proposto, verificou-se que a tecnologia de ciclo completo com decantação utilizando o PAC permitiu remoção média de 97,0% de turbidez da água e de 86,8% da cor, na decantação. Isto é mostrado no esquema da Figura 15.

Figura 15 - Remoção de turbidez e cor ao longo das etapas de tratamento



Fonte: Elaborado pelo autor.

Quanto aos parâmetros biológicos, foram analisados coliformes totais e *Escherichia coli* durante o tratamento, cujos resultados são indicados na Tabela 4. No caso, a água filtrada atende aos requisitos da PRC nº 5 de 2017 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017) para *E. coli*, mas contém coliformes totais, sendo que o ideal é a ausência em 100 mL na saída da estação de tratamento de água (ETA). No caso, esta situação seria solucionada por meio de uma etapa de desinfecção.

Tabela 4 - Coliformes totais e *Escherichia coli* detectados nas matrizes em estudo.

Matriz	Coliformes totais	<i>E. coli</i>
	UFC 100mL ⁻¹	
Água bruta (AB)	730	Ausente
Água decantada (AD)	310	Ausente
Água filtrada (AF)	9	Ausente

Fonte: Elaborado pelo autor.

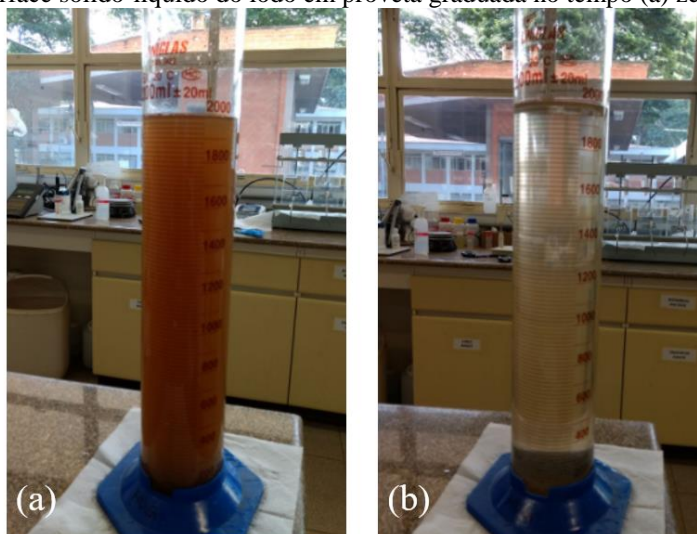
Nota: AF constituiu-se de amostra composta.

5.2. Geração e caracterização dos resíduos de tratamento de água

5.2.1. Adensamento do lodo

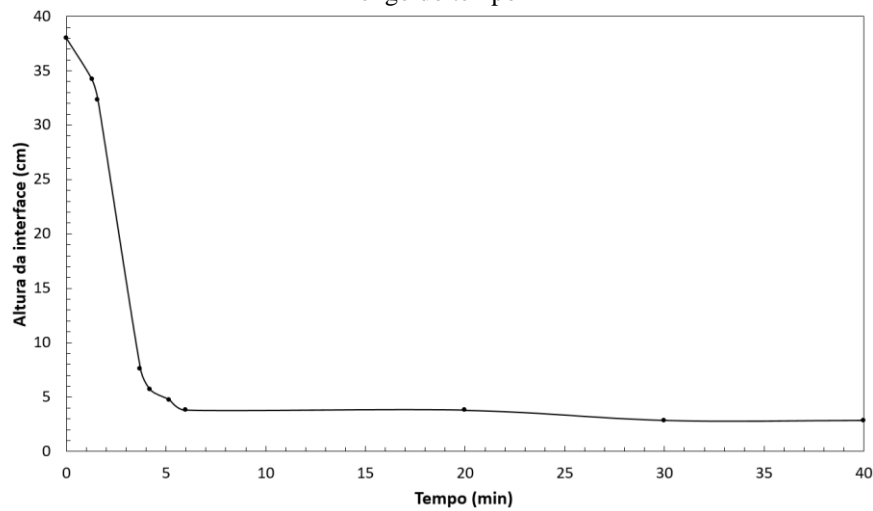
A análise da interface do sólido-líquido apresentada na Figura 16 permitiu a elaboração da curva de espessamento de lodo apresentada na Figura 17. A “queda” na interface é muito rápida, devido à quantidade de partículas com sedimentação discreta presentes na amostra. Além disso, a percepção é dificultada devido à cor da matriz.

Figura 16- Interface sólido-líquido do lodo em proveta graduada no tempo (a) zero, e; (b) 40 min



Fonte: Elaborado pelo autor.

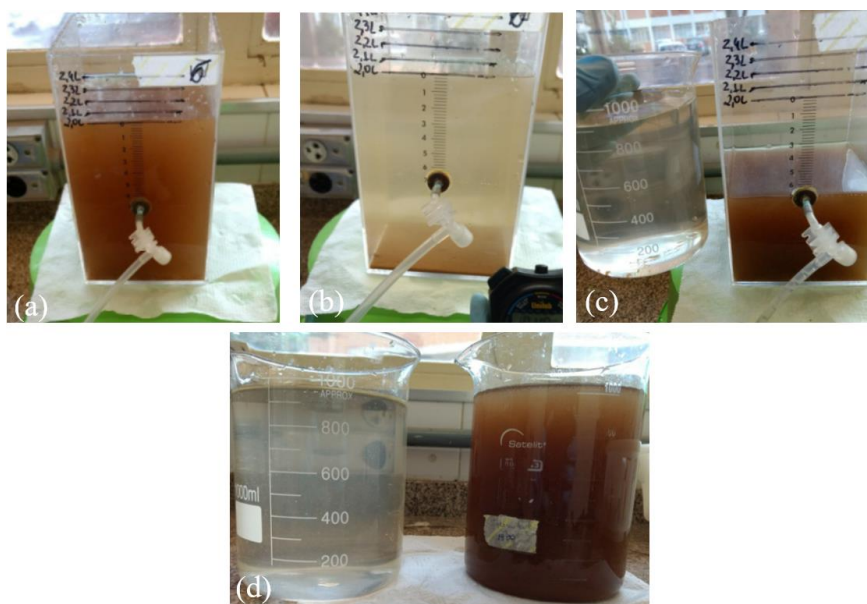
Figura 17- Curva de espessamento do lodo por gravidade, em função da altura da interface sólido-líquido ao longo do tempo



Fonte: Elaborado pelo autor.

Com base na estabilização da interface (Figura 17), estabeleceu-se o período de 30 min para que houvesse a sedimentação natural das partículas presentes no lodo, simulando um adensamento por gravidade. O tratamento é apresentado na Figura 18, onde é possível comparar visualmente a cor do lodo bruto (LB) e do lodo adensado (LA), cujos parâmetros concentrados podem ser verificados na Tabela 5. O sobrenadante foi descartado e os demais procedimentos da pesquisa utilizaram apenas o LA, tratado simplificadaamente por “lodo” a partir deste ponto do texto.

Figura 18 - Adensamento do lodo: (a) LB em $t = 0$; (b) LB em $t = 19$ min; (c) logo após a remoção do clarificado e homogeneização do remanescente, e; (d) comparação entre o sobrenadante removido



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: LB = lodo bruto; t = tempo.

Tabela 5 - Comparação entre os parâmetros de qualidade do lodo bruto (LB) e do lodo adensado (LA)

Parâmetro	LB	LA	Aumento na concentração
Sólidos totais (mg L ⁻¹)	520,00±38,61	756,67±22,31	45,5%
Sólidos sedimentáveis (mL L ⁻¹)	13	25	92,3%
Cor aparente (uH)	508	> LD	-
Turbidez (uT)	305	538	76,4%

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.2. Caracterização geral dos resíduos de tratamento

A Tabela 6 apresenta o compilado da caracterização dos resíduos gerados nos ensaios de tratabilidade em escala de bancada. Os parâmetros apresentados influenciam na capacidade de recuperar protozoários nas matrizes e indicam as particularidades que diferem o lodo e a água de lavagem de filtros.

Tabela 6 - Caracterização físico-química e biológica dos resíduos gerados em tratamento em comparação à água bruta

Parâmetro	AB	ALF	LA	Unidade
pH	7,12	6,62	6,96	-
Temperatura	23	23	23	°C
Turbidez	27,2	6,64	538	uT
Cor	113,0	8,5	>LD	uH
abs 254 nm	0,123	0,058	1,206	-
Condutividade	43,96	15,95	48,72	µS cm ⁻¹
Alcalinidade	18,93	7,786	27,48	mgCaCO ₃ L ⁻¹
COT	1,902	0,620	NM	mg L ⁻¹
DQO	<LD	<LD	101	mg L ⁻¹
Dureza	16,32	4,08	16,32	mgCaCO ₃ L ⁻¹
Sólidos sedimentáveis	0,5	<LD	25,0	mL L ⁻¹
Alumínio	0,430	<LD	70,680	mg L ⁻¹
Ferro	3,593	1,003	97,800	mg L ⁻¹
Manganês	0,074	0,003	2,640	mg L ⁻¹
Coliformes totais	730	130	19200	UFC 100mL ⁻¹
<i>Escherichia coli</i>	Ausente	Ausente	Ausente	UFC 100mL ⁻¹

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: AB = água bruta; ALF = água de lavagem de filtros; LA = lodo adensado; abs 254 nm = absorvância no comprimento de onda 254 nm; COT = carbono orgânico total; DQO = demanda química de oxigênio; LD = limite de detecção; NM = não medido.

Nota?: As análises para AB constituem valores médios de várias amostragens, enquanto ALF e LA foram produto de amostra composta.

A caracterização realizada refletiu a dificuldade de manejo dos lodos de estações de tratamento de água (ETAs) e a importância de que recebam tratamento e destinação adequada. Em comparação aos lodos de estações de tratamento de esgotos (ETEs), os lodos de ETA apresentam baixo carbono orgânico total, e uma baixa relação DBO/DQO, apresentando baixa biodegradabilidade, podendo comprometer sistemas em que os resíduos de ETA são encaminhados à rede coletora de esgotamento sanitário (FERREIRA FILHO; WAELKENS, 2009), o que pode ser sugerido pela análise dos dados da Tabela 6.

O espessamento por gravidade, apresentado no item 5.2.1, constituiu um tratamento interessante para aumentar o teor de sólidos (Tabela 5), mas também foi responsável pela concentração de metais no lodo adensado (Tabela 6). No caso do ferro, especificamente, houve aumento de mais de 2000% em comparação ao detectado na água bruta. Este é mais um fator relacionado à pouca atenção que os lodos de ETA possuem em comparação aos de estações de tratamento de esgoto (ETEs), o qual é de interesse como biossólido. Alternativas como o lançamento do lodo de ETA no sistema de esgotamento sanitário, por exemplo, devem ser criteriosamente analisadas, pois sua viabilidade técnica depende de fatores como o regime de descarga dos decantadores, concentração de sólidos, diluição do lodo de ETA em relação ao afluente à ETE e também ao fato de que a inserção de metais pode alterar sistemas biológicos de tratamento (WAGNER; PEDROSO, 2014).

No caso da água de lavagem de filtros (ALF), não houve incremento na concentração de metais, tampouco microrganismos. Acredita-se que o volume de água deionizada aplicada para lavagem dos filtros de laboratório não tenha permitido uma reprodução completamente realista das características da ALF em uma ETA real. Contudo, diante da alta concentração dos parâmetros analisados verificada no lodo, entende-se que a maior remoção de microrganismos, sólidos e metais tenha ocorrido na etapa de decantação, o que é corroborado pela análise das etapas de tratamento apresentada no item 5.1.4.

Ainda quanto à ALF, verificou-se que os parâmetros de qualidade diferem do recomendável para água potável em si (BRASIL, 2017), principalmente em termos de turbidez (6,64 uT) e cor (8,5 uH). Estudos como o de Freitas et al. (2010), em escala piloto, demonstraram que práticas de recirculação de ALF sobre a vazão de projeto da ETA foram capazes de alterar as características de entrada no sistema e, inclusive, incrementar a presença de protozoários. Numericamente, porém, a quantificação de (oo)cistos é difícil de ser comparada, na medida em que não houve associação estatisticamente significativa entre os valores de turbidez e a presença de protozoários (teste de correlação de Spearman) no referido estudo (FREITAS et al., 2010).

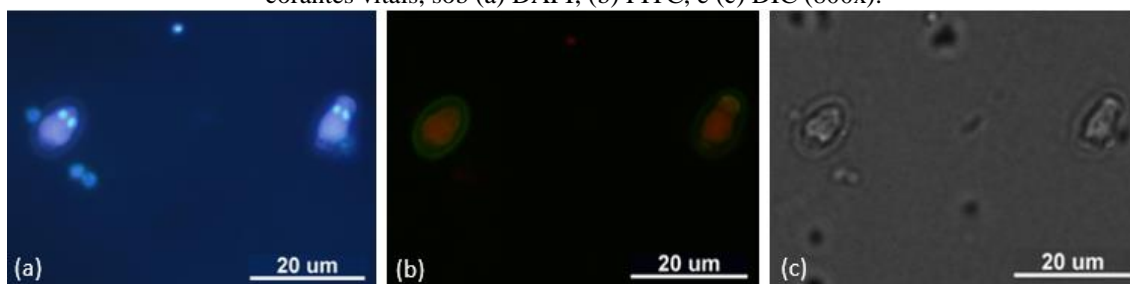
5.3. Testes de viabilidade em (oo)cistos

Os testes preliminares realizados para estabelecer o “branco” indicaram resultados satisfatórios para a visualização da suspensão de *Cryptosporidium parvum* com Merifluor®. No caso da suspensão de *Giardia muris*, a visualização foi possível, mas dificultada em

função da baixa fluorescência desta espécie sob o filtro FITC, conforme exibido na Figura 19 e reportado na literatura em comparação à *Giardia duodenalis* (ALDERISIO et al., 2017).

A controversa fluorescência de *G. muris* foi um item a questionar ao tratar cistos com o *Live/Dead Cell Assay*, pois não era possível prever o comportamento das células supostamente “vivas” (a ficarem verdes sob FITC mediante ação do corante vital metabolizado por enzima intracelular) ou mesmo se o kit Merifluor® não iria interferir na análise de resultados.

Figura 19 - Cistos de *Giardia muris* tratados com Merifluor® e Fluoroshield™ com DAPI, sem adição de corantes vitais, sob (a) DAPI; (b) FITC, e (c) DIC (800x).



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.1. Desempenho do kit ab115347 *Live/Dead Cell Assay* (Abcam®)

5.3.1.1. Análise do procedimento A

A contagem dos (oo)cistos tratados de acordo com o procedimento A é apresentada na Tabela 7. De acordo com o fabricante do kit ab115347 para análise combinada, entende-se que organismos vivos fluorescem em verde na faixa de excitação e emissão de 494 nm e 515 nm, respectivamente (compatível com FITC), com sombreados vermelhos correspondentes aos organismos mortos. Considerando a alta afinidade com DNA, o corante vermelho tende a se destacar na faixa de 528 a 617 nm (compatível com WG).

Os resultados geraram ambiguidades quanto à eficácia do reagente devido a: (i) baixa fluorescência de *Giardia muris* em verde sob filtro FITC; (ii) idade da suspensão de *G. muris* ser maior do que a de *Cryptosporidium parvum*; (iii) sujidades e interferentes nos poços de microscopia.

Além disso, a Tabela 7 indica que a soma dos cistos de *G. muris* identificados em FITC não corresponde ao total visualizado em ambos filtros, o que reflete imprecisão do método. Isto é justificado pelo fato de que grupos de células dentro de uma população microbiana podem exibir captação heterogênea de corantes e, portanto, ser classificados em mais subpopulações do que simplesmente “vivos” e “mortos” (DAVEY, 2011).

Tabela 7 - Contagem de (oo)cistos visualizados em FITC e WG mediante o procedimento A para estimativa de viabilidade

Filtro	Coração	<i>Giardia muris</i>			<i>Cryptosporidium parvum</i>		
		P1	P2	P3	P1	P2	P3
FITC	Verde	23	41	17	72	82	22
	Vermelho	78	92	70	2	3	2
WG	Vermelho	90	123	78	2	3	2
Total	FITC	101	133	87	74	85	24
	FITC+WG	113	164	95	74	85	24

Fonte: Elaborado pelo autor.

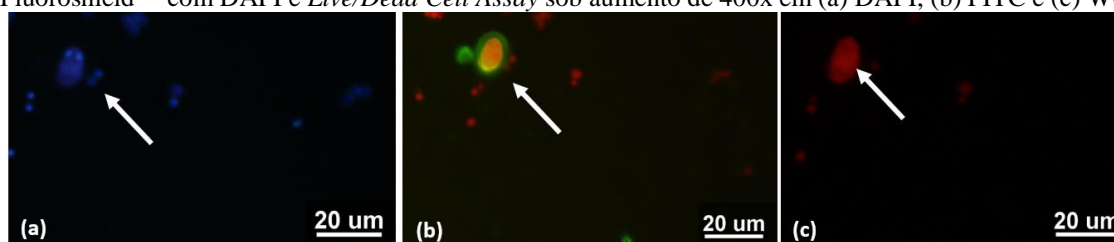
Nota: Organismos visualizados em verde em FITC são considerados viáveis, enquanto os vermelhos identificados em FITC e/ou WG são considerados não-viáveis de acordo com a expectativa do método. Cada P indica uma repetição do procedimento.

(i) Baixa fluorescência de *Giardia muris* em verde sob filtro FITC

A visualização de *G. muris* sob o filtro FITC novamente apresentou-se peculiar, na medida em que alguns cistos apresentaram as paredes levemente coradas de verde, outros com verde em destaque, mas todos, tal qual no tratamento “branco”, tiveram coloração avermelhada de alguma forma. Isto culminou em dificuldade na identificação e, no caso da análise do desempenho do *Live/Dead Cell Assay*, subjetividade ao inferir se cistos verdes sob FITC assim o eram por conta da ação do Merifluor® ou a atuação da enzima esterase, fluorecendo o corante vital positivo do kit de viabilidade.

