



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL, ARQUITETURA E URBANISMO
DEPARTAMENTO DE SANEAMENTO E AMBIENTE

**Avaliação de dano morfológico em oocistos de *Cryptosporidium* spp.
e cistos de *Giardia* spp. pela ação da peroxidação assistida por luz
ultravioleta (H₂O₂/UV)**

REGIANE APARECIDA GUADAGNINI FAGNANI

Dissertação apresentada à Comissão de pós-graduação da Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil, área de concentração Saneamento e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Guimarães

Co-orientadora: Dr^a. Regina Maura Bueno Franco

Campinas, SP
AGOSTO / 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

F137a Fagnani, Regiane Aparecida Guadagnini
Avaliação de dano morfológico em oocistos de
Cryptosporidium spp. e cistos de Giardia spp. pela ação
da peroxidação assistida por luz ultravioleta (H₂O₂/UV)
/ Regiane Aparecida Guadagnini Fagnani. --Campinas,
SP: [s.n.], 2010.

Orientadores: José Roberto Guimarães, Regina Maura
Bueno Franco.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e
Urbanismo.

1. Processos oxidativos avançados. 2.
Cryptosporidium. 3. Giardia. 4. Desinfecção. 5.
Peroxidação. I. Guimarães, José Roberto. II. Franco,
Regina Maura Bueno. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e
Urbanismo. IV. Título.

Título em Inglês: Evaluation of morphological damage in Cryptosporidium spp.
oocysts and Giardia spp. cysts using peroxidation assisted by
ultraviolet light (H₂O₂/UV) process

Palavras-chave em Inglês: Advanced oxidative processes, Cryptosporidium,
Giardia, Disinfection, Peroxidation

Área de concentração: Saneamento e Ambiente

Titulação: Mestre em Engenharia Civil

Banca examinadora: Edson Aparecido Abdul Nour, Luiz Antonio Daniel

Data da defesa: 20/08/2010

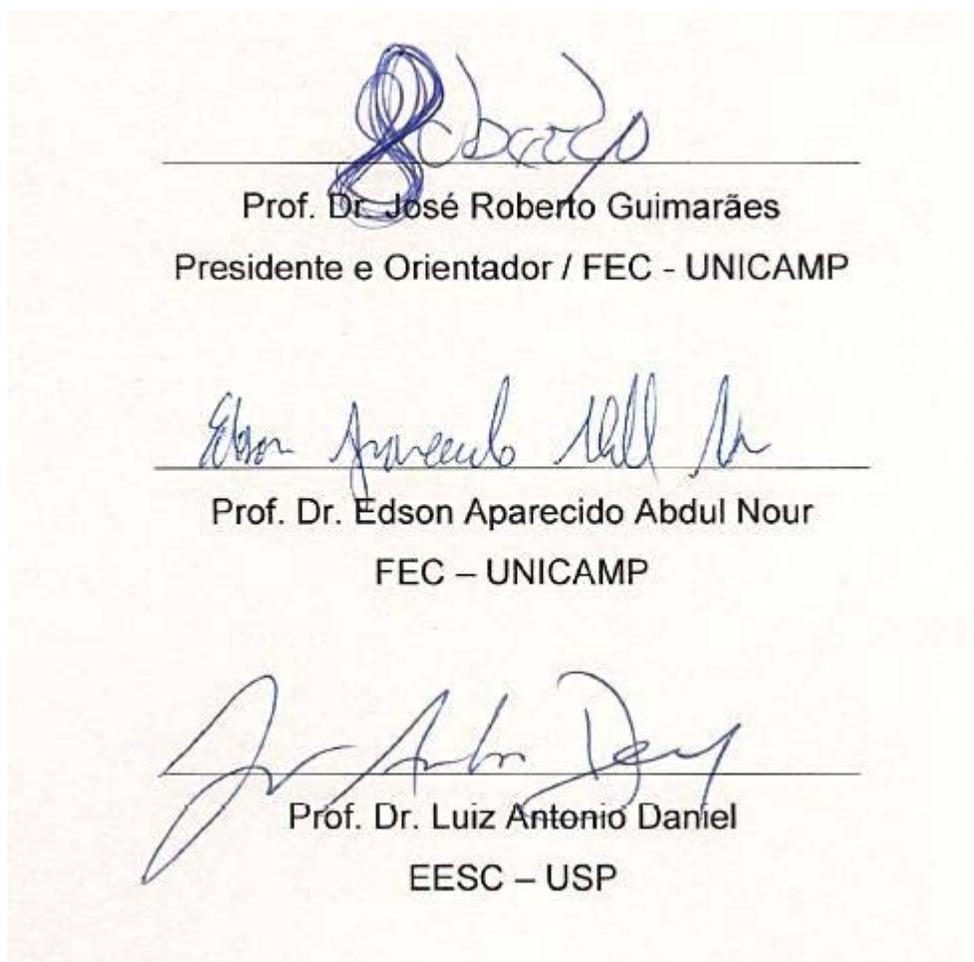
Programa de Pós Graduação: Engenharia Civil

Folha de aprovação

Autor: Regiane Aparecida Guadagnini Fagnani

Título: Avaliação de dano morfológico em oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. pela ação da peroxidação assistida por luz ultravioleta (H₂O₂/UV)

Dissertação de Mestrado aprovada pela Banca Examinadora, constituída por:



Prof^a. Dr^a. Anne Hélène Fostier – IQ/UNICAMP (Suplente)
Prof. Dr. Ricardo de Lima Isaac – FEC/UNICAMP (Suplente)

Campinas, 20 de agosto de 2010

*À Nossa Sra. Aparecida, que tanto olha e
roga por mim e à Deus, que ouve seu rogo...*

*À minha família, principalmente meus pais, pelo amor,
compreensão e apoio incondicionais.*

*Ao Neto pelo apoio, companheirismo e amor, essenciais
para minhas conquistas e concretização de meus sonhos.*

Agradecimentos

Inicialmente ao Prof. José Roberto Guimarães, pela confiança depositada em mim, mesmo tendo uma formação não reconhecida por muitos dentro da própria Unicamp... Além disso, agradecer a orientação, incentivo e apoio durante todo o trabalho, independente do grau de dificuldade, da burocracia ou horário em que necessitei de sua ajuda. A sabedoria compartilhada, presente em suas ações do dia-a-dia, só me fizeram ser capaz de superar as adversidades que encontrei mesmo dentro do meio acadêmico e me incentivou a seguir em frente com meus estudos.

À professora Regina Maura pela confiança depositada ao me proporcionar à oportunidade de conhecer e entender um pouco sobre a parasitologia ambiental, mesmo sabendo das dificuldades que eu enfrentaria por não ser bióloga. À confiança e apoio fornecidos, o meu muito obrigado.

À pós-doutoranda Luciana, que com paciência e sabedoria profissional e muitas vezes de mãe, soube me auxiliar tão bem no desenvolvimento de um trabalho que envolveu tanto o meu crescimento profissional quanto o pessoal. Por todos os momentos de profissionalismo e os de descontração e desabafo que você me proporcionou, o meu sempre muito obrigado minha amiga!

Ao apoio técnico do sr. Joel da FEC, do Mário, da Oficina Mecânica do Instituto de Química, e da prof. Dr^a. Anne Hélène Fostier, também da Química, que talvez, mesmo sem saberem o tamanho de sua importância, foram fundamentais para consolidação instrumental do trabalho experimental.

A atenção, respeito e profissionalismo do sr. Nilson Branco do Laboratório de Parasitologia e do pessoal do L1 e da Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao prof. Edson Ap. Abdul Nour pela prontidão em me auxiliar nos momentos de “apuro burocrático” com os procedimentos necessários a serem realizados na Secretaria de pós, sem esquecer de agradecer também as considerações e sugestões muito bem-vindas decorrente de sua participação na banca de qualificação deste trabalho.

À banca, titulares e suplentes, que prontamente dispuseram seu tempo para contribuírem com seu conhecimento e experiência e enriquecer mais este trabalho.

Aos amigos do LABSAN, Lúgia, Fernando, Ângela e prof. Edson, pelo apoio técnico e momentos de descontração.

À minha família que sempre me apoiou e esteve ao meu lado, com amor, paciência e conforto, mesmo quando percorri os caminhos mais difíceis de serem acompanhados. Por toda a paciência, otimismo e incentivo, o meu muito obrigado.

Ao Enelton, que é minha família agora também. Por todo o carinho, amor, paciência e dedicação fundamentais para me auxiliar a trilhar os caminhos designados com menos dor e mais alegria, felicidade, fé e confiança. Vitórias compartilhadas, sempre.

Às novas amigas Lívia e Milena, que cada qual em seu momento e sua individualidade foram essenciais para compartilhar a ansiedade, dúvidas e felicidade durante o desenvolvimento deste trabalho.

As minhas amigas Carol, Leila, Patty e Lílian, pelas oportunidades de descontração e a amizade sempre compartilhada.

A minha amiga Paula, sempre presente em meu pensamento.

A todos, que direta ou indiretamente auxiliaram de forma pessoal ou profissional, incentivando ou criticando este trabalho, pois, de uma forma ou de outra, deve ter contribuído para que ele acontecesse e fosse finalizado.

A Deus, que é a vida, a verdade e a luz.

A FAPESP pela bolsa concedida e pelo CNPq pelo fomento à pesquisa.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi inferir a eficiência do Processo Oxidativo Avançado (POA): H_2O_2/UV , na inativação de oocistos e cistos dos protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. respectivamente, em amostras de solução aquosa com características de água natural. Utilizaram-se concentrações de peróxido de hidrogênio de 15 mg L^{-1} e 6 g L^{-1} e dose de UV de 44 mW s cm^{-2} e $5.472\text{ mW s cm}^{-2}$, respectivamente. A eficiência do POA foi inferida a partir da avaliação do dano morfológico causado pelo processo na parede de oocistos e cistos, sendo observados pelo método de Reação de Imunofluorescência Direta (RID) e mediante Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). O POA foi mais eficiente em causar dano na parede de *Giardia duodenalis* e oocistos de *Cryptosporidium* spp. Usando a menor dose de UV e concentração de peróxido, o POA causou dano de forma e/ou fluorescência em 45,3 % dos cistos de *G. duodenalis* e em 61,9 % dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. Entretanto quando utilizada a alta dose de UV e concentração de peróxido, somente dois oocistos *Cryptosporidium* spp. foram observados. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. mostrou maior sensibilidade ao POA do que cistos de *Giardia duodenalis*.

Palavras-chave: processos oxidativos avançados, *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., desinfecção, peroxidação/UV, peroxidação.

Abstract

The aim of this study was to infer the efficiency of advanced oxidative processes (AOP): H₂O₂/UV in inactivation of oocysts and cysts of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* respectively, in aqueous solution's samples with characteristics of natural water. It was used concentrations of hydrogen peroxide of 15 mg L⁻¹ and 6 g L⁻¹ and UV dose was of 44 mW s cm⁻² and 5.472 mW s cm⁻², respectively. Direct Immunofluorescence Antibody Assay (IFA) and Scanning Electron Microscopy (SEM) were used to evaluate oocysts and cysts walls damage caused by the process. The AOP was efficient in damage *G. duodenalis* cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts wall. Using a small dose of UV irradiation and concentrations of hydrogen peroxide, AOP caused damage on the shape and/or alteration of fluorescence in 45.3 % cysts of *G. duodenalis* and 61.9 % oocysts of *Cryptosporidium* spp. However, when used higher UV dose and concentrations of hydrogen peroxide only two *Cryptosporidium* spp. oocysts were observed. *Cryptosporidium* spp. oocysts showed higher sensibility than cysts of *G. duodenalis* to the peroxidation assisted by ultraviolet light process.

Key words: advanced oxidative processes, *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., disinfection, peroxidation /UV, peroxidation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01: Esquema do reator fotoquímico.....	50
Figura 02: Sistema do reator fotoquímico utilizado nos experimentos, sendo (1) reator fotoquímico, (2) bomba peristáltica, (3) reservatório, (4) agitador magnético e (5) recipiente de coleta após processo.....	51
Figura 03: Suporte para filtração.....	56
Figura 04: Raspagem (a) e Lavagem (b) da membrana.....	57
Figura 05: Lavagem do sedimento e centrifugação (a) e Transferência para tubo de microcentrifugação (b).....	57
Figura 06: Transferência de alíquota de 5 µL de amostra para poço da lâmina.....	59
Figura 07: Reação da ligação dos epítomos da parede de cistos/oocistos com o anticorpo com FITC e fluorescência para observação.....	60
Figura 08: Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp. visualizado após lavagem do reator (400x).....	68
Figura 09: Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp. (200x).....	68
Figura 10: Cistos de <i>G. duodenalis</i> (200x).....	68
Figura 11: Cistos de <i>G. duodenalis</i> observados no inóculo corado com RID para enumeração das formas (200x).....	70
Figura 12: Número de organismos observados após peroxidação (6 g H ₂ O ₂ /60 min).....	71

Figura 13: Porcentagem e classificação de cistos de <i>G. duodenalis</i> observados após peroxidação (6 g H ₂ O ₂ / 60 min).....	72
Figura 14: Cisto de <i>G. duodenalis</i> corado por RID, classificação A (200x).....	72
Figura 15: Porcentagem e classificação de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. observados após peroxidação (6 g H ₂ O ₂ /60 min).....	73
Figura 16: Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp. (A) (400X).....	73
Figura 17: Número de organismos observados após peroxidação (6 g H ₂ O ₂ /30 min).....	74
Figura 18: Porcentagem e classificação de cistos de <i>G. duodenalis</i> observados após peroxidação (6 g H ₂ O ₂ /30 min).....	75
Figura 19: Cisto de <i>G. duodenalis</i> classificação A corado por RID (400x).....	75
Figura 20: Cisto de <i>G. duodenalis</i> classificação D corado por RID (400x).....	76
Figura 21: Porcentagem e classificação de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. observados após peroxidação (6 g H ₂ O ₂ /30 min).....	76
Figura 22: Oocisto classificação B (a) e classificação C (b) corado por RID (200x).....	77
Figura 23: Cisto de <i>G. duodenalis</i> em amostra bruta 3500x (a) e após peroxidação 3500x (b).....	77
Figura 24: Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostra bruta 3500x (a) e após peroxidação 3500x (b).....	78
Figura 25: Número de organismos observados após POA (6 g H ₂ O ₂ / 5.472 mW s cm ⁻² UV).....	79