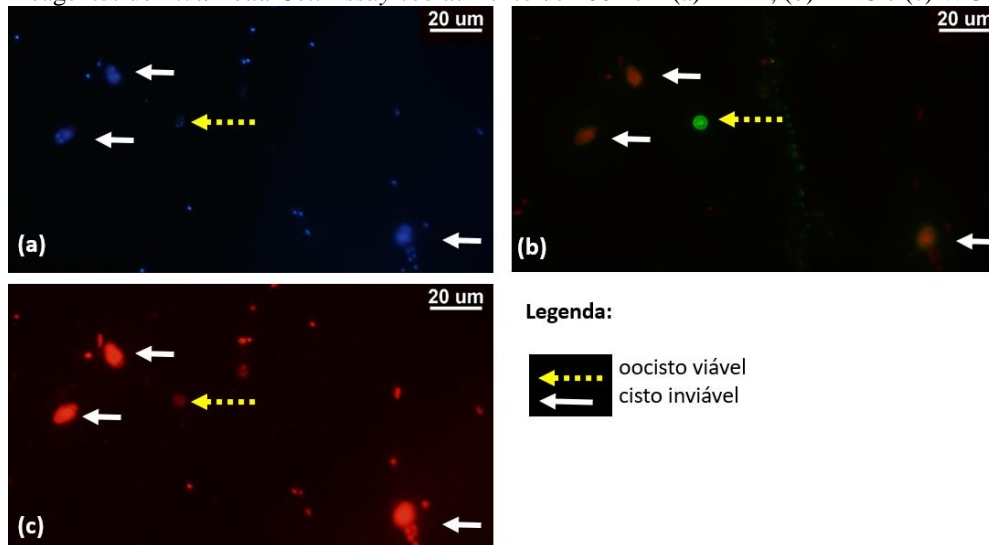
Além disso, a dificuldade analítica em avaliar a integridade da membrana de cistos de *G. muris* por meio da incorporação de corante vital vermelho também foi grande, tanto em FITC quanto em WG, pois a espécie já apresenta uma tonalidade vermelha, nos intervalos de excitação e emissão correspondentes ao FITC e WG. Na Figura 20, vê-se um cisto de *G. muris* corado de verde, mas com o interior levemente avermelhado sob o filtro FITC e pouco saturado na visualização sob WG. Este é um cisto que foi tomado como viável na contagem do procedimento A, ao contrário do indicado pela seta branca na Figura 21, que sob o filtro WG, apresenta coloração vermelha intensa e, no filtro FITC praticamente não tem coloração verde. Estes foram os critérios para a contagem dos (oo)cistos apresentados na Tabela 7. Entretanto, esta abordagem é reconhecidamente subjetiva.

Figura 20 - Cisto de *G. muris* considerado viável, mediante tratamento com reagentes Merifluor®, Fluoroshield™ com DAPI e *Live/Dead Cell Assay* sob aumento de 400x em (a) DAPI, (b) FITC e (c) WG



Fonte: Elaborado pelo autor.

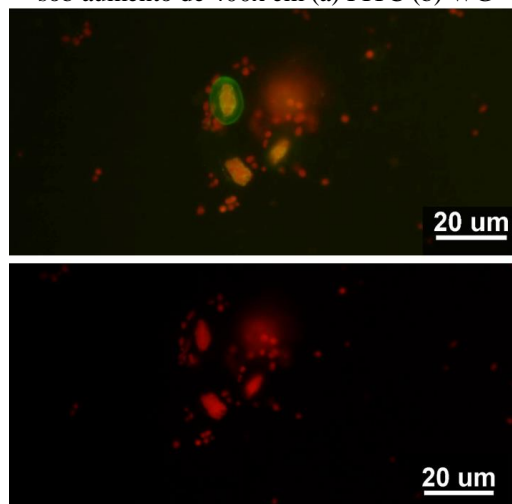
Figura 21- Cistos de *G. muris* e oocistos de *C. parvum* tratados com Merifluor®, Fluoroshield™ com DAPI e reagentes do *Live/Dead Cell Assay* sob aumento de 400x em (a) DAPI, (b) FITC e (c) WG



Fonte: Elaborado pelo autor.

A incerteza vinculada à análise é corroborada pelo apresentado na Figura 22, onde surge um suposto falso-positivo, caso o teste considerasse apenas a fluorescência sob o filtro FITC. Trata-se de um cisto de *G. muris* que, mesmo verde em FITC, ou seja, supostamente viável na análise do *Live/Dead Cell Assay*®, emitiu coloração vermelha intensa em WG, inclusive se comparado aos demais cistos contidos neste espaço.

Figura 22 - Cistos de *G. muris* tratados com Merifluor®, Fluoroshield™ com DAPI e reagentes do *Live/Dead Cell Assay* positivos para incorporação de corante impermeável à membrana e também fluorescendo em verde sob aumento de 400x em (a) FITC (b) WG



Fonte: Elaborado pelo autor.

Smith e Smith (1989) reportaram que cistos de *G. duodenalis* corados em vermelho com iodeto de propídio (IP), poderiam também apresentar fluorescência com diacetato de fluoresceína (DC). Isto pode ser devido a enzimas que permanecem ativas, mesmo em (oo)cistos que não apresentam total integridade da membrana (ROUSSEAU et al., 2018).

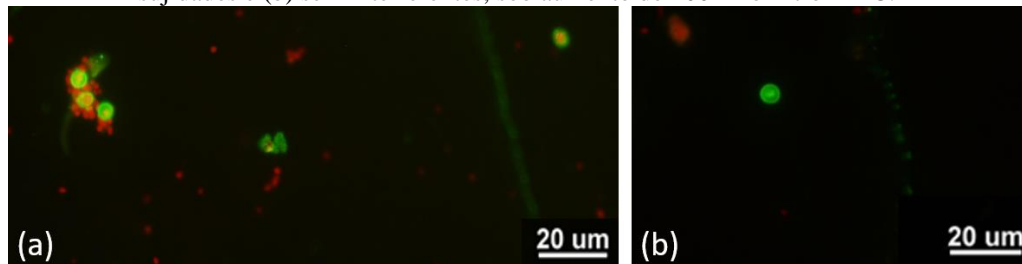
(ii) Idade das suspensões

A aquisição de (oo)cistos vivos para pesquisa envolve desafios vinculados ao período necessário para que os laboratórios fornecedores purifiquem as suspensões, bem como o transporte. Com o tempo, há decaimento de viabilidade dos (oo)cistos mesmo que estejam acondicionados devidamente, conforme é possível verificar nos laudos das suspensões (apresentados nos anexos 2 e 3). No caso da presente pesquisa, a suspensão de *Giardia muris* foi obtida com dois meses de antecedência à de *Cryptosporidium parvum*, o que permite inferir maior proporção de inviabilidade dos cistos em comparação aos oocistos.

(iii) Sujidades e interferentes nos poços de microscopia

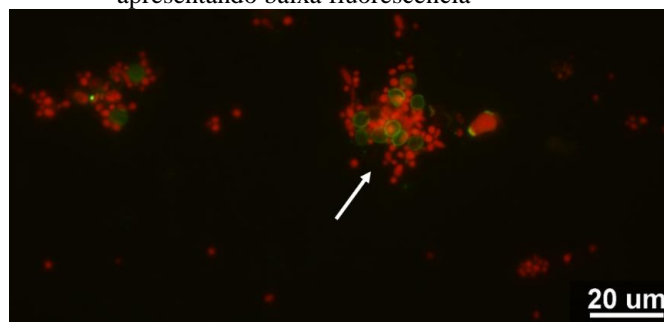
Verificado o efeito dos reagentes em *G. muris*, foram buscados oocistos de *Cryptosporidium parvum* corados de vermelho, em comparação aos verdes densamente encontrados em FITC (fosse pela ação do Merifluor® ou do corante vital), que podem ser vistos na Figura 23. Contudo, as sujidades presentes na amostra prejudicaram a visualização e, portanto, afirmações robustas (Figura 24 e Figura 25). Facilmente confundidos com interferentes, os oocistos podem ter tido sua inviabilidade subestimada, por difícil identificação, principalmente sob o filtro WG, no qual espera-se visualizar os organismos “mortos”, segundo o fabricante do kit em análise.

Figura 23 - Oocistos de *Cryptosporidium parvum* fluorescendo em verde, sendo (a) com interferência de sujidades e (b) sem interferentes, sob aumento de 400X no filtro FITC.



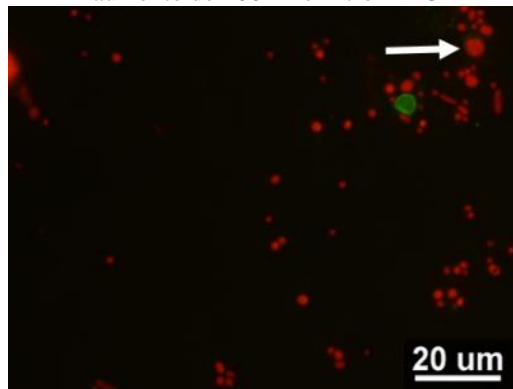
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 24- Aglomerado de oocistos de *C. parvum* ocultados por sujidades, sob aumento de 400X no filtro FITC apresentando baixa fluorescência



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 25- Oocisto viável e suposto oocisto não viável de *Cryptosporidium parvum* (assinalado pela seta), sob aumento de 400X no filtro FITC



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.1.2. Análise do procedimento B

Os oocistos de *Cryptosporidium parvum* não foram identificados sob o filtro FITC, impedindo sua quantificação. Infere-se que a dificuldade na detecção se deva à baixa fluorescência dos reagentes do *Live/Dead Cell Assay* por si só em oocistos. Esta inferência não foi registrada em imagens devido à não identificação dos oocistos pelo filtro DAPI, muito sensível à interferência das sujidades no poço de microscopia e por eles não terem sido identificados em FITC. Tal resultado corrobora Santos et al., (2015) que afirmaram que mesmo amostras frescas e intactas de (oo)cistos de *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum*, por causa de suas paredes celulares robustas (CAREY; LEE; TREVORS, 2004), podem não ser marcadas por moléculas fluorescentes, tais como CFDA-SE (diacetato éster succinimidílico de carboxifluoresceína), similar ao diacetato de carboxifluoresceína (DC). Mesmo à base de fluoresceína, reagentes de detecção como os do kit Merifluor® têm ação de superfície. No caso do teste de viabilidade *Live/Dead Cell Assay*, células supostamente vivas precisam incorporar o corante e, em seguida, metabolizá-lo para que haja a fluorescência.

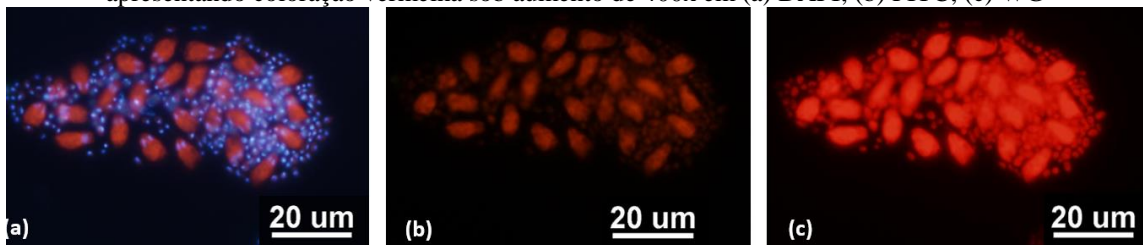
A contagem de oocistos do procedimento A pode ter sido facilitada por conta da atuação do Merifluor®. Importante salientar que os mecanismos responsáveis pela fluorescência verde em FITC são diferentes para o Merifluor® e para o *Live/Dead Cell Assay*, sendo o primeiro um reagente de detecção, que atua por meio de anticorpos monoclonais e o segundo um corante vital que fluoresce mediante ação de enzima intracelular em células ativas enzimaticamente.

A contagem de *Giardia muris* envolveu novamente dificuldade analítica devido à agregação dos cistos e sua tonalidade vermelha, inclusive em filtro DAPI, destinado a teste confirmatório por meio do destaque dos núcleos que devem ficar azuis. A Figura 26 (a) exhibe

contaminantes em azul e cistos em vermelho, sendo que nem todos estão com núcleos evidentes.

Em filtro FITC, 100% dos cistos encontrados apresentaram tonalidade avermelhada e baixa fluorescência, sem que suas paredes fossem coradas em verde, tendo também se destacado intensamente sob WG (Figura 26 b e c). Não é possível, contudo, afirmar se a alíquota continha 100% de cistos considerados não viáveis ou se os cistos de *G. muris* não floresceram por não terem incorporado ou hidrolisado o corante verde. Ainda, se isso não ocorreu devido à baixa fluorescência que emitem, conforme verificado no teste “branco” e reportado por Alderisio et al. (2017).

Figura 26- Cistos de *G. muris* tratados com Fluoroshield™ com DAPI e reagentes do *Live/Dead Cell Assay*, apresentando coloração vermelha sob aumento de 400x em (a) DAPI; (b) FITC; (c) WG



Fonte: Elaborado pelo autor.

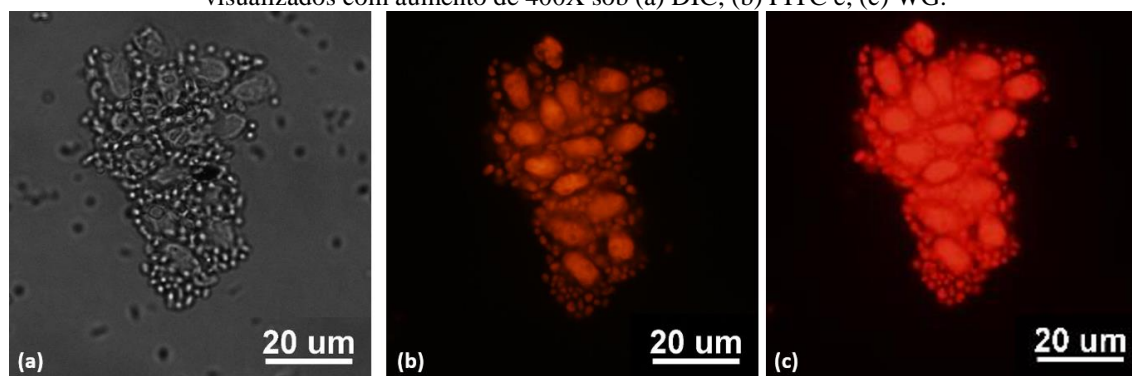
5.3.1.3. Análise do procedimento C

A análise da lâmina montada de acordo com o procedimento C permitiu a identificação de 632 cistos de *G. muris*, todos apresentando cor vermelha em FITC e intensamente corados no filtro WG, conforme pode ser verificado pela Figura 27, onde (a) exhibe a morfologia em DIC, (b) e (c) a identificação e inferência de inviabilidade dos cistos, consideravelmente agregados.

A contagem de cistos proveu um número consideravelmente acima do identificado nos demais procedimentos. Assume-se que tal fato tenha ocorrido em virtude da agregação de cistos verificada ao utilizar a suspensão pela primeira vez. Com o decorrer das análises, foram realizadas homogeneizações (com vórtex e pipeta Pasteur) com mais frequência, impedindo a formação de sedimentado na suspensão.

Novamente, não foi possível identificar oocistos na alíquota da suspensão analisada, tal como ocorreu no procedimento B. Não houve fluorescência verde ou vermelha em FITC, tampouco identificação de oocistos com incorporação de corante mediante membrana rompida sob o filtro WG.

Figura 27- Aglomerado de cistos de *Giardia muris* tratados unicamente com o reagente do *Live/Dead Cell Assay*, visualizados com aumento de 400X sob (a) DIC; (b) FITC e; (c) WG.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em uma análise geral, a utilização do *Live/Dead Cell Assay* pressupunha verificar a viabilidade por meio da identificação simultânea de “vivos” e “mortos”. Na medida em que só houve segurança de afirmar a penetração de corante vermelho em membranas danificadas, sem que o efeito verde nos (oo)cistos enzimaticamente ativos fosse identificado, o *Live/Dead Cell Assay* exerceu o mesmo mecanismo esperado para procedimentos mais engessados, tais como o uso do iodeto de propídio unicamente, sendo desinteressante, portanto, para análises de viabilidade em (oo)cistos. Além disso, a fluorescência não seletiva pode tornar-se um inconveniente em análises de amostras ambientais, que podem conter outros organismos.

5.3.2. Desempenho do iodeto de propídio (IP)

Cistos e oocistos identificados em FITC pela ação dos reagentes do kit Merifluor® foram analisados em WG para verificar a incorporação de iodeto de propídio (IP) por aqueles considerados não-viáveis. O desempenho do corante vital foi tomado como satisfatório, na medida em que um percentual dos oocistos de *Cryptosporidium parvum* inoculado nas lâminas foi visualizado como positivo para IP (não-viável), enquanto os demais oocistos excluíram o corante.

No caso de *Giardia muris* como organismo indicador na definição do desempenho do IP como corante vital, compartilhou-se da incerteza relativa aos reagentes combinados do *Live and Dead Cell Assay*. Isto, pois a espécie é de difícil identificação em FITC e 100% dos cistos encontrados apresentaram-se positivos para IP, fato incompatível com a expectativa para a idade da suspensão.

Com base na simplicidade metodológica da utilização do iodeto de propídio, já adotada em demais estudos considerando a viabilidade de protozoários em diversas matrizes

(ABELEDO-LAMEIRO et al., 2017; MEDEIROS; DANIEL, 2018), optou-se pela sua utilização para dar continuidade à presente pesquisa.