Figura 26: Porcentagem e classificação de cistos de <i>G. duodenalis</i> observados após POA (6 g H ₂ O ₂ / 5.472 mW s cm ⁻² UV).....	80
Figura 27: Cisto de <i>G. duodenalis</i> classificação A corado por RID após POA (400x).....	80
Figura 28: Cisto de <i>G. duodenalis</i> classificação C corado por RID (600x).....	81
Figura 29: Cisto de <i>G. duodenalis</i> classificação D corado por RID após POA (400x)...	81
Figura 30: Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. classificação D corado por RID após POA (200x).....	82
Figura 31: Número de organismos observados após POA (6 g H ₂ O ₂ / 2.736 mW s cm ⁻² UV).....	83
Figura 32: Porcentagem e classificação de cistos de <i>G. duodenalis</i> observados após POA (6 g H ₂ O ₂ / 2.736 mW s cm ⁻² UV).....	83
Figura 33: Cisto de <i>G. duodenalis</i> classificação B corado por RID após POA (400x)....	84
Figura 34: Cisto de <i>G. duodenalis</i> classificação D corado por RID (400x).....	84
Figura 35: Porcentagem e classificação de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. observados após POA (6 g H ₂ O ₂ / 2.736 mW s cm ⁻² UV).....	85
Figura 36: Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. classificação A corado por RID após POA (200x).....	85
Figura 37: Cisto de <i>G. duodenalis</i> em amostra bruta 3500x (a) e após POA 4300x (b).....	87
Figura 38: Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostra bruta 4300x (a) e após POA 3300x (b).....	87

Figura 39: Número de cistos de <i>G. duodenalis</i> observados após peroxidação e POA.....	88
Figura 40: Número de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. observados após peroxidação e POA.....	89
Figura 41: Cisto de <i>G. duodenalis</i> em amostra bruta 3500x (a), após peroxidação 3500x (b) e após POA 4300x (c)	90
Figura 42: Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostra bruta 4300x (a), após peroxidação 3500x (b) e após POA 3300x (c).....	90
Figura 43: Número de organismos observados após peroxidação (15 mg H ₂ O ₂ / 5,5 s).....	92
Figura 44: Porcentagem e classificação de cistos de <i>G. duodenalis</i> observados após peroxidação (15 mg H ₂ O ₂ / 5,5 s).....	93
Figura 45: Cisto de <i>G. duodenalis</i> classificação A corado com RID (600x).....	93
Figura 46: Cistos de <i>G. duodenalis</i> classificação B corados com RID (600x).....	94
Figura 47: Cisto de <i>G. duodenalis</i> classificação B corado com RID (600x).....	94
Figura 48: Porcentagem e classificação de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. observados após peroxidação (15 mg H ₂ O ₂ / 5,5 s).....	95
Figura 49: Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp., classificação A e cisto de <i>G. duodenalis</i> classificação B corados por RID (400x).....	95
Figura 50: Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. classificação B corados por RID (400x).....	96
Figura 51: Cisto de <i>G. duodenalis</i> em amostra bruta 3500x (a) e após peroxidação 3000x (b).....	96

Figura 52: Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostra bruta 3000x (a) e após peroxidação 3000x (b)	96
Figura 53: Número de organismos observados após POA (15 mg H ₂ O ₂ /44 mW s cm ⁻² UV).....	97
Figura 54: Porcentagem e classificação de cistos de <i>G. duodenalis</i> observados após POA (15 mg H ₂ O ₂ /44 mW s cm ⁻² UV).....	98
Figura 55: Cisto de <i>G. duodenalis</i> classificação A corado com RID (400x).....	98
Figura 56: Cisto de <i>G. duodenalis</i> classificação B corado por RID (600x).....	99
Figura 57: Cisto de <i>G. duodenalis</i> classificação B corado por RID (600x).....	99
Figura 58: Porcentagem e classificação de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. observados após POA (15 mg H ₂ O ₂ /44 mW s cm ⁻² UV).....	100
Figura 59: Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp. classificação A corados com RID (400x).....	100
Figura 60: Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp. classificação B corado com RID (200x).....	101
Figura 61: Cisto de <i>G. duodenalis</i> em amostra bruta 3500x (a) e após POA 3000x (b).....	101
Figura 62: Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostra bruta 3000x (a) e após POA 3000x (b)	102
Figura 63: Número de cistos de <i>G. duodenalis</i> após os 6 ensaios de peroxidação e 6 ensaios de POA.....	103
Figura 64: Número de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. após os 6 ensaios de peroxidação e 6 ensaios de POA.....	104

Figura 65: Cisto de <i>G. duodenalis</i> em amostra bruta 3500x (a), após peroxidação 3000x (b) e após POA 3000x (c).....	105
Figura 66: Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostra bruta 3000x (a), após peroxidação 3000x (b) e após POA 3000x (c).....	105
Figura 67: Campo microscópico após peroxidação (a) e POA (b) na MEV (650x).....	106
Figura 68: Curva analítica para determinação da concentração de H ₂ O ₂	107
Figura 69: Número de cistos observados de <i>G. duodenalis</i> após POA.....	109
Figura 70: Porcentagem de redução de cistos de <i>G. duodenalis</i> após POA.....	110
Figura 71: Número de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. após POA.....	111
Figura 72: Porcentagem de redução de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. após POA.....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Taxonomia das espécies de <i>Giardia</i> e seus principais hospedeiros.....	16
Tabela 02: Espécies conhecidas de <i>Cryptosporidium</i> e seu principal hospedeiro.....	19
Tabela 03: Potenciais redox de algumas espécies oxidantes.....	34
Tabela 04: Sistemas de Processos Oxidativos Avançados (POA).....	35
Tabela 05: Número de ensaios e condições experimentais dos processos avaliados...	49
Tabela 06: Composição da água sintética.....	52
Tabela 07: Especificações químicas da água sintética.....	52
Tabela 08: Avaliação visual dos danos nos organismos após RID.....	60
Tabela 09: Consumo de peróxido de hidrogênio nos diferentes tipos de processos.....	107

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	7
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3.1 Protozoários patogênicos de veiculação hídrica.....	13
3.1.1 <i>Giardia</i> spp.....	15
3.1.2 <i>Cryptosporidium</i> spp.....	17
3.2 Surtos de criptosporidiose e giardiose no mundo.....	22
3.3 A ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp e <i>Giardia</i> spp. em amostras ambientais.....	24
3.4 Segurança da água potável: o tratamento de água e a remoção de protozoários.....	28
3.5 Técnicas de detecção dos protozoários em amostras de água.....	31
3.6 Processos de desinfecção de água: os POA como alternativa.....	33
3.7 O peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e sua ação.....	37
3.8 A luz UV e sua ação.....	39
3.9 A peroxidação assistida por luz UV.....	44
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1 Sistema de tratamento.....	50
4.2 Preparo da “água sintética”.....	51
4.3 Preparo do inóculo contendo oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia duodenalis</i>	52

4.4 Contaminação artificial das amostras com oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia duodenalis</i> e ensaios com H ₂ O ₂ e H ₂ O ₂ /UV.....	53
4.5 Técnica de concentração das amostras por Filtração em Membrana.....	55
4.6 Avaliação da eficiência de processos.....	57
4.6.1 Reação de Imunofluorescência Direta (RID).....	58
4.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	61
4.7 Limpeza do reator	62
4.8 Controle da metodologia de recuperação dos protozoários.....	62
4.8.1 Controle negativo.....	63
4.8.2 Controle positivo.....	63
4.9 Concentração de Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂).....	64
4.10 Tratamento dos resíduos gerados.....	64
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
5.1 Controle-negativo.....	67
5.2 Controle-positivo.....	68
5.3 Processos oxidativos utilizados.....	70
5.3.1 Primeira etapa de experimentos.....	71
5.3.1.1 Processo Químico: Peroxidação (6 g H ₂ O ₂ /60min).....	71
5.3.1.2 Processo Químico: Peroxidação (6 g H ₂ O ₂ /30 min).....	74
5.3.1.3 Processo Oxidativo Avançado: Peroxidação Assistida por Luz Ultravioleta (6 g H ₂ O ₂ / 5.472 mW s cm ⁻² UV).....	79
5.3.1.4 Processo Oxidativo Avançado: Peroxidação Assistida por Luz Ultravioleta (6 g H ₂ O ₂ / 2.736 mW s cm ⁻² UV).....	82
5.3.1.5 Comparação entre os processos peroxidação e POA.....	87
5.3.2 Segunda etapa de experimentos.....	92
5.3.2.1 Processo Químico: Peroxidação (15 mg H ₂ O ₂ / 5,5 s).....	92
5.3.2.2 Processo Oxidativo Avançado: Peroxidação Assistida por Luz Ultravioleta (15 mg H ₂ O ₂ /44 mW s cm ⁻² UV).....	97
5.3.2.3 Comparação entre os processos.....	102
5.4 Monitoramento do peróxido de hidrogênio	106

5.4.1 Monitoramento do Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) da Primeira etapa de experimentos.....	106
5.4.2 Monitoramento do Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) da Segunda etapa de experimentos.....	108
5.5 Comparação entre as concentrações do oxidante e a dose da luz UV utilizadas nos ensaios de POA.....	108
6. CONCLUSÃO.....	115
7. REFERÊNCIAS.....	119

Capítulo 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A água tem sido motivo de grande preocupação em todo o mundo, principalmente com respeito à sua quantidade, qualidade, tratamento e distribuição. Atualmente, a disponibilidade desse recurso é um fator limitante no desenvolvimento de muitas regiões do Planeta. Já se sabe que um terço da população mundial vive em áreas sujeitas à pressão da falta de água e, este percentual aumenta à medida que cresce a demanda do tratamento para torná-la uma água potável (ONU, 2006).

No Brasil, pôde-se verificar essa preocupação, com a publicação da Portaria 518 em 25 de março de 2004 (Brasil, Ministério da Saúde, 2004), que “estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências” no que diz respeito a características de potabilidade.

A necessidade da designação de potabilidade surge no conhecimento da contaminação de corpos d’ água por compostos tóxicos e agentes patogênicos, causadores de enfermidades em homens e outros animais.

Assim, surgiu a necessidade da implantação de um sistema de tratamento de água, para que esta se adequasse a padrões de potabilidade e pudesse ser consumida sem gerar prejuízos à saúde humana.

Porém, sabe-se que mesmo águas que atendam os padrões de potabilidade definidos em legislações, podem causar problemas de saúde pública, como o que ocorreu em Milwaukee (EUA), onde a água distribuída para a população que atingia os padrões exigidos pela legislação americana, foi a que veiculou os oocistos de *Cryptosporidium* spp. causando o maior surto de veiculação hídrica de criptosporidiose registrado até o momento (CORSO *et al*, 2003).

Um agravante deste problema é o fato de que muitos dos corpos hídricos receptores de resíduos (esgoto doméstico tratado ou não), também são fontes de captação para tratamento e distribuição da água para a população. Conseqüentemente, a ausência de tratamento de efluentes, ou mesmo a disposição de efluentes tratados, podem resultar na contaminação destes mananciais, prejudicando a eficiência final no tratamento de água.

Além do mais, sabe-se que a etapa de desinfecção usualmente utilizada nas estações de tratamento de água (cloração) é ineficiente quanto à segurança da água com relação a alguns microrganismos, tais como os protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. (RYU *et al*, 2008).

O surgimento de surtos de doenças de veiculação hídrica, causados por protozoários intestinais, vem emergindo como um dos principais problemas de Saúde Pública nos últimos 28 anos, mesmo com a adoção de regulamentos cada vez mais restritivos, em países como os Estados Unidos e Reino Unido, e os avanços das tecnologias de tratamento (SMITH *et al*, 2006a).

Em decorrência dos possíveis problemas de saúde pública causada por estes protozoários, na Portaria 518/2004, é recomendada a inclusão da pesquisa de organismos patogênicos, com o objetivo de atingir, como meta, um padrão de ausência de enterovírus, cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp., dentre outros.

Justificativa

Pela necessidade de mais estudos sobre formas de desinfecção que inativem oocistos e cistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., respectivamente, e, em função dos bons resultados obtidos pelos Processos Oxidativos Avançados (POA) na inativação de outros microrganismos, como as bactérias e seus esporos, estudos da

ação oxidativa destes processos sobre estes protozoários patogênicos são pertinentes, como alternativa de desinfecção de águas destinadas ao consumo humano.

Capítulo 2

Objetivos

2. OBJETIVOS

- Geral:

Inferir a eficiência do processo oxidativo avançado, H₂O₂/UV, na inativação dos protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis*. em amostras de água preparada em laboratório.

- Específicos:

- a) Avaliar a ação de um processo químico por peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e de um POA (H₂O₂/UV) sobre oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos *G. duodenalis* em amostras de água sintética.
- b) Observar os danos morfológicos na parede dos cistos e oocistos dos protozoários, após os processos propostos, utilizando Reação de Imunofluorescência Direta e Microscopia Eletrônica de Varredura.
- c) Inferir a eficiência dos tratamentos em função do dano morfológico causado na parede de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos *G. duodenalis*.

Capítulo 3

Revisão da Literatura

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Protozoários patogênicos de veiculação hídrica

São vários os organismos de veiculação hídrica, causadores de doenças ao homem, tendo entre eles as bactérias (*Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila*, *Vibrio cholera*); os vírus (enterovírus, vírus da hepatite A, rotavírus); os protozoários (*Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp.), e os helmintos (*Ascaris lumbricoides*). Porém, dentre estes organismos, os protozoários tem emergido nos últimos anos como um dos principais agentes de veiculação hídrica, sendo detectados em vários países do mundo e causando sérios problemas de Saúde Pública (MACPHERSON, 2005).

Os protozoários infectam um grande número de vertebrados, sendo que espécies dos gêneros *Cryptosporidium* e *Giardia* causam a criptosporidiose e giardiose, respectivamente, que se caracteriza como uma gastroenterite. A giardiose, cujo agente etiológico é a *Giardia* spp., é citada como o agente mais comum de diarreia decorrente por protozoários em todo o mundo (SMITH *et al*, 2007), e considerada uma infecção re-emergente, com significativa morbidade humana (CACCIÒ *et al*, 2005).

A criptosporidiose é considerada uma infecção emergente (GÓMEZ-COUSO *et al*, 2005), possuindo algumas espécies que já foram relacionadas com infecções humanas: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. canis*, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. suis* e *C. andersoni* (CHALMERS, DAVIES, 2010). Segundo Cacciò *et al* (2005), em grandes densidades populacionais (como ocorrem com o gado) e o contato muito próximo entre as pessoas (como os que ocorrem em creches e em banhos recreacionais), é favorecida a transmissão direta ou indireta entre os hospedeiros infectados e os indivíduos susceptíveis.

As formas de transmissão ocorrem por contato fecal-oral em rotas variantes como contato direto: pessoa-pessoa e contato com outro animal portador de diarreia. A

transmissão zoonótica é bem estabelecida para *Cryptosporidium* spp. e somente para 2 subgenótipos de *Giardia* e, o contato indireto, que se dá pela ingestão de alimentos e/ou água contaminados com os oocistos e cistos (CACCIÒ *et al*, 2005). O oocisto de *Cryptosporidium* spp. pode ainda ser inalado (em função da formação de aerossóis de água contaminada), apesar de ser uma forma de transmissão pouco documentada (TZIPORI, WARD, 2002).

O oocisto de *Cryptosporidium* spp. e o cisto de *Giardia* spp. são os estádios para a dispersão, sobrevivência e proteção da infectividade do parasito, e também são os de maior importância para detecção e identificação das doenças (FAYER *et al*, 2000).