5.4. Recuperação de protozoários no lodo contendo volumes de suspensões de (oo)cistos

5.4.1. Resultados para centrifugação direta com inserção de solução de dispersão (CD + ICN 7X), seguida de separação imunomagnética (IMS)

A Tabela 8 indica o percentual de recuperação de (oo)cistos das suspensões inoculados no lodo, obtido por meio de concentração por centrifugação direta (CD) com adição de solução de dispersão detergente (ICN 7X), seguida de purificação por separação imunomagnética (IMS). Não foram identificados (oo)cistos na amostra referente ao branco, indicando a não ocorrência de protozoários autóctones na amostra, tampouco contaminações no procedimento.

O procedimento de CD + ICN 7X + IMS aplicado às suspensões de (oo)cistos no lodo não forneceu, portanto, recuperação satisfatória dentro do requerido pela USEPA (2012). Nenhum dos organismos atingiu a recuperação mínima exigida e ambos superaram o coeficiente de variação máximo delimitado pelo Método 1623.1.

Tabela 8- Recuperação de (oo)cistos na amostra de lodo submetida a CD + ICN7X + IMS, em função das dissociações ácidas.

Amostra	<i>Giardia muris</i>				<i>Cryptosporidium parvum</i>				
	Dissociações ácidas			Total	Amostra	Dissociações ácidas			Total
	1 ^a	2 ^a	3 ^a			1 ^a	2 ^a	3 ^a	
1	0	0	1	1	1	1	9	1	11
2	1	0	0	1	2	1	4	4	9
3	0	1	0	1	3	1	1	8	10
4	0	0	0	0	4	0	0	2	2
Média (n° (oo)cistos)	0,3±0,4	1	0	0,8±0,4	Média (n° (oo)cistos)	0,8±0,4	4±4	4±3	8,0±3,5
Recuperação por DA (%)	0	0	0	0,0±0,1	Recuperação por DA (%)	1	3	3	6,1±2,7
CV				57,7%	CV				44,2%

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: CD = Centrifugação direta; ICN 7X = solução de dispersão detergente; DP = desvio padrão; DA = dissociação ácida; CV = coeficiente de variação.

Nota²: O valor médio inoculado de *G. muris* foi estimado como sendo igual a 719,3±54,4 cistos 100 mL⁻¹ de lodo (alíquota de 5µL de suspensão; n=3).

O valor médio inoculado de *C. parvum* foi estimado como sendo igual a 131,3±43,3 oocistos 100 mL⁻¹ de lodo (alíquota de 10 µL de suspensão; n=3).

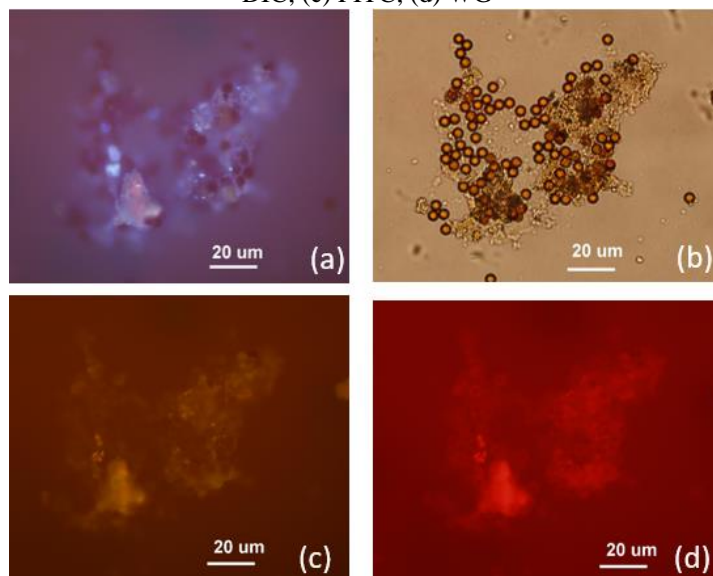
Quanto às características da matriz, cabe destacar que o lodo apresentava média de 756,67 mg L⁻¹ de sólidos totais e 538 uT de turbidez, de modo que, mesmo descartada a maior parte dos sólidos após IMS, os poços de microscopia apresentaram muitas sujidades, o que

pode ter ocultado a visualização de (oo)cistos. Matrizes complexas, como águas residuárias, lodo, dentre outras, são diferentes de amostras de água em termos de número de parasitos, bem como em sua composição e concentração de material suspenso (MCCUIN; CLANCY, 2005; ROBERTSON et al., 2000).

As sujidades (Figura 28) prejudicam principalmente a identificação de *G. muris*, visto que apresenta baixa fluorescência por si só (ALDERISIO et al., 2017). Quando se trata de uma lâmina que contém exclusivamente uma alíquota da suspensão de cistos, a identificação é mais clara, em comparação a uma situação em que a densidade de cistos é pequena e há interferentes. Além disso, o iodeto de propídio (IP) adicionado à lâmina para estimativa de viabilidade colabora com este “tingimento” marrom/avermelhado dos interferentes (item (c) da Figura 28).

Ainda, a suspensão de *Giardia muris* já estava apresentando aglomerados e possível contaminação por fungos. Existe a possibilidade de que estes aglomerados tenham prejudicado a ação dos anticorpos presentes no kit Dynabeads®, impedindo sua ligação com os cistos. A visualização das lâminas em DIC (imagem (b) da Figura 28) permitiu a identificação de esferas magnéticas e, próximo a elas, aglomerados não identificáveis o que poderia constituir sujidades, cistos, fungos, dentre outros.

Figura 28- Sujidades e esferas magnéticas prejudicando a visualização de (oo)cistos após primeira dissociação ácida e recuperação com CD + ICN 7X seguida de IMS. Visualização com aumento de 400x em: (a) DAPI; (b) DIC; (c) FITC; (d) WG



Fonte: Elaborado pelo autor.

Quanto à recuperação insuficiente de *C. parvum*, assume-se que o fato esteja relacionado à baixa densidade de oocistos na suspensão. O volume de inóculo havia sido maior em comparação ao de *G. muris*, e, mesmo assim, a contagem dos poços da suspensão

rendeu um valor menor do que 500 oocistos. Utilizou-se um volume de 5 μL de suspensão de *Giardia muris* e 10 μL de *Cryptosporidium parvum*. O número de oocistos foi consideravelmente menor do que de cistos de *Giardia muris*, o que pode ter afetado a recuperação dos mesmos após a concentração das amostras com inóculo. Diz-se isto, pois se entende que, proporcionalmente, quanto maior o número de organismos inoculados na matriz, maior a possibilidade de recuperá-los (ASSAVASILAVASUKUL et al., 2008).

Além destes fatores, é relevante considerar que a matriz em estudo, isto é, o lodo adensado, apresentava uma concentração de 97,8 mg L^{-1} de ferro. A presença deste metal pode prejudicar o desempenho da IMS, conforme determinado por Yakub e Stadterman-Knauer (2000), os quais, em um estudo visando a recuperação de *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia* por separação imunomagnética em matrizes contendo várias concentrações de ferro dissolvido, determinaram que os níveis de recuperação diminuiriam acentuadamente nas concentrações de ferro dissolvido superiores a 4 mg L^{-1} para *C. parvum* e 40 mg L^{-1} para *G. duodenalis*.

Como exemplo de demais trabalhos que concentraram lodo de estação de tratamento de água obtido por meio de ensaios de jarreste com água de estudo e inóculo de suspensões de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., pode-se citar Ogura, (2018), que atendeu ao requisito da USEPA (2012) para a recuperação de cistos, na medida em que o método CD + ICN 7X + IMS proveu 16,98% de recuperação de *Giardia* spp. com coeficiente de variação (CV) de 22,22%, com resultados em triplicata. A recuperação de oocistos, no entanto, foi aquém do requisito do Método 1623.1 (USEPA, 2012), sendo igual a 13,45% (CV = 26,42%, n = 3). Utilizando também CD + ICN 7X + IMS em matriz de lodo de ETA por flotação (obtido por meio de água de estudo e também suspensões de (oo)cistos, Silva (2018) obteve recuperações que atenderam às exigências da USEPA (2012). A recuperação de *Giardia* spp. foi de 32,54% (CV = 29,53%, n = 3) e de 8,16% (CV = 11,01%, n = 3) para *Cryptosporidium* spp.. Estes resultados corroboram o fato de que o ferro dissolvido constituiu fator interferente na purificação por IMS, na medida em que a água de estudo gerada por Ogura (2018) e Silva (2018), mesmo tendo sido tratada com policloreto de alumínio (PAC), não possuía ferro em sua composição, gerando lodos com características diferentes daquele proveniente do tratamento da água do Rio Monjolinho, estudado no presente trabalho.

5.4.2. Resultados obtidos por CD + ICN7X + IMS com etapa de remoção de partículas magnéticas

A Tabela 9 indica a recuperação de cistos e oocistos nas amostras de lodo inoculadas com volumes de suspensão, submetidas à concentração por centrifugação direta (CD), seguida de purificação por separação imunomagnética (IMS) com adição de solução de dispersão detergente ICN 7X (MP BIO®) a 1%, tendo ocorrido prévia remoção de partículas magnéticas. As recuperações obtidas não atenderam ao critério do Método 1623.1 (USEPA, 2012) para *Giardia muris*, tampouco para *Cryptosporidium parvum*.

Tabela 9- Recuperação de (oo)cistos na amostra de lodo submetida a remoção de sais metálicos pelo MPCTM-1, seguida de CD + ICN7X + IMS, em função das dissociações ácidas.

Amostra	<i>Giardia muris</i>				Total	Amostra	<i>Cryptosporidium parvum</i>			
	Dissociações ácidas			Total			Dissociações ácidas			Total
	1 ^a	2 ^a	3 ^a				1 ^a	2 ^a	3 ^a	
1	3	0	0	3	1	169	11	13	193	
2	0	0	0	0	2	85	9	5	99	
3	1	0	0	1	3	108	24	3	135	
4	0	0	0	0	4	68	24	9	101	
Média (n° (oo)cistos)	1	0	0	1	Média (n° (oo)cistos)	107,5	17	7,5	132	
DP	1,22	0,00	0,00	1,22	DP	38,24	7,04	3,84	38,01	
Recuperação por DA (%)	0	0	0	0±0,07	Recuperação por DA (%)	25	4	2	30±8,78	
CV				>100%	CV				28,79%	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: CD = Centrifugação direta; ICN 7X = solução de dispersão detergente; DP = desvio padrão; DA = dissociação ácida; CV = coeficiente de variação.

Nota²: O valor médio inoculado de *G. muris* foi estimado como sendo igual a 1640±218 cistos.100mL⁻¹ de lodo (alíquota de 10µL de suspensão; n=3).

O valor médio inoculado de *C. parvum* foi estimado como sendo igual a 433±102 oocistos.100mL⁻¹ de lodo (alíquota de 35 µL de suspensão; n=3).

Apesar da recuperação insatisfatória para *C. parvum* (30±8,78%), houve aumento em comparação ao procedimento que não incluiu a remoção de partículas magnéticas utilizando o MPCTM-1 (6,1±3,5%). Com isso, fica evidente a necessidade de realizar este procedimento para matrizes como o lodo de estações de tratamento de água (ETAs), em que haja sais metálicos que possam afetar o desempenho da IMS, a qual é baseada no acoplamento de macromoléculas a óxido de ferro (Fe₃O₄) superparamagnético (AUSTIN; PAGOTTO, 2003).

5.4.3. Resultados da concentração por floculação em carbonato de cálcio (FCCa)

A Tabela 10 indica a recuperação de cistos e oocistos nas amostras de lodo inoculadas com volumes de suspensão, submetidas à concentração por floculação em carbonato de cálcio (FCCa), sem que houvesse purificação. A recuperação média obtida não atendeu ao critério

do Método 1623.1 (USEPA, 2012), para nenhum dos microrganismos nas amostras concentradas submetidas à reação de imunofluorescência direta (RID), além de o coeficiente de variação ter superado o valor máximo exigido.

Tabela 10 - Recuperação de (oo)cistos em amostras de lodo submetida a FCCa sem etapa de purificação

Amostra	<i>Giardia muris</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
1	1	14
2	1	6
3	0	1
4	0	7
Média±DP (nº (oo)cistos)	0,50±0,50	7,00±4,65
Recuperação média (%)	0,27±0,27	12±7,95
CV (%)	100	66,24

Fonte: Elaborado pelo autor.

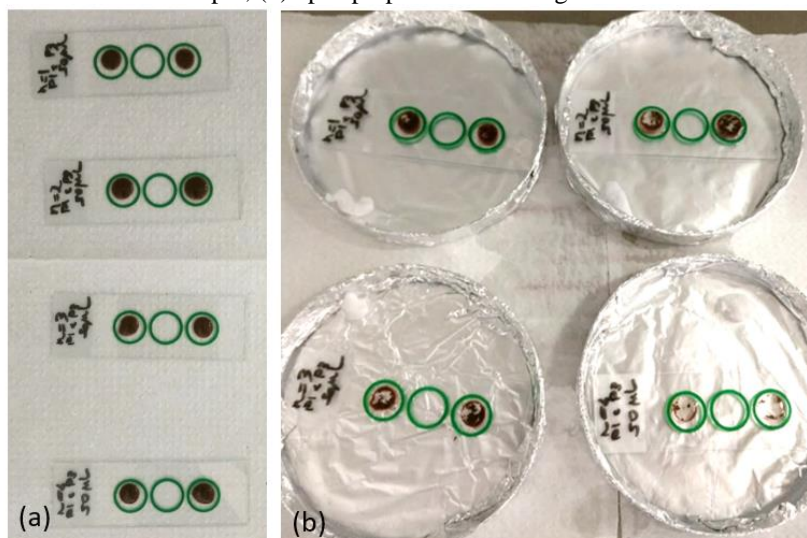
Nota: DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Nota²: O valor médio inoculado de *G. muris* nas amostras de lodo foi estimado como sendo igual a 1853±197 cistos.100mL⁻¹ de lodo (alíquota de 10µL de suspensão; n=3). O valor médio inoculado de *C. parvum* nas amostras de lodo foi estimado como sendo igual a 583±164 oocistos.100 mL⁻¹ de lodo (alíquota de 30 µL de suspensão; n=3).

Ao avaliar métodos de floculação para a concentração de *Cryptosporidium parvum* em amostras de água potável (turbidez menor que 1 uT) onde foram inoculados 2,5 x 10⁵ oocistos L⁻¹, Karanis e Kimura (2002) obtiveram recuperação de 38,8% (±12,1%) utilizando o carbonato de cálcio. Também utilizando água de estudo (54,8 uT), porém com inóculo de (oo)cistos marcados provenientes de kits comerciais certificados pelo Método 1623.1 da USEPA (2012), Andreoli e Sabogal-Paz (2017) obtiveram recuperações satisfatórias para cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp., sendo que a recuperação dos oocistos foi superior a de *Giardia* spp., independente do protocolo testado.

No caso da presente matriz, contudo, houve influência da dificuldade de visualização intrínseca a *G. muris* (ALDERISIO et al., 2017) e alta turbidez do lodo (538 uT). Isto pode ser verificado na Figura 29, que exhibe o aspecto das lâminas de microscopia imediatamente após o inóculo das alíquotas da amostra concentrada (a) e depois do preparo com os reagentes do kit Merifluor®, DAPI e FluoroshieldTM e iodeto de propídio (IP). Ademais, é possível observar que há perda de amostra, em função das lavagens durante o preparo da lâmina para RID e, além disso, os poços de microscopia apresentam quantidade expressiva de sujidades, que comprometem a identificação de (oo)cistos durante a análise em microscópio. Este fato indicou a necessidade de adicionar a etapa de purificação.

Figura 29- Alíquotas de lodo concentrado por FCCa sem etapa de purificação: (a) recém-inoculadas no poço de microscopia; (b) após preparo com os reagentes de RID



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4.4. Resultados para FCCa + IMS com prévia remoção de partículas magnéticas

O acréscimo da purificação por separação imunomagnética (IMS) promoveu aumento na recuperação de cistos de *Cryptosporidium parvum* ($11\% \pm 2,02$) nas amostras de lodo inoculadas com suspensão, conforme indicado na Tabela 11. Contudo, a exigência do Método 1623.1 (USEPA, 2012), i. e. acima de 32%, não foi atingida. Quanto à *Giardia muris*, manteve-se a ausência de recuperação, justificada novamente pela sua dificuldade de identificação refletir em recuperação insatisfatória. Os resultados são apresentados com mais detalhes na Tabela 11 em função do número de (oo)cistos identificados em cada dissociação ácida.

Os resultados foram contrários ao esperado, com base em estudo similar realizado por Giglio e Sabogal-Paz, (2018) utilizando lodo proveniente de ensaios jarreste para tratamento de água simulada com alta turbidez. No referido trabalho, houve recuperação de $60,2 \pm 26,2\%$ de oocistos e $46,1 \pm 5\%$ de cistos previamente inoculados, valor consideravelmente maior do que o obtido na presente pesquisa. Cabe ressaltar que o lodo proveniente de água natural apresenta características físico-químicas que diferem da água sintética, podendo haver interferentes nas análises. Tal diferença de resultados corrobora a necessidade de investigação do método mais adequado para a recuperação de protozoários em matrizes complexas.

Tabela 11- Recuperação de (oo)cistos na amostra de lodo submetida a FCCa + IMS, em função das dissociações ácidas.

Amostra	<i>Giardia muris</i>				<i>Cryptosporidium parvum</i>				
	Dissociações ácidas			Total	Amostra	Dissociações ácidas			Total
	1 ^a	2 ^a	3 ^a			1 ^a	2 ^a	3 ^a	
1	2	1	0	3	1	69	17	19	105
2	2	0	0	2	2	95	31	1	127
3	2	1	0	3	3	50	32	6	88
4	1	0	3	4	4	93	36	13	142
Média (nº (oo)cistos)	1,75	0,50	0,75	3,00	Média (nº (oo)cistos)	76,75	29,00	9,75	115,50
DP	0,43	0,50	1,30	0,71	DP	18,52	7,18	6,83	20,62
Recuperação por DA (%)	0	0	0	0,16±0,04	Recuperação por DA (%)	7	3	1	11,27±2,01
CV	23,57%				CV	17,85%			

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: FCCa = Flocculação em carbonato de cálcio; IMS = separação imunomagnética; DP = desvio padrão; DA = dissociação ácida; CV = coeficiente de variação.