As características destes dois protozoários que os justificam como os atores principais de um grande número de surtos é que o hospedeiro infectado elimina por meio de suas fezes as formas já infectantes, que são muito resistentes ao *stress* do meio e aos processos comumente utilizados para se realizar a desinfecção das águas e esgotos (EMELKO, 2003; JOACHIM, 2004; KARANIS *et al*, 2006; CACCIÒ, RYAN, 2008). Além disso, essas formas resistentes são eliminadas em grande número (10^6 a 10^8 cistos por grama de fezes) e uma baixa dose é suficiente para causar a infecção (FAYER *et al*, 2000; JOACHIM, 2004; KARANIS *et al*, 2007; NEIRA-MUNOZ *et al*, 2007; CACCIÒ, RYAN, 2008).

Utilizando-se de experimentos com voluntários humanos, demonstrou-se que a dose média infectante para se adquirir a criptosporidiose é ao redor de 9 a 1.042 oocistos, dependendo da cepa de *Cryptosporidium* spp. e, para *Giardia* spp., entre 10 e 25 cistos para o desenvolvimento da giardiose (FRANCO, 2007).

A dificuldade da detecção de cistos e oocistos em amostras ambientais consiste em seu pequeno tamanho, de 8 a 15 μm , e 2,94 a 8,25 μm , respectivamente (MONIS *et al*, 2009; SMITH, NICHOLS, 2010). A água tem sido uma importante rota de disseminação das formas infectantes destes protozoários, uma vez que seu tamanho e

sua baixa taxa de sedimentação possibilitam sua disseminação e manutenção em ambientes aquáticos (LOBO *et al*, 2009).

Segundo dados da literatura, oocistos de *Cryptosporidium* spp. podem manter-se infectantes por 6 meses em água doce, com temperatura entre 0 e 20 °C e na água do mar com 35 % de salinidade por 40 dias a 18 °C (FAYER *et al*, 2004). Cistos de *Giardia* spp. mantêm sua infectividade por até 2 meses em ambientes aquáticos com temperatura de 8 °C (CACCIÒ *et al*, 2003) e por 6 meses a 20 °C (FRANCO, 2007).

3.1.1 *Giardia* spp.

A primeira descrição detalhada do parasita *Giardia* data de 1859, sendo sua relevância clínica no contexto de saúde pública e ambiental revelada somente no final do século 20. Atualmente a *Giardia* é associada com aproximadamente 280 milhões de infecções por ano em todo o mundo (GEURDEN *et al*, 2010).

São conhecidas seis espécies de *Giardia*, conforme apresentado na Tabela 01. A espécie que causa a doença em humanos é a *G. duodenalis*, sendo empregadas como sinonímia *G. lamblia* e *G. intestinalis*. As variantes de *G. duodenalis* encontradas em mamíferos é resultado de informações baseadas em diferenças genéticas, sendo divididas em 7 grupos: as assembléias (genótipos), que vão de A a G (SMITH *et al*, 2007).

Quanto à epidemiologia da giardiose, poucos progressos têm sido feitos, já que não são todos os isolados de *G. duodenalis* que se estabelecem em culturas *in vitro*, limitando, portanto, o conhecimento sobre epidemiologia e transmissão da de *Giardia* (THOMPSON, 2004). Somente a *G. duodenalis* (genótipos A e B) tem então sido associada com infecções humanas (CACCIÒ, RYAN, 2008). Das espécies associadas a

doenças em humanos a variação de tamanho dos cistos é entre 8 -15 μm (FRANCO, 2007).

Tabela 01. Taxonomia das espécies de *Giardia* e seus principais hospedeiros.

Espécies	Principais hospedeiros
<i>Giardia duodenalis</i> (Assembléia A)	Humanos e outros animais
<i>G. duodenalis</i> (Assembléia B)	Humanos e outros animais
<i>G. duodenalis</i> (Assembléia C, D)	Canídeos
<i>G. duodenalis</i> (Assembléia E)	Bovinos e outros animais de criação
<i>G. duodenalis</i> (Assembléia F)	Felinos
<i>G. duodenalis</i> (Assembléia G)	Roedores
<i>G. agilis</i>	Anfíbios
<i>G. ardeae</i>	Pássaros
<i>G. microti</i>	Roedores
<i>G. muris</i>	Roedores
<i>G. psittaci</i>	Pássaros

Fonte: Adaptado de CACCIÒ, SPRONG (2010)

A *Giardia* spp. possui dois estádios em seu ciclo de vida: o trofozoíto e o cisto. O trofozoíto é um estágio reprodutivo, sendo a sua reprodução assexuada, já o cisto é a forma de dispersão do protozoário, resistente ambientalmente (DAWSON, 2005).

Estudos baseados em cromatografia e espectrometria de massas indicam que a parede dos cistos de *G. lamblia* e *G. muris* possuem 43 % de carboidratos (massa seca), sendo que a parede é formada basicamente de um complexo de carboidratos e peptídeos (ERLANDSEN *et al*, 1996).

A giardiose se desenvolve após a ingestão do cisto pelo hospedeiro. O ambiente ácido do estômago e os sais de bile permitem a liberação do trofozoíto contido no

interior do cisto. Há a fixação do trofozoíto na superfície do intestino e a liberação de cistos via fezes, contaminando o meio ambiente (MONIS, THOMPSON, 2003).

Após a contaminação, o hospedeiro inicia a liberação de cistos via fezes em um período aproximado de 3 dias (GEURDEN *et al*, 2010). O período de incubação da giardiose é de 1 a 2 semanas e os sintomas se desenvolvem de 2 a 4 semanas. Há a possibilidade de 60 % dos indivíduos infectados serem assintomáticos ou apresentarem sintomas não específicos. O desenvolvimento de diarreia é o sintoma mais comum da doença, e um estudo realizado por Katz *et al*. (2006) cita este sintoma em 92 % dos casos.

A giardiose pode ser aguda ou crônica, requerendo no caso crônico, o uso de medicamento para seu tratamento, realizado com componentes a base de albendazol e nitroimidazol (MONIS, THOMPSON, 2003; SAVIOLI *et al*, 2006).

A giardiose quando em crianças muito pequenas pode levar a um déficit no desenvolvimento físico e cognitivo (CÓRDON *et al*, 2008).

3.1.2 *Cryptosporidium* spp.

Cryptosporidium spp. é um parasita intracelular obrigatório que infecta células epiteliais que revestem a superfície dos tratos intestinais e respiratórios (ROCHELLE *et al*, 2005).

Segundo Carey *et al* (2004) foi Ernest Edward Tyzzer quem fez em 1907 a primeira descrição do *Cryptosporidium*, sendo que este só foi reconhecido como patogênico em 1955 após um surto de diarreia em um plantel de perus. Foi com o surgimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), que ocorreram os primeiros relatos de infecções por *Cryptosporidium* spp. como agente causador de diarreia em indivíduos com o sistema imunológico comprometido e, nos últimos 25 anos

ele tem emergido como um importante patógeno humano (SMITH, NICHOLS, 2010). Entretanto, este protozoário só passou a ser identificado como agente de surtos decorrentes de veiculação hídrica após 1984 (D'ANTONIO *et al*, 1985).

Cryptosporidium é um gênero com espécies e genótipos, que podem infectar uma grande variação de hospedeiros. A deficiência para elucidar a especificidade de hospedeiro e sinalizar os possíveis meios de transmissão para os seres humanos e outros animais era decorrente da dificuldade de diferenciação entre as espécies (JOACHIM, 2004). Porém, com o avanço das técnicas moleculares permitiu-se a determinação de novas espécies, sendo estas relatadas nos últimos anos (CACCIÒ *et al*, 2005). Existem hoje 20 espécies de *Cryptosporidium* descritas, como apresentado na Tabela 02 (SMITH, NICHOLS, 2010).

Tabela 02: Espécies conhecidas de *Cryptosporidium* e seu principal hospedeiro.

Espécie de <i>Cryptosporidium</i>	Principal hospedeiro
<i>C. hominis</i>	humano
<i>C. parvum</i>	gado, ruminante, humano
<i>C. meleagridis</i>	peru, humano
<i>C. canis</i>	cachorro
<i>C. felis</i>	gato
<i>C. suis</i>	porco
<i>C. wrairi</i>	porcos da Índia
<i>C. muris</i>	roedores
<i>C. andersoni</i>	gado
<i>C. bovis</i>	gado
<i>C. ryanae</i>	gado
<i>C. xiaoi</i>	ovelha
<i>C. fayeri</i>	canguru vermelho
<i>C. macropodum</i>	canguru cinza oriental
<i>C. baileyi</i>	pássaro
<i>C. galli</i>	galinha
<i>C. serpentis</i>	lagarto, cobra
<i>C. varanii</i>	lagarto
<i>C. molnari</i>	peixes
<i>C. scophthalmi</i>	peixes

Fonte: SMITH, NICHOLS (2010)

Deste total, oito espécies de *Cryptosporidium* estão associadas ao homem, sendo elas: *C. hominis*, *C. parvum* (podendo ser genótipo de cervino e macaco), *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis* e *C. muris* e *C. andersoni* (SMITH, NICHOLS, 2010; CHALMERS, DAVIES, 2010). Porém, *C. hominis* e *C. parvum* são os mais comumente identificados em infecções humanas (CACCIÒ *et al*, 2005). Dentre as espécies que infectam os humanos, a variação de tamanho do oocisto está entre 3 e 7 μm (FRANCO, 2007).

Os oocistos de *C. parvum* como um complexo de espécies têm sido relatados em pelo menos 152 espécies de mamíferos, incluindo o homem (FAYER *et al*, 2000). Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. podem ter variações quanto a sua forma ou tamanho, porém, com frequência suas características são muito parecidas entre a maioria das espécies, não sendo possível a utilização da morfometria do oocisto como um determinante para diferenciação das espécies (SMITH, NICHOLS, 2010).

Durante o ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. existe apenas um hospedeiro, e a presença de fases assexuada e sexuada. Em cada oocisto há a presença de 4 esporozoítos que são liberados na luz intestinal após a ingestão do oocisto pelo hospedeiro. O *Cryptosporidium* spp. tem uma alta infectividade, ao se considerar a rapidez com que os esporozoítos infectam os enterócitos (célula hospedeira) apesar da baixa dose infectante. Durante a fase assexuada, eles se multiplicam no interior da célula infectada, invadem outras células, seguindo-se após, a fase sexuada onde ocorre a formação do zigoto. Algo característico e interessante deste protozoário é a formação de 2 tipos de oocisto: de parede grossa (80,0 %), eliminados já infectantes para o meio ambiente via fezes do hospedeiro infectado; e de parede fina (20,0 %), responsável pela auto-infecção do hospedeiro causando a permanência da infecção dificultando o tratamento (CAREY *et al*, 2004; SMITH *et al*, 2010) e que jamais são eliminados nas fezes dos portadores de infecção por este protozoário.

A parede do oocisto possui ligações ricas em bissulfeto, que oferecem uma barreira protetora para a infectividade do esporozoíto. A parede do oocisto de *Cryptosporidium* spp. consiste de camadas distintas: interior e exterior. A camada exterior é formada de ácido glicoprotéico e a camada interna de filamentos, que é composta por glicoproteínas. Tem sido postulado que a rigidez e elasticidade dessa parede é uma consequência dos glicolipídios e lipoproteínas centrais da camada, e da grossa camada interna de filamentos, que é composta por glicoproteínas (CAREY *et al*, 2004).

Outra característica do oocisto de *Cryptosporidium* spp. é a presença de uma sutura disposta longitudinalmente que possui uma zona de enfraquecimento da parede

(fenda) que é aberta durante a excitação, permitindo assim a liberação dos esporozoítos (TUFENKJI *et al*, 2006).

A criptosporidiose é normalmente limitada pela imunidade apresentada pelo hospedeiro (MONIS, THOMPSON, 2003) sendo que seus sintomas e a intensidade da infecção são dependentes ainda da condição nutricional do hospedeiro e de fatores relacionados à cepa do protozoário. Em pacientes com imunocomprometimento severo, a infecção pode levar à morte (CHALMERS, DAVIES, 2010). Repetidos episódios de diarreia causados por *Cryptosporidium* spp. nos primeiros anos de vida, podem afetar o desenvolvimento cognitivo e o crescimento da criança. Não existem fármacos específicos para a doença, porém, apesar de não apresentar resultados homogêneos nem promover a cura parasitológica, a nitazoxanida é um fármaco que foi liberado para uso pediátrico (FRANCO, 2007).

Pela baixa imunidade apresentada pelos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), pessoas transplantadas, idosos, diabéticos, desnutridos e pessoas que fazem hemodiálise ou quimioterapia, e usuários de corticosteróides, estes grupos estão mais expostos ao risco de adquirir a criptosporidiose e de desenvolver um quadro de diarreia severa e debilitante, que pode levar esses indivíduos à morte (FRANCO, 2007).

Estudo realizado por Searcy *et al* (2005) demonstra que características físicas de oocistos podem ser modificadas, tal como seu tamanho e densidade, ao ocorrer sua associação com partículas suspensas, afetando assim, seu transporte em sistemas aquáticos.

Segundo Tufenkji *et al* (2006), o potencial zeta do oocisto de *C. parvum* torna-se menos negativo com o aumento da força iônica da solução na qual ele está contido. Isso ocorre quando há a diminuição do pH, sugerindo que, o oocisto de *C. parvum* se comporta como o modelo de colóides em resposta às mudanças na química da solução.

O valor médio da velocidade de sedimentação de oocistos livres é de $0,76 \mu\text{m s}^{-1}$, ocorrendo um aumento para $12,6 \mu\text{m s}^{-1}$ quando misturada com caolinita. Com estes resultados, os autores concluíram que os oocistos podem não permanecer suspensos em condições de baixa turbulência hidrodinâmica, sendo assim podem sedimentar, caso haja sua interação com material suspenso (SEARCY *et al*, 2005).

3.2 Surtos de criptosporidiose e giardiose no mundo

Muitas espécies de protozoários causaram surtos de veiculação hídrica, sendo 325 surtos relatados até 2007 em todo o mundo, relacionados com os seguintes agentes etiológicos: *Entamoeba histolytica* (2,8 %); *Cyclospora cayetanensis* (1,8 %); *Toxoplasma gondii* e *Cystoisospora belli* (1,8 %); *Blastocystis hominis* (0,6 %); *Balantidium coli*, *Acanthamoeba* e *Naegleria fowleri* (0,9 %). Dois gêneros em especial foram os principais associados às doenças de veiculação hídrica por causarem mais de 90,0 % dos surtos reportados: *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. (KARANIS *et al*, 2007).

Verifica-se que a transmissão de patógenos por veiculação hídrica não ocorre somente na água potável, mas também pela água para recreação, tais como piscinas (FAYER *et al*, 2000; SMITH *et al*, 2006a).