Nota²: O valor médio inoculado de *G. muris* foi estimado como sendo igual a 1837±36 cistos.100mL⁻¹ de lodo (alíquota de 10µL de suspensão; n=3).

O valor médio inoculado de *C. parvum* foi estimado como sendo igual a 1025±243 oocistos.100mL⁻¹ de lodo (alíquota de 35 µL de suspensão; n=3).

5.4.5. Resultados para flocculação com Fe₂(SO₄)₃ + IMS

A Tabela 12 indica a recuperação de cistos e oocistos na amostra de lodo submetida à concentração por flocculação em sulfato férrico (Fe₂(SO₄)₃) seguida de purificação por separação imunomagnética (IMS), em função das dissociações ácidas (DAs). O protocolo de Fe₂(SO₄)₃ + IMS aplicado atendeu, portanto, ao requisito do Método 1623.1 (USEPA, 2012) para *Cryptosporidium* spp.. Os resultados foram satisfatórios tanto em termos de recuperação quanto no coeficiente de variação (CV), apresentando recuperação de 91±31,1%.

A recuperação para *C. parvum* superou o descrito na literatura para matrizes mais simples. No caso, Karanis e Kimura (2002), ao avaliarem métodos de flocculação para a concentração de *Cryptosporidium parvum* em amostras de água, obtiveram recuperação de 61,5% (±2,0%) utilizando o sulfato férrico sem etapa de purificação.

No que tange aos cistos, apesar de o coeficiente de variação deste procedimento ter atendido às exigências do Método, a recuperação foi de 6±2,1%, sendo que a mínima requerida é de 8% para *Giardia*. Contudo, tratando-se de inóculo com *G. muris*, que apresenta dificuldades de visualização intrínsecas à baixa fluorescência da espécie (ALDERISIO et al., 2017), bem como às particularidades da matriz em análise, os resultados apresentaram-se interessantes para *Giardia* spp. em geral. Detalhes da Figura 30 permitem verificar como os cistos de *G. muris* são facilmente confundidos com sujidades e como a baixa fluorescência da parede os torna visualmente menores em comparação ao esperado para cistos de *Giardia* spp, independente da espécie. Em outras palavras, diante da dificuldade em detectar *G. muris*

como organismo alvo, um método capaz de fazê-lo, mesmo em matriz complexa, tende a evitar que a presença de cistos seja subestimada por conta de baixa fluorescência e demais interferentes.

Tabela 12- Recuperação de (oo)cistos na amostra de lodo submetida a $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ seguida de IMS, em função das dissociações ácidas.

Amostra	<i>Giardia muris</i>				Amostra	<i>Cryptosporidium parvum</i>			
	Dissociações ácidas			Total		Dissociações ácidas			Total
	1 ^a	2 ^a	3 ^a			1 ^a	2 ^a	3 ^a	
1	42	1	2	45	1	729	107	28	864
2	94	5	0	99	2	977	104	11	1092
3	101	17	3	121	3	1917	93	3	2013
4	94	7	18	119	4	1078	34	43	1155
Média (n° (oo)cistos)	82,75	7,50	5,75	96	Média (n° (oo)cistos)	1175,25	84,5	21,25	1281
DP	23,70	5,89	7,15	30,68	DP	446,68	29,62	15,47	436,27
Recuperação por DA (%)	6±1,6	1±0,4	0±1,5	6,44±2,06	Recuperação por DA (%)	84±31,8	6±2,1	2±1,1	91,20±31,06
CV				31,95%	CV				34,05%

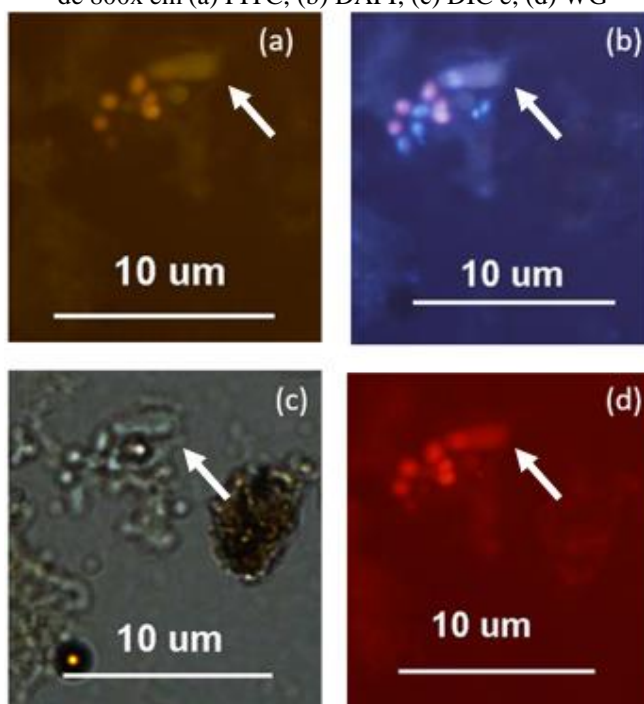
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ = sulfato férrico; IMS = separação imunomagnética; DP = desvio padrão; DA = dissociação ácida; CV = coeficiente de variação.

Nota²: O valor médio inoculado de *G. muris* foi estimado como sendo igual a 1491 ± 170 cistos 100mL^{-1} de lodo (alíquota de $10\mu\text{L}$ de suspensão; $n=3$).

O valor médio inoculado de *C. parvum* foi estimado como sendo igual a 1404 ± 208 oocistos 100mL^{-1} de lodo (alíquota de $35\mu\text{L}$ de suspensão; $n=3$).

Figura 30- Cisto de *Giardia muris* recuperado do lodo submetido à $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ + IMS, visualizado com aumento de 800x em (a) FITC; (b) DAPI; (c) DIC e; (d) WG



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4.6. Resultados para floculação com $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ +IMS

A Tabela 13 indica a recuperação de cistos e oocistos nas amostras de lodo submetidas à floculação com sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) seguida de purificação por separação imunomagnética (IMS), em função das dissociações ácidas (DAs). As recuperações não atenderam às exigências do Método 1623.1 (USEPA, 2012) para nenhum dos protozoários em análise e apresentaram-se aquém dos resultados de Karanis e Kimura (2002) que, aplicando o sulfato de alumínio para a concentração de *Cryptosporidium parvum* inoculados em amostras de água, obtiveram recuperação de 58,1% ($\pm 17,0\%$).

Entretanto, cabe ressaltar que as recuperações de *G. muris*, tal como ocorrido com a concentração com $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ apresentaram aumento em relação aos demais procedimentos aplicados. Pode-se afirmar que as floculações ácidas apresentaram esta particularidade.

Tabela 13 - Recuperação de (oo)cistos na amostra de lodo submetida a $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ seguida de IMS, em função das dissociações ácidas

Amostra	<i>Giardia muris</i>				Amostra	<i>Cryptosporidium parvum</i>			
	Dissociações ácidas			Total		Dissociações ácidas			Total
	1 ^a	2 ^a	3 ^a		1 ^a	2 ^a	3 ^a		
1	51	14	0	65	1	44	4	1	49
2	52	58	0	110	2	204	12	0	216
3	61	48	5	114	3	25	57	2	84
4	41	18	3	62	4	47	9	5	61
Média (nº (oo)cistos)	51,25	34,50	2,00	87,75	Média (nº (oo)cistos)	80	20,5	2	102,5
DP	7,08	18,89	2,12	24,31	DP	72,09	21,27	1,87	66,73
Recupe- ração por DA (%)	2	2	0	4,24 \pm 1,18%	Recupe- ração por DA (%)	18	5	0	22,98 \pm 14,96 %
CV	27,8%				CV	65,1%			

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ = sulfato de alumínio; IMS = separação imunomagnética; DP = desvio padrão; DA = dissociação ácida; CV = coeficiente de variação.

Nota²: O valor médio inoculado de *G. muris* foi estimado como sendo igual a 2069 \pm 49 cistos 100mL⁻¹ de lodo (alíquota de 10 μ L de suspensão; n=3).

O valor médio inoculado de *C. parvum* foi estimado como sendo igual a 446 \pm 104 oocistos 100mL⁻¹ de lodo (alíquota de 35 μ L de suspensão; n=3).

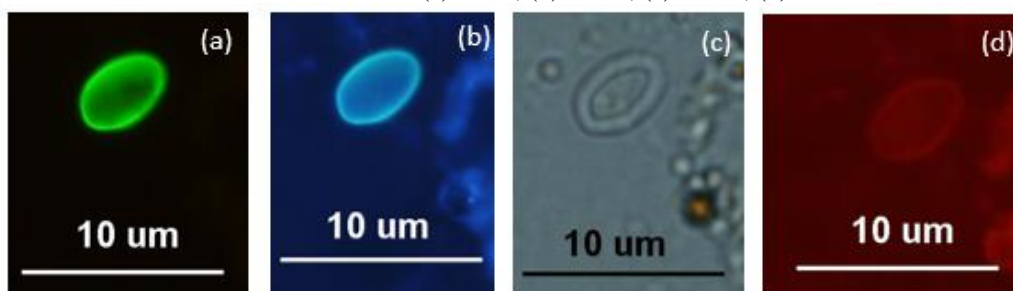
Neste ensaio, houve a visualização de dois cistos de *Giardia* sp., os quais foram considerados autóctones à matriz, isto é, provenientes da amostra de lodo gerada em escala de bancada a partir do tratamento da água do Córrego Monjolinho. Estes cistos foram encontrados na segunda dissociação ácida em uma das repetições do procedimento (n=2, 2^a DA, Figura 31).

A possibilidade de contaminação cruzada foi excluída com base no fato de que não estava ocorrendo inóculo de outras espécies que não fossem *G. muris* nas atividades

laboratoriais paralelas ao teste, apenas com ColorSeed™, o qual apresenta cistos marcados permanentemente com o corante Texas Red®, que fluoresce em vermelho quando submetido ao filtro WG, o que não ocorreu com os cistos encontrados.

A presença de cistos detectados no lodo proveniente de tratamento e adensado por gravidade reiteram, portanto, a necessidade de detecção de protozoários nesta matriz, bem como o tratamento da mesma, visando identificar o risco sanitário a ela associado, tema deste trabalho.

Figura 31- Cisto de *Giardia* sp. recuperado do lodo submetido à $Al_2(SO_4)_3$ + IMS, visualizado com aumento de 800x em (a) FITC; (b) DAPI; (c) DIC e; (d) WG



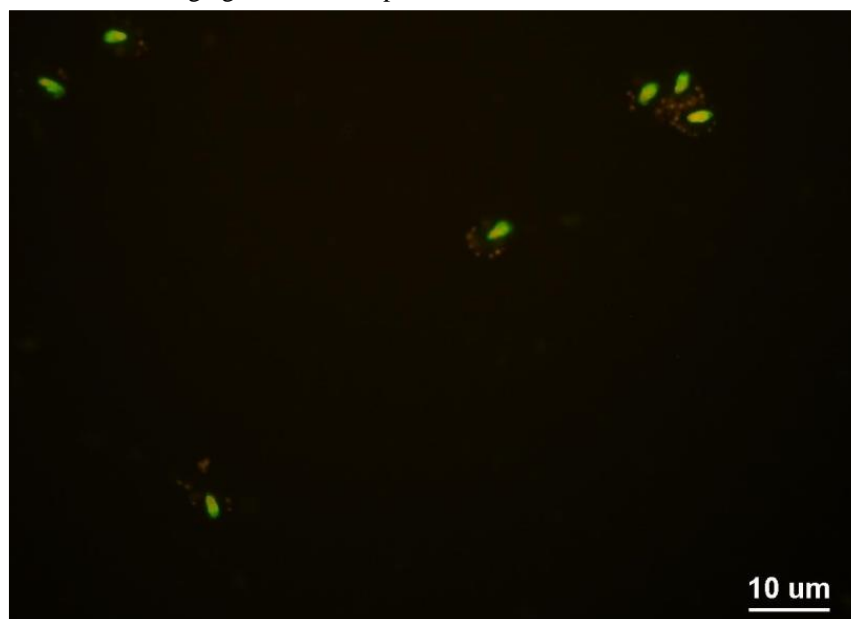
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4.7. Análise do efeito do tampão de lise sobre cistos de *Giardia muris*

Os resultados obtidos para a recuperação de *Giardia muris* nos procedimentos de floculação com sulfato férrico e sulfato de alumínio incentivaram a investigação do efeito do tampão ácido sobre os cistos previamente agregados, na medida em que os demais protocolos não permitiram nenhuma recuperação para tal organismo e a etapa de lise ácida constituía fator diferencial, ao comparar os procedimentos estudados. Estimou-se, dessa forma, que a melhor recuperação de *G. muris*, especificamente, na matriz tenha se devido à acidificação da amostra (contato com solução de lise tamponada em 4,7 por 1 h).

O resultado deste procedimento indicou que os cistos da suspensão de *G. muris*, previamente aglomerados, foram desagregados pela ação do tampão ácido (Figura 32) o que os tornou susceptíveis à aderência dos anticorpos do kit Dynabeads™. Tratando-se de um procedimento seletivo de ligação, o modo como o anticorpo se adere ao organismo alvo é de direta importância na eficiência de recuperação (ZARLENGA; TROUT, 2004). Com isso, infere-se que o procedimento de separação imunomagnética (IMS) para os cistos de *G. muris* foi viabilizado, contribuindo com o aumento da recuperação se comparada aos demais métodos estudados.

Figura 32 - Cistos de *G. muris* desagregados com tampão ácido, visualizados sob aumento de 400x em FITC



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4.8. Análise estatística dos métodos de recuperação aplicados para o lodo

A Tabela 14 apresenta um resumo dos resultados de recuperação de protozoários de suspensões comerciais inoculados no lodo, em comparação aos requisitos do Método 1623.1 (USEPA, 2012). Comparando-se os procedimentos aplicados, verificou-se que a remoção de partículas magnéticas antes da purificação (IMSmag) contribuiu para a recuperação de oocistos de *Cryptosporidium parvum*, tendo sido empregada em todos os demais métodos que incluíram separação imunomagnética (IMS).

O procedimento de floculação em carbonato e cálcio (FCCa), seguido ou não de IMS, foi insuficiente na recuperação de cistos e oocistos, considerando-se o requisito do Método 1623.1 (USEPA, 2012). A inclusão da etapa de purificação reduziu o coeficiente de variação (CV) para *C. parvum*, mas não contribuiu com a recuperação de organismos. A análise estatística realizada posteriormente (Tabela 15) não contemplou FCCa sem purificação, levando em consideração questões operacionais abordadas no item 5.4.3, que indicaram que a ausência de IMS no lodo prejudica a análise em microscopia.

Além disso, a recuperação de *Giardia muris* não se aproximou do exigido em nenhum dos métodos. As floculações de caráter ácido, contudo, apresentaram recuperação de *G. muris*, (mesmo que abaixo do critério da USEPA (2012), o que indicou um diferencial proporcionado pela etapa de lise ácida, conforme identificado no item 5.4.7.

Tabela 14 - Recuperação de cistos e oocistos de suspensões inoculadas em lodo, em função do método aplicado

Método de recuperação	<i>Giardia muris</i>		<i>Cryptosporidium parvum</i>	
	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)
CD+ICN7X + IMS	0,00±0,06	57,70	6,09±2,69	44,20
CD+ICN7X + IMSmag	0,00±0,07	>100%	30,00±8,78	28,79
FCCa	0,27±0,27	100,00	12,00±7,95	66,24
FCCa + IMS	0,16±0,04	23,57	11,27±2,01	17,85
Fe ₂ (SO ₄) ₃ +IMS	6,44±2,06	31,95	91,20±31,06	34,05
Al ₂ (SO ₄) ₃ +IMS	4,24±1,18	27,80	22,98±14,96	65,10
Método 1623.1 (USEPA, 2012)	<i>Giardia spp.</i>		<i>Cryptosporidium spp.</i>	
	8 - 100	≤39	32 - 100	≤37

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: CD = Centrifugação direta; ICN 7X = solução de dispersão detergente; IMS = separação imunomagnética (IMSmag indica a inclusão de etapa de remoção de partículas magnéticas, a partir da qual todos os procedimentos de IMS passaram a incluir); FCCa = Flocculação em carbonato de cálcio; Al₂(SO₄)₃ = Flocculação com sulfato de alumínio; Fe₂(SO₄)₃ = Flocculação com sulfato férrico.

Os resultados de recuperação obtidos apresentaram distribuição normal, visto que, ao serem agrupados para teste Shapiro-Wilk, apresentaram valores de $P > 0,05$. Isto permitiu a aplicação do teste t de Student.

A Tabela 15 apresenta os valores de P (teste t de Student) obtidos para os agrupamentos de todos os procedimentos realizados para recuperação de oocistos no lodo. No caso, apresentou-se apenas a análise para os resultados de *Cryptosporidium parvum*, pois os dados de *Giardia muris* não foram consistentes operacionalmente, havendo, inclusive, métodos que não apresentaram recuperação (Tabela 14).

Tabela 15 - Comparação dos métodos de recuperação de oocistos em lodo por análise estatística (teste t em que $P < 0,05$ foi considerado significativo).

Métodos analisados	Valor P
FCCa + IMS vs CD+ICN7X + IMS	0,538
FCCa + IMS vs Fe ₂ (SO ₄) ₃ +IMS	0,019
FCCa + IMS vs Al ₂ (SO ₄) ₃ +IMS	0,763
CD+ICN7X + IMS vs Fe ₂ (SO ₄) ₃ +IMS	0,020
CD+ICN7X + IMS vs Al ₂ (SO ₄) ₃ +IMS	0,535
Fe ₂ (SO ₄) ₃ +IMS vs Al ₂ (SO ₄) ₃ +IMS	0,019

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: FCCa = Flocculação em carbonato de cálcio; CD = Centrifugação direta; ICN 7X = solução de dispersão detergente; IMS = separação imunomagnética (todas realizadas com etapa de remoção de partículas magnéticas); Al₂(SO₄)₃ = Flocculação com sulfato de alumínio; Fe₂(SO₄)₃ = Flocculação com sulfato férrico.

Com base no valor de P , verificou-se que houve diferença significativa entre as médias das recuperações por FCCa + IMS em comparação a Fe₂(SO₄)₃+IMS, CD+ICN7X + IMS e Fe₂(SO₄)₃+IMS, bem como Fe₂(SO₄)₃+IMS e Al₂(SO₄)₃+IMS. No caso, a flocculação com sulfato férrico foi comum a estas análises comparativas com $P < 0,05$, sendo, portanto, estatisticamente significativa. Além disso, apresentou a maior recuperação percentual de

oocistos (item 5.4.5), tendo sido o método selecionado para a realização do teste de qualidade analítica utilizando ColorSeed™.

5.5. Recuperação de protozoários no lodo com ColorSeed™ por $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ + IMS

A Tabela 16 indica os resultados obtidos no teste de qualidade analítica do método de recuperação por floculação com sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) seguida de separação imunomagnética (IMS), considerando o inóculo com ColorSeed™. Pode-se observar que as exigências do Método 1623.1 (USEPA, 2012) foram atendidas para *Giardia spp.*, mas não foram suficientes na recuperação de *Cryptosporidium spp.*, fosse em termos de coeficiente de variação ou de recuperação total.

Tabela 16 - Recuperação de (oo)cistos provenientes de ColorSeed™ em amostras de lodo com floculação em $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ seguida de IMS, em função das dissociações ácidas.

Amostra	<i>Giardia spp.</i>				Total	Amostra	<i>Cryptosporidium spp.</i>			
	Dissociações ácidas			Total			Dissociações ácidas			Total
	1 ^a	2 ^a	3 ^a				1 ^a	2 ^a	3 ^a	
1	28	12	0	40	1	11	3	3	17	
2	18	9	6	33	2	1	4	3	8	
3	14	14	8	36	3	4	4	7	15	
4	13	18	1	32	4	2	1	1	4	
Média (nº (oo)cistos)	18,25	13,25	3,75	35,25	Média (nº (oo)cistos)	4,5	3	3,5	11	
DP	5,93	3,27	3,34	3,11	DP	3,91	1,22	2,18	5,24	
Recuperação por DA (%)	18,25	13,25	3,75	35,25%	Recuperação por DA (%)	4,50	3,00	3,5	11,00%	
CV				9,00%	CV				47,67%	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ = sulfato férrico; IMS = separação imunomagnética; DP = desvio padrão; DA = dissociação ácida; CV = coeficiente de variação.

A recuperação de *Giardia spp.* ter atendido ao critério da USEPA (2012) corrobora que a baixa fluorescência de *G. muris* (ALDERISIO et al. 2017) pode ter refletido em baixa recuperação nos testes que utilizaram suspensões comerciais. Com relação ao obtido para inóculo com *Cryptosporidium parvum* (item 5.4.5), em comparação aos oocistos de *Cryptosporidium spp.*, a recuperação foi reduzida em 80%, mesmo tendo sido reproduzido o protocolo de concentração e purificação para avaliar a qualidade analítica. A diferença de resultados pode ser relacionada à ordem de grandeza do inóculo, capaz de afetar o potencial de recuperação dos oocistos. Karanis e Kimura (2002) aplicando $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ sem purificação por IMS, identificaram redução na recuperação, conforme o inóculo de oocistos foi alterado de 1×10^6 para $2,5 \times 10^5$ e 1×10^5 , tendo sido recuperados 68,1, 61,5 e 47,0%, respectivamente.

Houve também investigação para entrada de 5×10^2 oocistos, porém alterou-se o protocolo de contagem de organismos.

Quanto à purificação, cabe mencionar que, apesar de aumentar os custos e a complexidade experimental, a inclusão de terceira dissociação ácida pode contribuir para a validação do protocolo testado. Em análises com água tratada por ciclo completo com flotação, em escala de bancada, Andreoli e Sabogal-Paz (2017) identificaram que a terceira dissociação ácida aumentou a recuperação de cistos em 8% e de oocistos em 14,2%. No presente trabalho, considerar a terceira dissociação acresceu a recuperação de *Giardia spp.* em 3,75% e de *Cryptosporidium spp.* em 3,50% nas amostras de lodo testadas.

Não foram encontrados (oo)cistos na amostra referente ao branco, o que indica que não houve contaminações cruzadas durante o teste, tampouco a possibilidade de ocorrência de protozoários provenientes da matriz. Tal fato é corroborado pela visualização dos (oo)cistos em WG, em que todos os (oo)cistos apresentaram-se corados em vermelho (proveniente da marcação permanente com Texas Red® do ColorSeed™).

5.6. Recuperação de protozoários na água de lavagem de filtros (ALF), contendo volumes de suspensões de (oo)cistos

Os resultados são apresentados a seguir em função do método aplicado.

5.6.1. Resultados obtidos por FM + raspagem com Tween® 80 (0,1%, 45°)

A recuperação de protozoários da ALF por meio de filtração seguido de raspagem das membranas com Tween® aquecido a 45°C é apresentada na Tabela 17. Considerando-se o Método 1623.1 (USEPA, 2012), foi alcançada a recuperação média percentual mínima exigida para ambas as espécies, contudo, os coeficientes de variação ultrapassaram o aceitável.

Cabe observar que a recuperação média de *Cryptosporidium parvum* (visualização na Figura 33) apresentou o valor de 100%, mesmo não tendo sido identificado valor aproximado do número de (oo)cistos inoculados (também tratado com base em valor médio determinado em triplicata). Este resultado reflete a imprecisão da adoção de coeficientes de multiplicação, pois, mesmo tendo sido utilizado o volume concentrado de 0,5 mL para retirada da alíquota para microscopia, o sedimento em si apresentava volume menor, não identificável no tubo de centrífuga. Deste modo, a razão entre o volume da alíquota e do concentrado também consiste em uma estimativa que, no presente caso, pode ter superestimado o cálculo.

Tabela 17 - Recuperação de (oo)cistos na amostra de ALF submetida a FM sem etapa de purificação

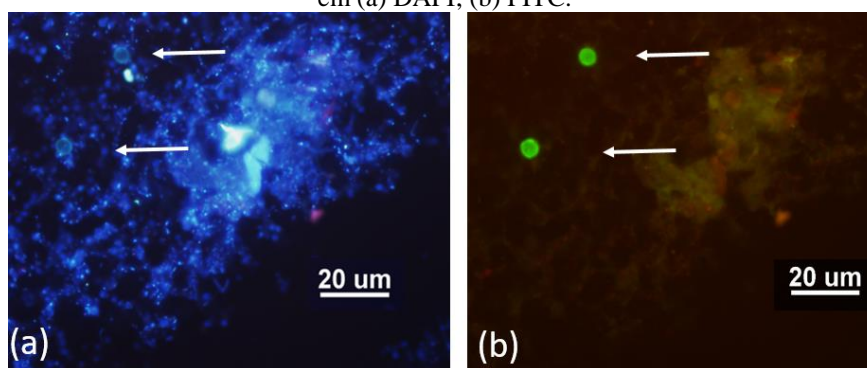
Amostra	<i>Giardia muris</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
1	80	228
2	42	65
3	36	112
4	33	104
Média±DP (n° (oo)cistos)	47,75±18,90	127,27±60,82
Recuperação média (%)	17,36±6,87	100±49,18
CV (%)	39,58	47,80

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: ALF = água de lavagem de filtros; FM = filtração em membrana; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Nota²: O valor médio inoculado de *G. muris* em 1000 mL de ALF foi estimado como sendo igual a 1375±218 cistos.1L⁻¹ de ALF (alíquota de 10µL de suspensão; n=3). O valor médio inoculado de *C. parvum* em 1 L de ALF foi estimado como sendo igual a 618±228 oocistos.1L⁻¹ de ALF (alíquota de 30 µL de suspensão; n=3).

Figura 33- Oocistos de *C. parvum* recuperados da ALF recuperados por FM. Visualização com aumento de 400x em (a) DAPI; (b) FITC.



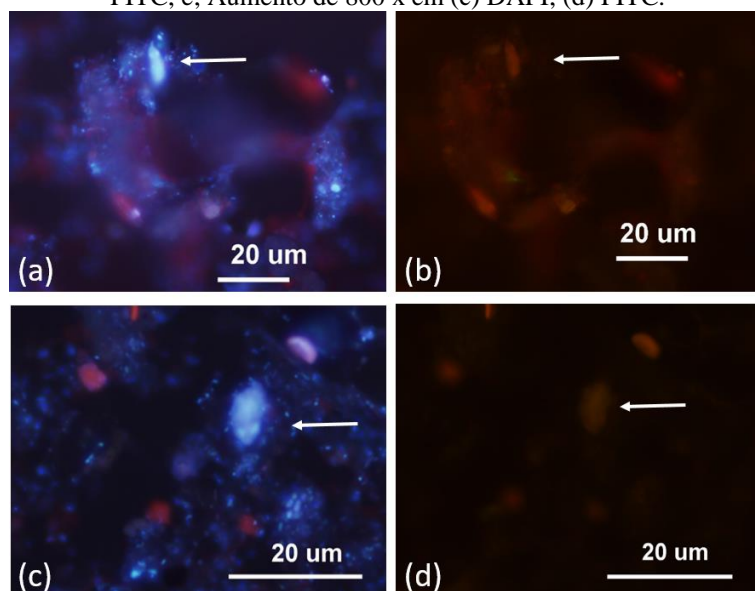
Fonte: Elaborado pelo autor.

Apesar dos resultados para recuperação média percentual, o critério do Método 1623.1 (USEPA, 2012) para validar a recuperação de (oo)cistos não foi atingido, pois o coeficiente de variação (CV) dos oocistos de *Cryptosporidium parvum*, superou o valor de 37% (máximo exigido para a espécie). O CV indica uma relação entre a média e o desvio padrão das repetições e, com isso, mostra quão diferentes elas podem ser. No caso do método da FM sem IMS, é possível presumir que as alíquotas de sedimento que são coletadas para RID não necessariamente apresentam as mesmas características, mesmo que o *pellet* seja devidamente homogeneizado.

Do mesmo modo, a recuperação de *Giardia muris* atendeu ao intervalo de 8-100% do Método 1623.1 (USEPA, 2012), mas o coeficiente de variação superou o valor de 39%. No entanto, diferentemente da recuperação de *C. parvum*, os cistos apresentaram recuperação consideravelmente mais baixa, tendo sido encontrado um número menor em comparação ao de oocistos, mesmo que o inóculo tenha sido maior, em número.

A baixa fluorescência de *G. muris* (ALDERISIO et al., 2017) pode ter influenciado negativamente na recuperação da espécie. Sua identificação foi possível de ser realizada apenas em 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), tendo em vista que o preparo das lâminas considerou uma etapa de adição de Fluoroshield™ com DAPI (Sigma-Aldrich®), apesar de este corante ser recomendado pelo Método 1623.1 da USEPA (2012) com o objetivo de fornecer um teste confirmatório, não de identificação. A Figura 34 indica exemplos em que cistos de *G. muris* são identificados em DAPI, mas não aparecem em FITC, o que tornou a leitura das lâminas laboriosa e demorada.

Figura 34 - Cisto de *G. muris* recuperado da ALF por FM. Visualização com aumento de 400x em (a) DAPI; (b) FITC, e; Aumento de 800 x em (c) DAPI; (d) FITC.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6.2. Resultados obtidos pela FM + raspagem com Tween® 80 (0,1%, 45°) + IMS

A recuperação de cistos e oocistos inoculados na ALF submetida à filtração seguida de raspagem das membranas com solução eluidora aquecida a 45°C, dupla centrifugação e purificação do sedimento por separação imunomagnética (FM + IMS) é apresentada na

Tabela 18. Os resultados apresentados na

Tabela 18, indicam que a recuperação de *Giardia muris* foi insuficiente e que a de *Cryptosporidium parvum*, por sua vez, atendeu ao critério do Método 1623.1 da USEPA (2012), tanto em média de recuperação, quanto em coeficiente de variação (CV). Além disso, a visualização de oocistos recuperados na matriz foi clara sob reação de imunofluorescência direta (RID), tal como exibido na Figura 35.

Tabela 18- Recuperação de (oo)cistos em amostras de ALF submetidas a FM + IMS, em função das dissociações ácidas.

Amostra	<i>Giardia muris</i>				Total	Amostra	<i>Cryptosporidium parvum</i>			
	Dissociações ácidas			Total			Dissociações ácidas			Total
	1 ^a	2 ^a	3 ^a				1 ^a	2 ^a	3 ^a	
1	6	0	0	6	1	329	7	4	340	
2	5	4	0	9	2	362	55	3	420	
3	0	0	0	0	3	205	9	0	214	
4	7	0	0	7	4	310	8	4	322	
Média (n° (oo)cistos)	4,5	1	0	5,5	Média (n° (oo)cistos)	302	20	2,75	324	
DP	2,69	2	0	3,4	DP	58,7	20	1,64	73,4	
Recuperação por DA (%)	0	0	0	0,00%	Recuperação por DA (%)	41	3	0	43,90%	
CV				60,98%	CV				22,67%	

Fonte: Elaborado pelo autor.

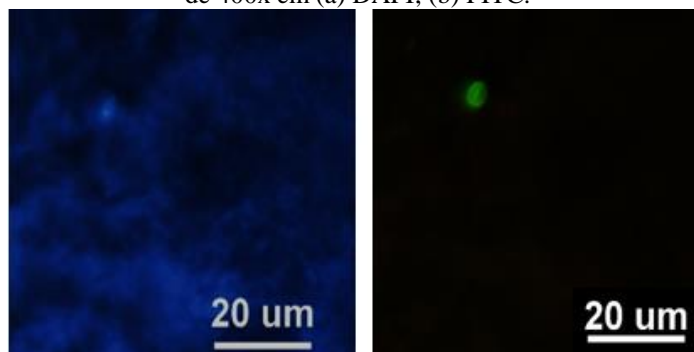
Nota: ALF = água de lavagem de filtros; FM = filtração em membrana; IMS = separação imunomagnética; DP = desvio padrão; DA = dissociação ácida; CV = coeficiente de variação.

Nota²: O valor médio inoculado de *G. muris* em 1000 mL de ALF foi estimado como sendo igual a 2089±429 cistos.1L⁻¹ de ALF (alíquota de 10µL de suspensão; n=3).

O valor médio inoculado de *C. parvum* em 1000 mL de ALF foi estimado como sendo igual a 738±97 oocistos.1L⁻¹ de ALF (alíquota de 30 µL de suspensão; n=3).

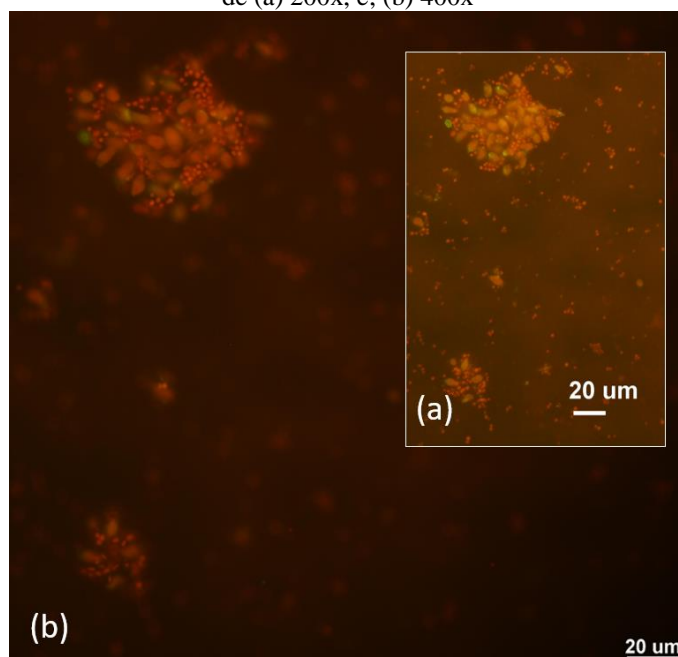
Além das dificuldades intrínsecas à identificação de *Giardia muris* no que tange à baixa fluorescência (ALDERISIO et al., 2017), cabe ressaltar que se estima que os cistos não estivessem passíveis de serem capturados pelos anticorpos monoclonais associados às esferas magnéticas do kit para IMS (DynabeadsTM), devido às aglomerações presentes nas suspensões. Estes aglomerados, causados em geral por contaminação fúngica, são de ocorrência típica ao trabalhar-se com suspensões comerciais, tendo sido verificados em demais inóculos. Seu aspecto pode ser visto na Figura 36.

Figura 35 - Oocistos de *C. parvum* recuperados da ALF recuperados por FM + IMS. Visualização com aumento de 400x em (a) DAPI; (b) FITC.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 36 - Aglomerado de *G. muris* e sujidades encontradas na suspensão visualizados em FITC sob aumento de (a) 200x, e; (b) 400x



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.7. Recuperação de protozoários na água de lavagem de filtros (ALF) contendo ColorSeed™

A Tabela 19 apresenta o resumo das recuperações obtidas para filtração em membranas, seguida de raspagem com Tween® 80 aquecido, seguida ou não de separação imunomagnética (IMS), em comparação com os requisitos do Método 1623.1 (USEPA, 2012). Os dados apresentaram distribuição normal pelo teste Shapiro-Wilk. Sua análise estatística indicou diferença significativa entre as médias ($P = 0,012$), com confiabilidade de 95% pelo teste t de Student.