O maior surto de criptosporidiose que se tem notícia ocorreu por veiculação hídrica em Milwaukee, Wisconsin (EUA) no período de 1^o de março a 28 de abril de 1993. Estima-se que 403.000 pessoas foram atingidas naquele evento, apresentando sintomas de diarreia severa. Dados revelam que deste grupo, 44.000 pessoas necessitaram de alguma atenção médica e 4.400 pessoas foram hospitalizadas, sendo registradas 100 mortes (CORSO *et al*, 2003).

Quanto à giardiose, há relato de surto em um clube da região do subúrbio de Boston, Massachusetts (EUA) no período compreendido entre junho e dezembro de

2003, onde 149 pessoas foram contaminadas, sendo 65,0 % dos casos confirmados laboratorialmente. A contaminação inicial aconteceu via água de piscina infantil, sendo depois propagada por contato interpessoal, confirmando a possibilidade de várias rotas de transmissão do protozoário (KATZ *et al*, 2006). Na Noruega durante o outono e inverno de 2004 e 2005, aproximadamente 1500 pessoas foram diagnosticadas com giardiose (ROBERTSON *et al*, 2006).

Na Inglaterra e no País de Gales, houve 89 relatos de surtos de doenças de infecção intestinal, por veiculação hídrica, que afetaram 4.321 pessoas, no período de 1º de janeiro de 1992 a 31 de dezembro de 2003. Destes surtos, 27,0 % surgiram de água de abastecimento público, 28,0 % foram originados em águas de abastecimento privado, 39,0 % em piscinas e apenas 6,0 % tiveram outras origens tais como contato interpessoal. O *Cryptosporidium* spp. foi implicado como agente etiológico em 69,0 % dos casos e *Giardia* spp. em 2,0 % (SMITH *et al*, 2006a).

Em estudo conduzido na Holanda, as espécies de *Cryptosporidium* que infectaram seres humanos foram em 70 % dos casos por *C. hominis* e 19 % *C. parvum*, enquanto que a contaminação do gado se deu 100 % pelo *C. parvum*. Apesar da maioria dos casos serem causados por *C. hominis*, portanto, sendo sua transmissão antroponótica, Wielinga *et al* (2008) acreditam que nesta região o gado possa atuar como um reservatório de *C. parvum* de importância em relação às infecções causadas por essa espécie.

Em uma bacia de irrigação na Austrália Ocidental, analisaram-se 445 amostras fecais de animais, sendo que 8,7 % foram positivas para *Giardia* spp. e destas 30,7 % (12/39) foram identificadas como *G. duodenalis* (Assembléia A). Outros 6,79 % foram positivas para *Cryptosporidium* spp., sendo que 13 % (4/30) possuem potencial de transmissão zoonótica, dentre eles *C. parvum* (McCARTHY *et al*, 2008).

3.3 A ocorrência de *Cryptosporidium* spp e *Giardia* spp. em amostras ambientais

Cryptosporidium spp e *Giardia* spp. são relatados em todas as regiões do Planeta, em uma grande variedade de ambientes tais como: águas tratadas, recreacionais, mineral, alimentos, esgoto doméstico (tratado ou *in natura*), lagos, oceanos, dentre outros.

Em uma área de uso de águas recreacionais nos EUA foram encontrados concentrações de 0 a 33 cistos de *G. lamblia* L⁻¹ e 2 a 42 oocistos de *C. parvum* L⁻¹ em 27 amostras coletadas durante os finais de semana. Já durante a semana as concentrações foram menores, indicando que o aumento no número de banhistas está diretamente relacionado ao aumento do risco de infecção (SUNDERLAND *et al*, 2007).

Oocistos de *Cryptosporidium* ssp. foram encontrados em duas amostras de água mineral engarrafada e comercializada na cidade de Campinas-SP, em concentração variando de 0,2 a 0,5 oocistos L⁻¹ (FRANCO *et al*, 2002).

Dentre as rotas possíveis de contaminação, a de alimentos com oocistos e cistos tem sido considerada um importante fator nas possibilidades de surgimento de novos surtos; principalmente no caso de alimentos tais como frutas, vegetais, verduras e mariscos que são freqüentemente consumidos crus, sem nenhum ou pouco processamento térmico. A identificação de alimentos como veículo de infecção é raro, provavelmente por causa da distribuição e da variação na origem dos ingredientes. A contaminação dos alimentos por oocistos e cistos pode ocorrer por: uso de água contaminada na irrigação; lavagem com água contaminada de saladas e vegetais e/ou outros que são consumidos cru; higiene pessoal inadequada por parte dos manipuladores de alimentos e, uso de água contaminada na fabricação de gelo (SMITH *et al*, 2006b).

Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram detectados na Noruega, no Peru e na Costa Rica, em vegetais como folhas de alface e, foram observadas amostras positivas variando entre 1,2 e 14,5 % de (SUNNOTEL *et al*, 2006).

Os moluscos bivalves são fonte de contaminação alimentar, pois, filtram grandes volumes de água em busca de nutrientes e, cistos de *Giardia* spp. estão dentro da variação de tamanho das partículas retidas por eles, junto com bactérias e vírus. Em um estudo conduzido na Galícia, considerada a segunda maior produtora de mexilhões do mundo, foi analisada um total de 184 amostras do molusco (*Mytilus galloprovincialis*), sendo positivas para 41,8 % deles (GÓMEZ-COUSO *et al*, 2005).

Amostras de solo da Itália coletadas em profundidade variando entre 0 e 10 cm também foram analisadas, porém, das 16 amostras de solos irrigados com a água tratada oriunda de ETA, em nenhuma delas foi detectada a presença de oocistos ou cistos. Em 16 amostras irrigadas com água de poço, em uma amostra foi observada uma concentração de 53,5 cistos de *Giardia* spp. e 82 oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 10 g de amostra, indicando, portanto, contaminação da água subterrânea (LONIGRO *et al*, 2006).

Estes protozoários também foram relatados em águas costeiras, contaminando uma variedade de peixes e de mamíferos marinhos em locais como Havaí, Panamá, Porto Rico e Austrália. Sugere-se que essa contaminação ocorreu devido à disposição incorreta de esgoto e a lixiviação de solos com protozoários encistados (FAYER *et al*, 2004).

Na Espanha, foram analisadas sete amostras de água de quatro rios que deságuam em um estuário na Galícia, para a detecção de cistos de *Giardia* spp. As amostras foram positivas para 85,7 % delas, com concentração de 1 a 29,3 cistos L⁻¹ (GÓMEZ-COUSO *et al*, 2005).

No lago Pamvotis Ioannina, Grécia, foram analisadas 27 amostras de água, sendo 15 positivas para oocistos de *Cryptosporidium* spp. e/ou cistos de *Giardia* spp, com concentrações variando de 0,2 a 357,1 e 0,4 a 71,4 100 L⁻¹, respectivamente. Em rios da mesma região, apenas 2 amostras (2/33) foram positivas para oocistos de *Cryptosporidium* spp. com concentração máxima de 0,4 100 L⁻¹ e cistos *Giardia* spp não foram detectados (KARANIS *et al*, 2002).

Amostras de água bruta de Dublin, Irlanda, foram coletadas e analisadas; aproximadamente 40,0 % se mostraram positivas para *Cryptosporidium* spp., tendo uma concentração máxima de 6 oocistos L⁻¹ (SKERRETT, HOLLAND, 2000).