Tabela 19 - Recuperação de cistos e oocistos de suspensões inoculadas em ALF, em função do método aplicado

Método de recuperação	<i>Giardia muris</i>		<i>Cryptosporidium parvum</i>	
	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)
FM	17,36±6,87	39,58	100±49,18	47,8
FM + IMS	0,00±0,16	60,98	43,90±9,95	22,67
Método 1623.1 (USEPA, 2012)	<i>Giardia spp.</i>		<i>Cryptosporidium spp.</i>	
	8 - 100	≤39	31 - 100	≤37

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: ALF = água de lavagem de filtros; FM = filtração em membrana; IMS = separação imunomagnética; CV = coeficiente de variação.

Desta forma, optou-se por realizar o teste de qualidade analítica com ColorSeed™ aplicando o método que empregou a etapa de separação imunomagnética (item 5.6.2), pois, apesar de ter apresentado recuperação insuficiente de *Giardia muris*, atendeu à exigência do Método 1623.1 (USEPA, 2012), tanto em recuperação, quanto em coeficiente de variação para *Cryptosporidium parvum*, organismo que foi considerado no teste estatístico. Além disso, a inclusão da etapa de purificação assegura que, em ocasiões de variação na qualidade da água de lavagem de filtros (e. g. aumento na turbidez ou sólidos suspensos), será realizada maior remoção de interferentes e não haverá simplificações na estimativa de recuperação, a exemplo da utilização de fatores de correção.

A Tabela 20 indica os resultados do teste de qualidade analítica de concentração por filtração em membranas seguida de raspagem com solução eluidora aquecida a 45°C, dupla centrifugação e purificação do sedimento por separação imunomagnética (FM+IMS) da água de lavagem de filtros inoculada com ColorSeed™. A recuperação de *Giardia* spp. (Figura 37) foi satisfatória de acordo com o Método 1623.1 (USEPA, 2012), o que corrobora que os testes com a suspensão foram insuficientes no procedimento com IMS devido aos aglomerados de cistos (item 5.6.2, Figura 36). Entretanto, o método não atendeu os requisitos para *Cryptosporidium* spp. (Figura 38), o que, a princípio, entende-se por ter se devido à influência de uma ordem de grandeza menor do inóculo. Não foram encontrados (oo)cistos na amostra referente ao branco.

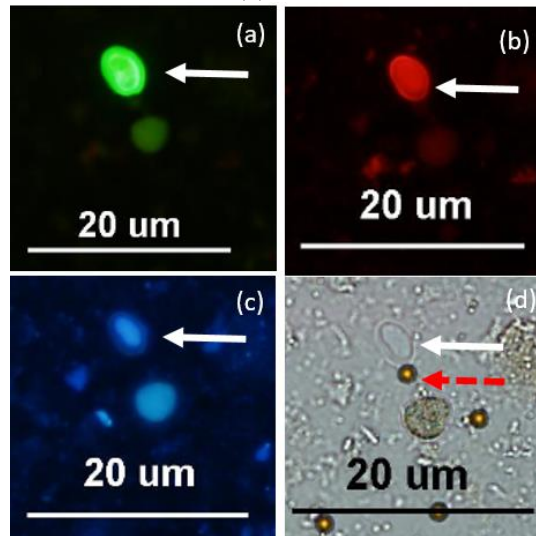
Tabela 20 - Recuperação de (oo)cistos provenientes de ColorSeed™ em amostras de ALF submetidas a FM + IMS, em função das dissociações ácidas.

Amostra	<i>Giardia</i> spp.			Total	Amostra	<i>Cryptosporidium</i> spp.			Total
	Dissociações ácidas					Dissociações ácidas			
	1 ^a	2 ^a	3 ^a			1 ^a	2 ^a	3 ^a	
1	8	1	1	10	1	0	0	1	
2	10	2	1	13	2	0	1	2	
3	9	2	1	12	3	0	0	0	
4	14	2	1	17	4	5	0	0	5
Média (n° (oo)cistos)	10,25	1,75	1	13	Média (n° (oo)cistos)	1,5	0,25	0,25	2
DP	2,28	0,43	0,00	2,55	DP	2,06	0,43	0,43	1,87
Recuperação por DA (%)	10,25	1,75	1	13,00%	Recuperação por DA (%)	1,5	0,25	0,25	2,00%
CV			0	19,61%	CV				93,54%

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: ALF = água de lavagem de filtros; FM = filtração em membrana; IMS = separação imunomagnética; DP = desvio padrão; DA = dissociação ácida; CV = coeficiente de variação.

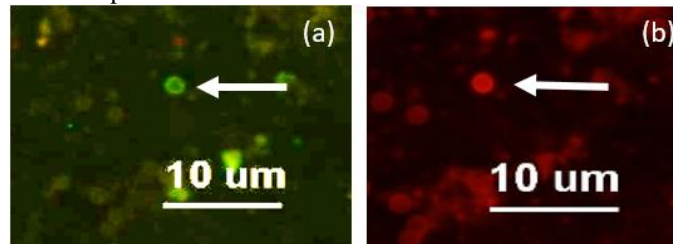
Figura 37- Aspecto de cisto recuperado em amostra de ALF sob aumento de 400x em (a) FITC, (b) WG; (c) DAPI e; (d) DIC



Fonte: Elaborado pelo autor.

Notas: ALF = água de lavagem de filtros; Setas brancas indicam cistos de *Giardia* sp. e setas vermelhas / segmentadas indicam esferas magnéticas capturadas mesmo após a dissociação ácida.

Figura 38 - Aspecto de oocisto recuperado em amostra de ALF sob aumento de 400x em (a) FITC, (b) WG



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Setas brancas indicam cistos de *Cryptosporidium* sp.

A interpretação e comparação de dados apresentados em estudos sobre protozoários é dificultada por conta do emprego de diferentes procedimentos, técnicas e amostragem, concentração e status epidemiológico das populações (ONGERTH, 2013). Isto leva a diferentes resultados, atendendo ou não expectativas de desempenho dos métodos, tal como ocorreu no presente trabalho.

5.8. Estimativa de viabilidade dos métodos de recuperação aplicados

A Tabela 21 apresenta os resultados positivos para incorporação de iodeto de propídio (IP) em oocistos de *Cryptosporidium parvum* para os métodos de recuperação testados. Os dados são apresentados em função da média percentual de oocistos corados em relação aos identificados, tanto na estimativa do inóculo, quanto na recuperação obtida, i. e. antes e depois de submetidos aos métodos de recuperação. Desta forma, pode-se entender a perda de viabilidade como a diferença no percentual de oocistos corados após a recuperação.

Tabela 21 - Percentual de oocistos de *Cryptosporidium parvum* corados com iodeto de propídio (IP), em função do método de recuperação aplicado

Matriz	Método de recuperação	Corados com IP no inóculo (n=3)	Corados com IP na recuperação (n=4)	Diferença no percentual de incorporação de IP	Idade da suspensão
ALF	FM	7,33%	25,34%	18,01%	128 dias
ALF	FM+IMS	11,34%	29,48%	18,14%	134 dias
Lodo	FCCa + IMS	34,15%	88,53%	54,38%	169 dias
Lodo	CD+ICN7X + IMS	19,40%	90,53%	71,13%	177 dias
Lodo	Fe ₂ (SO ₄) ₃ +IMS	33,22%	94,89%	61,67%	191 dias
Lodo	Al ₂ (SO ₄) ₃ +IMS	36,10%	98,78%	62,68%	204 dias

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: ALF = água de lavagem de filtros; FM = Filtração em membrana; IMS = separação imunomagnética; FCCa = floculação com carbonato de cálcio; CD + ICN7X = centrifugação direta e adição de solução de dispersão detergente ICN7X; Fe₂(SO₄)₃ = floculação com sulfato férrico; Al₂(SO₄)₃ = floculação com sulfato de alumínio.

Os procedimentos que envolveram inserção de tampão ácido e centrifugação refrigerada (métodos incluindo floculação com sulfato férrico e sulfato de alumínio) exibiram a maior perda de viabilidade de oocistos (acima de 94% com incorporação de corante, i. e., apresentando membrana danificada). A floculação em meio básico, contudo, também proporcionou grande perda de viabilidade, visto que aproximadamente 88% dos oocistos recuperados por floculação em carbonato de cálcio incorporaram IP.

No caso da filtração em membranas (FM) e centrifugação direta (CD), não era esperada perda de viabilidade significativa, na medida em que não constituem métodos invasivos em termos de amplitude de alteração de temperatura ou pH. Entretanto, apesar de os resultados para os métodos com FM corroborarem esta expectativa, a recuperação por centrifugação direta (CD) com adição de solução de dispersão detergente ICN 7X (MP BIO®) a 1%, seguida de separação imunomagnética (IMS), apresentou aproximadamente 70% de diferença percentual na quantidade de oocistos corados.

5.9. Estimativa de custo dos métodos de recuperação de protozoários

A Tabela 22 indica os custos aproximados relativos aos procedimentos de recuperação de cistos e oocistos aplicando: concentração com custo desprezível ou a realização desta etapa por filtração em membranas (FM); a inclusão ou não de purificação por separação imunomagnética (IMS), e; a detecção por reação de imunofluorescência direta (RID). Este levantamento, baseado em reagentes consumíveis, indicou valores expressivos para cada análise, que corroboram a necessidade de investigar métodos de recuperação que reflitam, de

fato, a ocorrência de (oo)cistos na matriz estudada, de modo que o investimento nestes testes forneça dados concisos e representativos. Além disso, cabe citar que a realização de testes de detecção de protozoários exige investimentos em infraestrutura de laboratório, não contemplados na presente análise, mas que constituem demandas financeiras expressivas, a exemplo da aquisição de equipamentos como centrífuga, microscópio ótico, incubadora, dentre outros.

Tabela 22 - Custo unitário de reagentes consumíveis na recuperação de (oo)cistos em função das etapas de análise

Etapas	Materiais e reagentes	Valor do produto	Valor corrigido	Valor unitário	Usos	Custo do reagente por análise	Total por análise
Concentração e RID	Merifluor®	R\$ 2.850,00	R\$ 2.934,75	R\$ 58,70	2	R\$ 117,39	R\$ 120,27
	Fluoroshield™ com DAPI	R\$ 265,35	R\$ 288,06	R\$ 1,44	2	R\$ 2,88	
FM e RID	Membranas	R\$ 190,00	R\$ 203,58	R\$ 2,04	3	R\$ 6,11	R\$ 126,38
	Merifluor®	R\$ 2.850,00	R\$ 2.934,75	R\$ 58,70	2	R\$ 117,39	
	Fluoroshield™ com DAPI	R\$ 265,35	R\$ 288,06	R\$ 1,44	2	R\$ 2,88	
Concentração, IMS e RID	Dynabeads™	R\$ 16.611,18	R\$ 18.221,48	R\$ 364,43	1	R\$ 364,43	R\$ 544,84
	Merifluor®	R\$ 2.850,00	R\$ 2.934,75	R\$ 58,70	3	R\$ 176,09	
	Fluoroshield™ com DAPI	R\$ 265,35	R\$ 288,06	R\$ 1,44	3	R\$ 4,32	
FM, IMS e RID	Membranas	R\$ 190,00	R\$ 203,58	R\$ 2,04	3	R\$ 6,11	R\$ 550,95
	Dynabeads™	R\$ 16.611,18	R\$ 18.221,48	R\$ 364,43	1	R\$ 364,43	
	Merifluor®	R\$ 2.850,00	R\$ 2.934,75	R\$ 58,70	3	R\$ 176,09	
	Fluoroshield™ com DAPI	R\$ 265,35	R\$ 288,06	R\$ 1,44	3	R\$ 4,32	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Notas: FM = Filtração em membranas; IMS = separação imunomagnética; reação de imunofluorescência direta.

Não foram contabilizados custos de concentração por centrifugação, tampouco floculação.

No caso de FM, foram consideradas, genericamente, 3 membranas por litro a ser concentrado, mas esta quantidade varia em função da turbidez da amostra.

O custo do reagente Fluoroshield™ com DAPI referiu-se ao frasco de 20 mL, considerando volume médio da gota como sendo de 50µL e levando em conta que a montagem das lâminas para microscopia requer duas gotas por poço.

Valores corrigidos para dezembro de 2018 pelo índice IGP-M (FGV).

A concentração de protozoários nas matrizes estudadas, por meio de membranas de nitrato de celulose com diâmetro de 47 mm e porosidade nominal de 3 µm, corresponde a 5,1% de incremento nos custos de recuperação de protozoários em que é realizada centrifugação direta ou floculação, por exemplo, nas quais o custo predominante é vinculado à RID. Isto incentiva que demais procedimentos de concentração sejam verificados para amostras com características similares às da água de lavagem de filtros (ALF), estudada neste trabalho com concentração por meio de FM.

Quanto à inclusão de etapa de purificação por IMS, há considerável aumento nos custos de recuperação, conforme indicado por Andreoli e Sabogal-Paz (2017) com dados de 2016. Giglio e Sabogal-Paz (2018) também realizaram este levantamento de custos, considerando dados corrigidos para julho de 2018, tendo sido obtidos valores similares ao do presente estudo, se levada em consideração a variação da conversão da moeda (dólar para real) e o fato de foram aplicadas duas dissociações ácidas por amostra submetida à IMS.

No presente estudo, corrigido para 2018, o protocolo de IMS com três dissociações ácidas exige um investimento aproximado de R\$ 544,84 por amostra, sem que sejam incorporados valores referentes ao método de concentração. Apesar de constituir a etapa mais onerosa do procedimento de recuperação de cistos e oocistos, porém, a etapa de purificação é fundamental em matrizes complexas, a exemplo do apresentado neste estudo para o lodo (item 5.4.3).

A análise dos custos permitiu constatar que a inclusão do teste confirmatório recomendado pelo Método 1623.1 (USEPA, 2012) utilizando o corante DAPI não altera a ordem de grandeza dos custos. Isto reforça sua utilização, principalmente, pois auxilia na indicação de organismos presentes na amostra que não tenham sido claramente visualizados sob fluorescência no filtro FITC, a exemplo do que ocorre com *Giardia muris* (ALDERISIO et al., 2017), o que, na ausência da análise com DAPI, subestimaria a ocorrência de *Giardia* spp., comprometendo os resultados de recuperação de cistos.

5. CONCLUSÕES

A utilização do cloreto de polialumínio (PAC) apresentou remoções de turbidez e cor satisfatórias para o tratamento da água de manancial superficial em estudo em ampla faixa de pH, recomendando-se a utilização do pH neutro. Estes resultados indicam vantagem do uso do PAC, por não exigir custos com alcalinizantes. Além disso, a seleção dos parâmetros operacionais permitiu compreender a influência dessas condições no tratamento com PAC e direcionar demais estudos com matrizes similares.

As características das matrizes geradas, lodo e água de lavagem de filtros (ALF), indicaram complexidade no estabelecimento de um método de recuperação de protozoários, justificando a investigação de diferentes procedimentos.

O uso de corantes vitais de ação simultânea em cistos de *Giardia muris* e oocistos de *Cryptosporidium parvum* não foi eficaz. Assume-se que isso tenha sido devido à interferência da fluorescência dos reagentes de detecção do kit Merifluor® e da baixa fluorescência de *Giardia muris*, bem como à espessura das paredes de oocistos, que prejudicam a incorporação de corantes à base de fluoresceína. Neste trabalho, foi, portanto, de melhor interesse utilizar o iodeto de propídio para estimar viabilidade de (oo)cistos, baseando-se unicamente na impermeabilidade ao corante, no caso de organismos de membrana intacta, considerados viáveis.

Com relação à recuperação de protozoários no lodo, foram obtidos melhores resultados utilizando concentração por floculação ácida seguidas de separação imunomagnética (IMS). Neste contexto, destacou-se a floculação com sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$), a partir da qual, as recuperações de cistos e oocistos de suspensão comercial foram de 6,44% e 91,20%, respectivamente. O ensaio de qualidade analítica aplicando inóculo de ColorSeed™ foi realizado para este método e atendeu ao requerido pelo Método 1623.1 da USEPA (2012) para recuperação de *Giardia* spp. (32,25% e coeficiente de variação – CV de 9,00%), mas não foi suficiente para *Cryptosporidium* spp. (11,00%; CV de 47,67%).

Os testes de recuperação aplicados sobre a ALF inoculada com suspensões comerciais de *Giardia muris* e *Cryptosporidium parvum* indicaram resultados mais coerentes analiticamente para o método de filtração em membrana com raspagem utilizando Tween® 80 (45 °C, 0,1%) seguida de etapa de purificação por IMS, do que aquele que não contemplou a purificação. Apesar de não ter havido recuperação de *G. muris*, a recuperação média de oocistos de *C. parvum* foi de 43,9%. O ensaio de qualidade analítica com inóculo de ColorSeed™ reproduziu, portanto, este procedimento. Os resultados atenderam ao requerido pelo Método 1623.1 da USEPA (2012) para

Giardia spp. (recuperação de 13,00%, CV = 19,61%), mas não foram suficientes para *Cryptosporidium* spp. (2,00%; CV = 93,54%).

A inclusão de iodeto de propídio (IP) por oocistos de *C. parvum* foi utilizada para estimar o efeito dos diferentes métodos de recuperação aplicados sobre a viabilidade dos organismos. Verificou-se que os procedimentos de concentração que envolveram baixas temperaturas de centrifugação e mudanças de pH para caráter ácido (floculação em $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ reduziram a viabilidade de aproximadamente 60% dos oocistos recuperados. Contrário às expectativas, o procedimento de centrifugação direta com solução de dispersão detergente promoveu a maior incorporação de IP, de aproximadamente 70%, considerando a diferença percentual entre o inóculo e os oocistos recuperados. Estes resultados reforçam o fato de que procedimentos analíticos de recuperação de protozoários promovem danos morfológicos aos organismos, prejudicando a interpretação de dados de viabilidade, cujo método de estimativa também deve ser investigado.

A análise de custos dos métodos de recuperação indicados reitera o fato de que testes para a detecção de cistos e oocistos em amostras ambientais exigem investimentos financeiros expressivos, principalmente vinculados à etapa de purificação. Com isso, deve-se insistir na pesquisa de procedimentos mais adequados para matrizes complexas, em busca de definir uma metodologia que garanta dados significativos e realistas quanto à ocorrência dos organismos-alvo.

REFERÊNCIAS

- 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 10.004. Resíduos Sólidos. Classificação. Rio de Janeiro, 2004.
- ABO-EL-ENEIN, S. A.; SHEBL, A.; ABO EL-DAHAB, S. A. Drinking water treatment sludge as an efficient adsorbent for heavy metals removal. **Applied Clay Science**, v. 146, n. June, p. 343–349, 2017.
- ACHON, C. L.; BARROSO, M. M.; CORDEIRO, J. S. e estações de tratamento de água e a ISO 24512: desafio do saneamento brasileiro. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 18, n. 2, p. 115–122, 2013.
- 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**. XXXV Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental (AIDIS). **Anais...**Catagena - Colômbia: 2016
- ADEYEMO, F. E. et al. Methods for the detection of *Cryptosporidium* and *Giardia*: From microscopy to nucleic acid based tools in clinical and environmental regimes. **Acta Tropica**, v. 184, n. April 2017, p. 15–28, 2018.
- AHMAD, T.; AHMAD, K.; ALAM, M. Sustainable management of water treatment sludge through 3'R' concept. **Journal of Cleaner Production**, v. 124, p. 1–13, 2016.
- ALDERISIO, K. A. et al. Differences in staining intensities affect reported occurrences and concentrations of *Giardia* spp. in surface drinking water sources. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 6, p. 1607–1613, 2017.
- ALDEYARBI, H. M.; ABU EL-EZZ, N. M. T.; KARANIS, P. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis: the African perspective. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 14, p. 13811–13821, 2016.
- ALMEIDA, J. C. et al. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in a public water-treatment system, Paraná, Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 3, p. 303–308, 2015.
- AMOKRANE, A.; COMEL, C.; VERON, J. Landfill leachates pretreatment by coagulation-flocculation. **Water Research**, v. 31, n. 11, p. 2775–2782, nov. 1997.
- ANDREOLI, C. V. **Resíduos sólidos do saneamento: processamento, reciclagem e disposição final**. Prosab. 1ª ed. 2001.
- 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**, v. 3330, n. November, p. 1–27, 2017.
- APHA; AWWA; WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**.

22. ed. Washington, DC.: 2012.

ASSAVASILAVASUKUL, P. et al. Effect of pathogen concentrations on removal of *Cryptosporidium* and *Giardia* by conventional drinking water treatment. **Water Research**, v. 42, n. 10–11, p. 2678–2690, 2008.

AUSTIN, J. W.; PAGOTTO, F. J. MICROBIOLOGY | Detection of Foodborne Pathogens and their Toxins. In: **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. Elsevier, 2003. p. 3886–3892.

BAI, L. et al. Reuse of drinking water treatment residuals as a substrate in constructed wetlands for sewage tertiary treatment. **Ecological Engineering**, v. 70, p. 295–303, 2014.

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

BONATTI, T. R.; FRANCO, R. M. B.; NETO, R. C. Comparison of two methodologies for detection of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in activated sludge samples from a sewage treatment plant in the city of Campinas, São Paulo State, Brazil. **Journal of Water and Health**, v. 5, n. 4, p. 609–614, 2007.

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 de Mestrado. São Carlos. Universidade de São Paulo, 2016.

BOUCHER, S. E. M.; GILLIN, F. D. Excystation of in vitro-derived *Giardia lamblia* cysts. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 11, p. 3516–3522, 1990.

BOUZID, M. et al. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 115–134, 2013.

BRASIL. Lei nº 12.305 de 02 de agosto de 2010. Política Nacional de Resíduos Sólidos. Brasília. Congresso Nacional, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Padrão de Potabilidade. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Consolidação das normas sobre as ações e serviços de saúde no Sistema Único de Saúde. Portaria de Consolidação nº 5, de 03 de outubro de 2017. Brasília, 2017.

BRESCIA, C. C. et al. *Cryptosporidium* propidium monoazide-PCR, a molecular biology-based technique for genotyping of viable *Cryptosporidium* oocysts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 21, p. 6856–6863, 2009.

CACCIÒ, S. M. et al. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 13, p. 1523–1531, nov. 2008.

CAREY, C. M.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Biology, persistence and detection of

Cryptosporidium parvum and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water Research**, v. 38, n. 4, p. 818–862, 2004.

CASTRO-HERMIDA, J. A. et al. Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: A health risk for humans and animals. **Water Research**, v. 43, n. 17, p. 4133–4142, 2009.

CERTAD, G. et al. Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 7, p. 561–576, 2017.

CHECKLEY, W. et al. Review A review of the global burden , novel diagnostics , therapeutics , and vaccine targets for *Cryptosporidium*. p. 85–94, 2015.

CHENG, W. P. et al. **Dynamics of aluminum leaching from water purification sludge** **Journal of Hazardous Materials**, 2012.

CHO, E. J. et al. A waterborne outbreak and detection of *Cryptosporidium* oocysts in drinking water of an older high-rise apartment complex in Seoul. **Korean Journal of Parasitology**, v. 51, n. 4, p. 461–466, 2013.

CHUAH, C. J. et al. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the water resources of the Kuang River catchment, Northern Thailand. **Science of the Total Environment**, v. 562, p. 701–713, 2016.

COELHO, C. H. et al. Giardiasis as a neglected disease in Brazil: Systematic review of 20 years of publications. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 10, p. 1–22, 2017.

DAVEY, H. M. Life, death, and in-between: Meanings and methods in microbiology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 16, p. 5571–5576, 2011.

DE ARAÚJO, R. S. et al. Detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* species and *Giardia* assemblages in two watersheds in the metropolitan region of São Paulo, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, n. March, p. 1–13, 2018.

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

DI BERNARDO, L.; SABOGAL-PAZ, L. P. **Seleção de tecnologias de tratamento de água**. São Carlos: LDiBe, 2008.

DI GIOVANNI, G. D. et al. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in surface and filter backwash water samples by immunomagnetic separation and integrated cell culture-PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3427–3432, 1999.

EFSTRATIOU, A.; ONGERTH, J. E.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011–2016. **Water Research**, v. 114, p. 14–22, 2017a.

EFSTRATIOU, A.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. Evolution of monitoring for *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. **Water Research**, v. 123, p. 96–112, 2017b.

EINARSSON, E.; MA'AYEH, S.; SVÄRD, S. G. An up-date on *Giardia* and giardiasis.

Current Opinion in Microbiology, v. 34, p. 47–52, dez. 2016.

ERLANDSEN, S. L. et al. Formation of the *Giardia* Cyst Wall: Studies on Extracellular Assembly Using Immunogold Labeling and High Resolution Field Emission SEM. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 416–430, set. 1996.

ERLANDSEN, S. L.; BEMRICK, W. J.; PAWLEY, J. High-Resolution Electron Microscopic Evidence for the Filamentous Structure of the Cyst Wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. **The Journal of Parasitology**, v. 75, n. 5, p. 787, out. 1989.

FENG, Y. et al. Occurrence, source, and human infection potential of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in source and tap water in Shanghai, China. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 11, p. 3609–3616, 2011.

FERNANDES, L. N. et al. Detection of assemblages A and B of *Giardia duodenalis* in water and sewage from São Paulo state, Brazil. **Journal of Water and Health**, v. 9, n. 2, p. 361–367, 2011.

FERREIRA FILHO, S. S.; WAELKENS, B. E. Minimização da produção de lodo no tratamento de águas de abastecimento mediante uso do cloreto de polialumínio e sua disposição em estações de tratamento de esgotos. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 14, n. 3, p. 317–326, 2009.

FRANCO, R. M. B. et al. 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. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 21, n. 2, p. 233–242, 2012.

FRANCO, R. M. B. et al. *Cryptosporidium* Species and Giardia Genotypes Detected in Surface Water Supply of Campinas, Southeast Brazil, by Molecular Methods. **Journal of Veterinary Medicine and Research**, v. 3, n. 3, p. 1–7, 2016.

FRANCO, R. M. B.; BRANCO, N.; LEAL, D. A. G. Parasitologia ambiental: Métodos de concentração e de detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n. 2, p. 119–135, 12 jul. 2012.

FRANCO, R. M. B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO NETO, R. Brief communication occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and giardia cysts in raw water from the atibaia river, Campinas, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo** v. 43, n. 2, p. 109–111, 2001.

FREGONESI, B. M. et al. *Cryptosporidium* and *Giardia*: challenges in public water supplies. **O Mundo da Saúde**, v. 36, n. 4, p. 602–609, 2012.

FREITAS, A. G. DE et al. Recirculação de água de lavagem de filtros e perigos associados a protozoários. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 15, n. 1, p. 37–46, 2010.

GALLAS-LINDEMANN, C. et al. Prevalence and distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater and the surface, drinking and ground waters in the Lower Rhine, Germany. **Epidemiology and Infection**, v. 141, n. 1, p. 9–21, 2013.

GENETU BAYIH, A. et al. Susceptibility Testing of Medically Important Parasites. **Clinical**

Microbiology Reviews, v. 30, n. 3, p. 647–669, 26 jul. 2017.

GHAFARI, S. et al. Application of response surface methodology (RSM) to optimize coagulation-flocculation treatment of leachate using poly-aluminum chloride (PAC) and alum. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, n. 2–3, p. 650–656, 2009.

GIBBONS, C. L.; RIGI, F. M.; AWAD-EI-KARIEM, F. M. Detection of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* Oocysts in Spiked Backwash Water using Three PCR-Based Protocols. **Protist**, v. 149, n. 2, p. 127–134, 1998.

GIGLIO, G. L.; SABOGAL-PAZ, L. P. **Ensaio de tratabilidade e avaliação do escoamento em filtros de laboratório acoplados ao jarreste**. 29º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. **Anais...**São Paulo: 2017

GIGLIO, G. L.; SABOGAL-PAZ, L. P. Performance comparison of three methods for detection of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in drinking-water treatment sludge. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 190, n. 11, p. 686, 29 nov. 2018.

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, n. 1, p. 43–48, 2009.

GRACZYK, T. K. et al. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in sewage sludge and solid waste landfill leachate and quantitative comparative analysis of sanitization treatments on pathogen inactivation. **Environmental Research**, v. 106, n. 1, p. 27–33, 2008.

GRIT, G. H. et al. *Giardia duodenalis* cyst survival in cattle slurry. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 2–4, p. 330–334, 2012.

GUIMARÃES, J. R. et al. *Giardia duodenalis* : Number and Fluorescence Reduction Caused by the Advanced Oxidation Process (H₂O₂ /UV). **International Scholarly Research Notices**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

HACHICH, E. M. et al. *Giardia* and *Cryptosporidium* in source waters of Sao Paulo State, Brazil. **Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research**, v. 50, n. 1, p. 239–245, 2004.

HIJNEN, W. A. M. et al. GAC adsorption filters as barriers for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water treatment. **Water Research**, v. 44, n. 4, p. 1224–1234, 2010.

HOFSTRA, N.; VERMEULEN, L. C. Impacts of population growth, urbanisation and sanitation changes on global human *Cryptosporidium* emissions to surface water. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 219, n. 7, p. 599–605, out. 2016.

HOTEZ, P. J. et al. Control of Neglected Tropical Diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, p. 1018–1027, 2007.

HOTEZ, P. J. Neglected infections of poverty in the United States of America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 6, 2008.

HOTEZ, P. J.; GURWITH, M. Europe's neglected infections of poverty. **International**

Journal of Infectious Diseases, v. 15, n. 9, p. e611–e619, 2011.

IBGE, I. B. DE G. E. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (2008)**. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

IBGE, I. B. DE G. E. **Atlas de Saneamento de 2011**. Rio de Janeiro: IBGE, 2011.

IPPOLITO, J. A.; BARBARICK, K. A.; ELLIOTT, H. A. Drinking Water Treatment Residuals: A Review of Recent Uses. **Journal of Environment Quality**, v. 40, n. 1, p. 1, 2011.

JOHNSTON, S. P. et al. Evaluation of Three Commercial Assays for Detection of. **Society**, v. 41, n. 2, p. 623–626, 2003.

JUNG, K. W. et al. Comprehensive reuse of drinking water treatment residuals in coagulation and adsorption processes. **Journal of Environmental Management**, v. 181, p. 425–434, 2016.

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.

KARANIS, P.; SCHOENEN, D.; SEITZ, H. M. *Giardia* and *Cryptosporidium* in backwash water from rapid sand filters used for drinking water production. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 284, n. 1, p. 107–114, 1996.

KARANIS, P.; SCHOENEN, D.; SEITZ, H. M. Distribution and removal of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies in Germany. **Water Science and Technology**, v. 37, n. 2, p. 9–18, 1998.

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

KEELEY, J. et al. Coagulant recovery and reuse for drinking water treatment. **Water Research**, v. 88, p. 502–509, 2016.

KIMURA, A. et al. Bench scale experiments to evaluate the usefulness of sucrose flotation techniques for separation of *Cryptosporidium* oocysts from water. **Journal of protozoology research**, v. 10, n. 3, p. 155–165, 2000.

KINYUA, M. N. et al. Viability and fate of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in tubular anaerobic digesters. **Science of the Total Environment**, v. 554–555, p. 167–177, 2016.

KOEHLER, A. V. et al. *Giardia*/giardiasis - A perspective on diagnostic and analytical tools. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 2, p. 280–289, 2014.

KOURENTI, C. et al. Development and Application of Different Methods for the Detection of *Toxoplasma gondii* in Water. **Society**, v. 69, n. 1, p. 102–106, 2003.

KUMAR, T. et al. Presence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water samples from Southeast Asia : towards an integrated water detection system. **Infectious**

Diseases of Poverty, p. 1–12, 2016.

KVÁČ, M. et al. *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and Biological Evidence of Cryptic Species within Gastric *Cryptosporidium* of Mammals. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0147090, 15 jan. 2016.

LECHEVALLIER, M. W.; AU, K.-K. **Water Treatment and Pathogen Control: Process efficiency in achieving safe drinking-water**. London: IWA Publishing, 2004.

LI, J. et al. Effect of adding alum sludge from water treatment plant on sewage sludge dewatering. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 1, p. 746–752, 2016.

LI, S. Y.; GOODRICH, J. A.; OWENS, J. H. **Potential cryptosporidium surrogates and evaluation of compressible oocysts**. (No. CONF-9504110–) Environmental Protection Agency. **Anais...**Cincinnati, OH (United States): Environmental Protection Agency, 1995Disponível em: <<https://www.osti.gov/servlets/purl/111523>>

LI, X. et al. *Cryptosporidium rubeyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in multiple Spermophilus ground squirrel species. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, n. 3, p. 343–350, 2015.

LUSTOSA, J. B. et al. Tratamento e aproveitamento de água de lavagem de filtro em estação de tratamento de água. **Revista DAE**, v. 65, n. 206, p. 44–61, 2017.

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**, v. 14, n. 3, p. 369–378, 2016.

MACIEL, P. M. F.; SABOGAL-PAZ, L. P. **Diagrama de coagulação e otimização de misturas para água com turbidez elevada utilizando cloreto de polialumínio**. 29º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. **Anais...**São Paulo: Congresso ABES/FENASAN-2017, 2017

MACINTYRE, H. L.; CULLEN, J. J. Classification of phytoplankton cells as live or dead using the vital stains fluorescein diacetate and 5-chloromethylfluorescein diacetate. **Journal of Phycology**, v. 52, n. 4, p. 572–589, 2016.

MAHMOUDI, M. R.; ONGERTH, J. E.; KARANIS, P. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis: The Asian perspective. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 220, n. 7, p. 1098–1109, 2017.

MCCUIN, R. M.; CLANCY, J. L. Methods for the recovery, isolation and detection of *Cryptosporidium* oocysts in wastewaters. **Journal of Microbiological Methods**, v. 63, n. 1, p. 73–88, 2005.

MEDEIROS, R. C.; DANIEL, L. A. Comparison of selected methods for recovery of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in wastewater. **Journal of Water and Health**, v. 1, p. 811–818, 2015.

MEDEIROS, R. C.; DANIEL, L. A. Quantification and analysis of the viability of (oo) cysts of pathogenic protozoa in sewage sludge. **Acta scientiarum**, v. 40, p. 1–6, 2018.

- MONIS, P. T. et al. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n. 1, p. 29–38, maio 2003.
- MONIS, P. T.; CACCIO, S. M.; THOMPSON, R. C. A. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 93–100, fev. 2009.
- NAIR, A. T.; AHAMMED, M. M. The reuse of water treatment sludge as a coagulant for post-treatment of UASB reactor treating urban wastewater. **Journal of Cleaner Production**, v. 96, p. 272–281, jun. 2015.
- NETUSCHIL, L. et al. Confusion over live/dead stainings for the detection of vital microorganisms in oral biofilms - which stain is suitable? **BMC Oral Health**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2014.
- OGURA, A. P. **Avaliação e tratamento da água de lavagem dos filtros e dos resíduos sedimentados gerados pela tecnologia de ciclo completo contendo oocistos de *Cryptosporidium* spp . e cistos de *Giardia* spp .. Avaliação e tratamento da água de lavagem.** Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, 2018.
- 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.
- ONICHANDRAN, S. et al. Waterborne parasites : a current status from the Philippines. v. 7, n. 1, p. 1–8, 2014.
- PAPINEAU, I. et al. Impact of media aging on granular filtration performance for the removal of *Cryptosporidium*. **Water Quality Technology Conference and Exposition 2010**, v. 139, n. May, p. 603–611, 2010.
- PECKOVÁ, R. et al. Statistical comparison of excystation methods in *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Veterinary Parasitology**, v. 230, p. 1–5, 2016.
- QI, Y.; THAPA, K. B.; HOADLEY, A. F. A. Application of filtration aids for improving sludge dewatering properties - A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 171, n. 2, p. 373–384, 2011.
- RAMO, A. et al. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in raw and finished drinking water in north-eastern Spain. **Science of the Total Environment**, v. 580, p. 1007–1013, 2017.
- RICHTER, C. A. **Água: métodos e tecnologia de tratamento.** São Paulo: Blucher, 2009.
- ROBERTSON, L. J. et al. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UL. **Water Research**, v. 34, n. 8, p. 2310–2322, 2000.
- ROBERTSON, L. 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, n. 1, p. 68–69, 2014.
- ROCHELLE, P. A. et al. Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of infectious

Cryptosporidium parvum oocysts from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 841–845, 1999.

ROUSSEAU, A. et al. Assessing viability and infectivity of foodborne and waterborne stages (cysts/oocysts) of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Toxoplasma gondii*: A review of methods. **Parasite**, v. 25, 2018.

RYAN, U. et al. It's official – *Cryptosporidium* is a gregrarine: What are the implications for the water industry? **Water Research**, v. 105, p. 305–313, 2016.

SANTOS, P. R. DOS; DANIEL, L. A. Dissolved air flotation as a potential treatment process to remove *Giardia* cysts from anaerobically treated sewage. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 38, n. 19, p. 2392–2399, 2017.

SANTOS, S. R. DOS et al. Fluorescence decay of dyed protozoa: Differences between stressed and non-stressed cysts. **Luminescence**, v. 30, n. 7, p. 1139–1147, 2015.

SILVA, H. G. **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 de Mestrado. Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, 2018.

SINHA, S. et al. Determining the effectiveness of conventional and alternative coagulants through effective characterization schemes. **Chemosphere**, v. 57, n. 9, p. 1115–1122, dez. 2004.

SMITH, A. L.; SMITH, H. V. A comparison of fluorescein diacetate and propidium iodide staining and in vitro excystation for determining giardia intestinalis cyst viability. **Parasitology**, v. 99, n. 3, p. 329–331, 1989.

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.

SQUIRE, S. A.; RYAN, U. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Africa: current and future challenges. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–32, 2017.

SUN, Z.; BLATCHLEY, E. R. Tetraselmis as a challenge organism for validation of ballast water UV systems. **Water Research**, v. 121, p. 311–319, 2017.

TEMPLETON, T. J. Comparative Analysis of Apicomplexa and Genomic Diversity in Eukaryotes. **Genome Research**, v. 14, n. 9, p. 1686–1695, 1 set. 2004.

THOMPSON, R. C. A.; ASH, A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 40, p. 315–323, 2016.

USEPA. **Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA** United States Protect Agency US Environmental Protection Agency, Office of Water, , 2012. Disponível em:
<<http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/labcert/upload/epa816r12001.pdf>>

USEPA. **Method 1693: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Disinfected Wastewater by**

Concentration / IMS / IFAUS Environmental Protection Agency, Office of Water, , 2014.

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.

VOHRA, P.; SHARMA, M.; CHAUDHARY, U. A comprehensive review of diagnostic techniques for detection of *Cryptosporidium parvum* in stool samples. **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 5, p. 15–26, 2012.

WAGNER, L. F.; PEDROSO, K. Disposição de resíduos das estações de tratamento de água. **Revista Techno Eng**, v. 1, n. 9, 2014.

WICKI, M.; SVOBODA, P.; TANNER, M. Occurrence of *Giardia lamblia* in recreational streams in Basel-Landschaft, Switzerland. **Environmental Research**, v. 109, n. 5, p. 524–527, 2009.

YAKUB, G. P.; STADTERMAN-KNAUER, K. L. Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* from high-iron matrices. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3628–31, 2000.

YUAN, N.; WANG, C.; PEI, Y. Investigation on the eco-toxicity of lake sediments with the addition of drinking water treatment residuals. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 46, p. 5–15, 2016.

ZAHEDI, A. et al. Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: Critical insights into better drinking water management. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 5, n. 1, p. 88–109, abr. 2016.

ZARLENGA, D. S.; TROUT, J. M. Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1–2 SPEC.ISS., p. 195–217, 2004.

ZHOU, Z. et al. Characterization of drinking water treatment sludge after ultrasound treatment. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 24, p. 19–26, 2015.

ZUCKERMAN, U.; TZIPORI, S. Portable continuous flow centrifugation and method 1623 for monitoring of waterborne protozoa from large volumes of various water matrices. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 6, p. 1220–1227, 2006.

ANEXO 1 – Laudo técnico de análise do cloreto de polialumínio**QUIMISA S/A**

Responsável pela emissão: Laboratório de Controle da Qualidade - Fone: (47)3251-1041 - Fax: (47)3251-1051 - eMail: loq@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: 02/03/2018 às 13:26

LAUDO TÉCNICO DE ANÁLISE

NR. 116.341-1

Produto: **POLICLORETO DE ALUMINIO**

Fabricação: 13/12/2017

Validade: 3 meses

Identificação (Lote): M-73728

ENSAIO REALIZADO	RESULTADO	ME	ESPECIFICAÇÃO
Aspecto	OK	ME-052	Líquido amarelo a castanho
Densidade (g/ml)	1,3600	ME Forn	-FAIXA(1,3000;1,5000)
Teor de Al ₂ O ₃ (%)	17,51	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.

ANEXO 2 – Especificação e laudo de análise da suspensão de *Cryptosporidium parvum*

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

<u>Lot #:</u> 08-18	<u>Date shed:</u> 3/3/18
<u>Total number of oocysts provided:</u> 5×10^6	<u>Date purified:</u> 3/5/18

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 3 – Especificação e laudo de análise da suspensão de *Giardia muris*



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*, Roberts-Thompson isolate, for use in research.

Source of Cysts: Experimentally infected CFW Mice

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

Lot #: 046118

Date shed: 1/2 - 1/4/18

Date purified: 1/2 - 1/4/18

Total number of cysts provided: 5×10^6

Total volume: 4 ml 8ml other:

Storage solution: De-ionized water with penicillin, streptomycin, gentamicin, and 0.01% Tween 20

OR

5% Formalin/PBS and 0.01% Tween 20

OR

other:

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.

ANEXO 4 – Especificação e laudo de análise do inóculo ColorSeed™

ColorSeed™

Certificate of Analysis

Batch Number: **B 252**

General

Safety: This product is non-hazardous.

Storage: 2-8°C. Do not freeze.

Catalogue Number: CSCG100

Preparation Date: 31 May 2018

Expiration Date: 28 September 2018

Volume: 1.022 ml +/- 42 ul

Suspension media: Buffered saline solution.

Sterilisation method: Gamma irradiation.

Counts (Method Ref: CS-011)		
	Mean	SD
Cryptosporidium count:	99	1.3
	Mean	SD
Giardia count:	99	1.7
DAPI staining		
Cryptosporidium % +ve	100	%
Giardia % +ve	100	%

Stock specifics

Organism: *Cryptosporidium parvum*

Strain: Iowa

Source: Bovine

Shed date: 11 May 2018

Purification method: Discontinuous sucrose and cesium chloride centrifugation gradients.

Organism: *Giardia lamblia*

Strain: H3

Source: Gerbil

Shed date: 11 May 2018

Purification method: Sucrose and Percoll density gradient centrifugation

Quality Assurance Officer



Michael Pugh
8 June 2018



Accredited for compliance with ISO Guide 34.
Accredited Reference Material Producer
Accreditation Number: 14912
Site Number: 14276



A BIOMÉRIEUX COMPANY

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



Issue 11 - September 2012

ANEXO 5 – Certificado de análise do kit Dynabeads®

98-14289-00

appliedbiosystems
by Thermo Fisher Scientific

CERTIFICATE OF ANALYSIS
#73012

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

Dynabeads™ GC Combo Kit

Quantity: 1 x 5 mL
Bulk Lot: 1300
Filling Lot: 00528209

Dynabeads™ anti-Cryptosporidium
Quantity: 1 x 5 mL
Bulk Lot: 0900
Filling Lot: 00528216

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

10 x SL™ Buffer B
Quantity: 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



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. Graiciuno 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

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.

ANEXO 6 – Orçamentos e notas dos reagentes e materiais avaliados em termos de custos

Recebemos de LAC COMERCIO E SERVIÇOS DE PRODUTOS LABORATORIAIS LTDA EPP os produtos/serviços constante neste documento indicado ao lado		Nº DOC 00008107
DATA DE RECEBIMENTO	IDENTIFICAÇÃO E ASSINATURA DO RECEBEDOR	



LAC COMERCIO E SERVIÇOS DE PRODUTOS LABORATORIAIS LTDA
 AVENIDA DOUTOR MIGUEL COUTO, 179 - CASA
 JARDIM TINEN - ARARAQUARA - SP - CEP: 14.806-090
 TEL/FAX: 16 3397 9061 16 3397 9060

CNPJ: 11.789.451/0001-76
 INSC. EST: 181164199118

E-MAIL: geraldo@grupolac.com.br

C O T A C A O # 00008107

NOME.....: 001697 - FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQ. DO ESTADO DE
 CIDADE/UF.: SÃO PAULO - SP
 BAIRRO.....: ALTO DA LAPA
 ENDEREÇO...: RUA PIO XI, 1500
 TEL/CEL....:
 VENDEDOR...: GERALDO NETO
 CÓG/PAGTO.: 0011 - 15 DIAS
 EMISSÃO...: 02/04/2018
 VENCIMENTO: 17/04/2018

CNPJ/ CPF....: 43.828.151/0002-26
 I. E.....:
 CEP.....: 05.468-901
 COMPLEMENTO.:

ROTA.....: ARARAQUARA
 HORA:

CODIGO	DESCRIÇÃO/ APLICAÇÃO	QTD	VALOR UNIT	VALOR TOTAL
005618	MEMBRANA NITRATO DE CELULOSE LISA 3,00UM 47MM C/100	2	190,00	380,00
004942	PLACA DE PETRI 90X15MM PCT C/ 20 - K30-90150	30	7,80	234,00
SUB TOTAL.....:				614,00
DESCONTO.....:				0,00
ACRESCIMO.....:				0,00
TOTAL.....:				614,00

PONTO DE REFERENCIA/ ENTREGA...

OBSERVAÇÕES...

PRAZO DE ENTREGA: 15 DIAS.
 VALIDADE DA PROPOSTA: 5 DIAS
 (SUJEITO A ALTERAÇÃO DE ACORDO C/ A VARIAÇÃO CAMBIAL)
 FATURAMENTO MÍNIMO: R\$ 150,00
 BANCO DO BRASIL - AG: 3405-3 C/C: 76292-X

Identificação do Emitente IDEXX LABORATORIES IDEXX BRASIL LABORATORIOS LTDA Rua Santa Clara, 236 - Parque Industrial San Jose Coia - SP CEP: 06.715-867 Telefone: 113095564911		DANFE DOCUMENTO AUXILIAR DA NOTA FISCAL ELETRONICA 0 - ENTRADA 1 - SAIDA Nº 79199 Série: 1 Folha: 1 / 1	 Chave de acesso 3517 1200 3774 5500 0120 5500 1000 0791 9914 0396 4544 Consulta de autenticidade no portal da NF-e http://www.nfe.fazenda.gov.br/portal/ Protocolo de autorização de uso 135170833854434 - 19/12/2017 17:50:36
NATUREZA DA OPERAÇÃO Venda Nacional / A			
INSCRIÇÃO ESTADUAL 278284922111	IE SUBST. TRIBUTÁRIO	CNPJ 00.377.455/0001-20	

DESTINATÁRIO REMETENTE		CNPJ / CPF	DATA DE EMISSÃO
NOME / RAZÃO SOCIAL FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO		43.828.151/0002-26	19/12/2017
ENDEREÇO RUA PIO XI, 1500	Bairro / Distrito ALTO DE PINHEIROS	CEP 05 468-901	DATA ENTRADA/ SAÍDA
MUNICÍPIO Sao Paulo	FONE / FAX 1633739515	UF SP	HORA DA SAÍDA
FATURA/ DUPLICATAS Fatura: 1 Vencimento: 18/01/2018 Valor: 13.611,18			

CÁLCULO DO IMPOSTO		BC ICMS SUBSTITUIÇÃO	VALOR DO ICMS SUBSTITUIÇÃO	VALOR TOTAL DOS PRODUTOS
BASE DE CÁLCULO DO ICMS 13.611,18	VALOR DO ICMS 2.450,01	0,00	0,00	13.611,18
VALOR DO FRETE 0,00	VALOR DO SEGURO 0,00	DESCONTO 0,00	OUTRAS DESPESAS ACESSÓRIAS 0,00	VALOR DO IPI 0,00
				VALOR TOTAL DA NOTA 13.611,18

TRANSPORTADOR / VOLUMES TRANSPORTADOS		FRETE POR CONTA	CÓDIGO ANTI	PLACA DO VEÍCULO	UF	CNPJ / CPF
RAZÃO SOCIAL KARGA FACIL LOGISTICA E TRANSPORTES LTDA		0 - Emitente				12.329.985/0001-82
ENDEREÇO AV DOUTOR LINO DE MORAES LEME 290 JARDIM AEROPORTO 04360-00	MUNICÍPIO Sao Paulo	UF SP	INSCRIÇÃO ESTADUAL 147366128119			
QUANTIDADE 1	ESPECIE	MARCA	NUMERAÇÃO 85122	PESO BRUTO 6,00Kg	PESO LÍQUIDO 0,00Kg	

DADOS DO PRODUTO / SERVIÇO													
COD. PROD.	DESCRIÇÃO DO PRODUTO / SERVIÇO	NCM	CST	CFOP	UNID.	QUANT.	V. UNITÁRIO	V. TOTAL	BC ICMS	V. ICMS	V. IPI	ALIQ. ICMS	ALIQ. IPI
98-14289-00	73012 DYNABEAD GC-COMBO 5ML (50T) - R 98-14289-00 - 73012 ANTICORPOS MONO-DISPERSOS PURIFICADOS DE CISTOS DE GIARDIA E OOCISTOS DE CRYPTOSPORIDIUM COVALENTES LIGADOS A SU PERIFERIE DE GRANULOS MICROSCÓPICOS UNIFORMES PARA ANÁLISE IN VITRO DE AMOSTRAS DE ÁGUA, 50 TESTES	3822.00.90	1.00	5102	KG	1,00	13.611,18	13.611,18	13.611,18	2.450,01	0,00	18,00	0,00

CÁLCULO DO ISSQN		VALOR TOTAL DOS SERVIÇOS	BASE DE CÁLCULO ISSQN	VALOR DO ISSQN
INSCRIÇÃO MUNICIPAL 6013982		0,00	0,00	0,00

DADOS ADICIONAIS INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES DADOS PARA DEPOSITO / BANCO DO BRASIL / AGENCIA: 6998-1 / CONTA CORRENTE: 103000-0 EM CASO DE MATERIAL OU DADOS DE FATURAMENTO INCORRETOS, POR GENTILEZA RECURAR A MERCADORTA PROCESSO FAPESP 2012/50522-0 / IHS 14856 OUTUBRONO: REGINA MAURA BUENO FRANCO ENTREGA: BEESC / LABORATORIO LATAE / AV. TRABALHADOR SAO-CARLEENSE, 400 / SAC CARLOS/SP / CEP: 13566-530 / HORARIO: 09H AS 17H A/C. PROFA. LYDA PATRICIA SABOGAL PAZ / DEPARTAMENTO DE HIDRAULICA E SANEAMENTO / FONE: (16) 33739548 OU 33739534 COBRANCA: A/C.: SAIP-IB / FAPESP-RUA MONTEIRO LOBATO, 255 / CIDADE UNIVERSITARIA ZEPHERINO VAZ / CEP: 13063-862 / CAMPINAS / SP RG.: 10.572.126-9 SSP / CPF: 047.172.498-01	RESERVADO AO FISCO
--	--------------------



Razão Social: NL COMÉRCIO EXTERIOR LTDA.
CNPJ: 52.541.273/0001-47 .
Inscrição Estadual: 111.001.175.110

São Paulo, 04 de Agosto de 2017.

PROPOSTA 013-2017

A

Dra. Lyda Patricia Sabogal Paz
Profª. Drª. do Departamento de Hidráulica e Saneamento
Escola de Engenharia de São Carlos
Universidade de São Paulo, Brasil.
E-mail: lysaboga@gmail.com

ITEM	CAT.	DESCRIÇÃO	QTDE.	PREÇO UNIT.	PREÇO TOTAL
01	250050	<p>Merifluor Cryptosporidium/Giardia – 50 ensaios Kit de imunofluorescência direta para a detecção simultânea de oocistos do <i>Cryptosporidium spp</i> e cistos de <i>Giardia spp</i>. Utiliza anticorpos monoclonais para aumentar a sensibilidade. O procedimento todo leva uma hora e meia. O kit contém 25 lâminas com 3 cavidades por lâmina.</p> <p>Marca: Meridian Bioscience</p>	02 KITS	R\$ 2.850,00 (Dois Mil Oitocentos e Cinquenta Reais)	R\$ 5.700,00 (Cinco Mil e Setecentos Reais)

DEMAIS CONDIÇÕES DA PROPOSTA

- **Validade da proposta:** 30(Trinta) dias;
- **Prazo de entrega:** 45 (Quarenta e Cinco) dias após a confirmação do pedido;
- **Faturamento mínimo:** R\$ 700,00 (Setecentos Reais)
- **Condição de pagamento:** 30 (Trinta) dias;
- **Frete:** CIF.

Atenciosamente,



Natália Paula
Analista de Licitação Junior II
n.paula@nldiagnostica.com.br
Tel. 55 11 5061.4411

www.nldiagnostica.com.br - R. Vigário Albernaz, 367 / 371 - São Paulo - SP - Brazil.



R. Vigário Albernaz, 367/371. Cep. 04134-020 . São Paulo . SP . Brasil
Tel. 55 11 5061.4411 . Fax. 55 11 5061.4921
licitacao@nldiagnostica.com.br . www.nldiagnostica.com.br