Na Rússia, das amostras coletadas no rio Temernik, duas delas foram positivas para ambos os protozoários, com concentrações de 249 e 70 cistos de *Giardia* spp. e 67 e 19 oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 2 L de amostras; no rio Mertvii Donets encontraram-se 357 cistos de *Giardia* spp. e 113 oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 2 L de amostras. A contaminação do rio Temernik pode ser explicada por sua proximidade com um jardim zoológico, uma vez que o esgoto do zoológico é despejado no referido corpo aquático. Já a contaminação do Mertvii Donets, seria devido às populações com más condições sanitárias que se encontram ao redor deste rio. Também foi relatado um grande número de cistos de *Giardia* spp. detectado em águas superficiais da região de Moscou, verificando-se um aumento da concentração deste parasita durante o outono-inverno. Desta forma, neste estudo é mostrado um risco potencial para a saúde pública com relação à infecção gerada por este parasita nestas regiões da Rússia e em outras onde também há a detecção do protozoário (KARANIS *et al*, 2006).

Na região de Álava, norte da Espanha, verificou-se que a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras de água dos rios era constante, sendo que de 52 amostras analisadas, 63,5 % e 92,3 % foram positivas para oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., respectivamente (CARMENA *et al*, 2007).

Segundo trabalho de Lobo *et al* (2009) em Portugal, mais de 55 % das 67 amostras de água tratada de Estações de Tratamento de Água foram positivas para oocistos de *Cryptosporidium* spp. e, 37 % delas, positivas para cistos de *Giardia* spp. Apesar da potencial rota de transmissão desta infecção por água potável, os autores não encontraram relatos de surtos por veiculação hídrica causados por estes protozoários no país.

No Brasil, segundo Franco (2007), os dados disponíveis sobre a presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. nos mananciais brasileiros e em amostras diversas como de esgotos tratados e fontes naturais, provém, em sua maioria de pesquisas científicas.

Em pesquisa realizada por Franco *et al* (2001), detectou-se em todas as amostras coletadas no rio Atibaia, na cidade de Campinas-SP, a presença de cistos e oocistos de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., respectivamente, na concentração de 57,5 cistos e 54,1 oocistos por 0,5 litro de água.

Um estudo foi realizado para detectar a presença de *Cryptosporidium* spp. em esgoto bruto e água do riacho Pirajussara. Todas as 24 amostras analisadas foram positivas para oocistos de *Cryptosporidium* spp., possuindo uma concentração que variava de 80 a 912 oocistos L⁻¹ nas amostras de esgoto bruto e 75 a 760 oocistos L⁻¹ nas amostras de água do riacho (FARIAS *et al*, 2002).

Em monitoramento por 12 meses de 2 mananciais de abastecimento de água na cidade de Viçosa-MG, Heller *et al* (2004) encontraram concentrações de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. de 4 a 7 cistos L⁻¹ e 6 a 20 oocistos L⁻¹, com picos de até 140 cistos L⁻¹ e 510 oocistos L⁻¹, respectivamente.

De maneira geral, estes relatos de contaminações de rios, lagos, águas costeiras e alimentos, com os protozoários patogênicos *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., sugerem que uma disposição adequada de resíduos humanos e de outros animais é

essencial para a segurança da água potável e dos recursos hídricos (FAYER *et al*, 2000; CASTRO-HERMIDA *et al*, 2008).

3.4 Segurança da água potável: o tratamento de água e a remoção de protozoários

Como se pode verificar a circulação e a permanência destes protozoários no ambiente por meio de suas formas infectantes são altas. Sob o ponto de vista do risco à saúde pública, a contaminação dos mananciais destinados à coleta de água para tratamento e distribuição é uma rota de grande importância. Portanto, há necessidade de um tratamento apropriado de efluentes juntamente com um efetivo processo de tratamento de água que assegure um reduzido risco de contaminação e veiculação destes protozoários (KARANIS *et al*, 2002).

Mesmo sem haver registro de surtos de *Cryptosporidium* spp. ou *Giardia* spp. por veiculação hídrica no Brasil até o momento, os resultados das pesquisas revelam a possibilidade da ocorrência de eventos dessa natureza (ZINI *et al*, 2004; MOURA *et al*, 2006). Isso se deve pela freqüente contaminação dos mananciais por estes patógenos, principalmente em função do grande volume de águas residuárias que são constantemente dispostas *in natura*, ou mesmo depois de tratadas, pois se sabe que os diversos tipos de tratamentos não são totalmente eficientes para eliminação destes patógenos (CANTUSIO NETO *et al*, 2006), não evitam completamente as contaminações ambientais, nem a possibilidade de surtos (CHENG *et al*, 2009). Também pode ocorrer a lixiviação em pastagens, carreando fezes de animais contaminados até os mananciais (CASTRO-HERMIDA *et al*, 2009).

Em países tropicais, Dillingham *et al* (2002), apontaram que nas estações do ano em que ocorre um maior aquecimento e, conseqüentemente, chuvas, verificam-se maiores contaminações por oocistos nas águas superficiais utilizadas para tratamento e distribuição.

Por ser muito resistente aos processos convencionais de desinfecção química, a remoção de oocistos e cistos no sistema de tratamento de água pelo processo de filtração tem ganhado bastante importância, como uma barreira de proteção em relação a essas formas infectantes (BELLAMY *et al*, 1993; EMELKO, 2003).

Estudos demonstram que a remoção de oocistos e cistos de protozoários é fortemente influenciada pela efetividade da coagulação na etapa de pré-tratamento da água, que junto com a clarificação constitui a primeira barreira contra tais microrganismos. A coagulação permite uma efetiva remoção física de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., feita nos filtros convencionais (BETANCOURT, ROSE, 2004).

Segundo Karanis *et al* (2006) a ocorrência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em filtros de água de abastecimento reforçam a necessidade de se obter: (a) condições químicas adequadas no pré-tratamento, (b) bom projeto, instalação, manutenção e operação das estações de tratamento, e (c) aperfeiçoamento das tecnologias de tratamento de água.

Hu (2002) encontrou cistos de *Giardia* spp. com concentração de 0 a 38,7 cistos/100 L e oocistos de *Cryptosporidium* spp. de 1,7 a 50,5 oocistos/100 L (médias de 9,6 cistos/100 L e 19,4 oocistos/100 L) na entrada dos filtros. Após a passagem por filtros rápidos a concentração foi de 0 a 2,3 cistos/100 L e 0 a 2,5 oocistos/100 L. A remoção de material suspenso e de oocistos pelo filtro rápido foi significativa, sendo na faixa de 56,0 a 97,0 % e 69,0 a 100,0 %, respectivamente.

A filtração lenta é um dos processos mais antigos de tratamento de água utilizados para garantir a segurança microbiológica da água, possibilitando uma redução de 4 a 6 ordens de magnitude de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. (HIJNEN *et al*, 2007).

Heller *et al* (2006) realizaram estudos utilizando unidades piloto de filtração lenta ascendente e descendente. Foi utilizada água filtrada, chamada de “água sintética”, onde foram adicionadas alíquotas de esgoto que continham cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium*. Pelos resultados foi observada uma elevada remoção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (99,988 % - 99,998 %) e retenção integral dos cistos de *Giardia* spp., independentemente do sentido no fluxo dos filtros lentos.

Em uma Estação de Tratamento de Água (ETA) convencional da Espanha, com ciclo completo (coagulação, floculação, sedimentação, filtração e processo de desinfecção), a remoção dos protozoários foi de 100 % nas 31 amostras analisadas (CARMENA *et al*, 2007).

A remoção de oocistos de *C. parvum* utilizando-se filtros de dupla e tripla camada, não apresentou resultados substancialmente diferentes entre si, independentemente do estágio de operação dos filtros, e mesmo na ocorrência de falhas no processo de coagulação. Encontraram-se ainda, oocistos de *C. parvum* em efluentes onde a turbidez estava abaixo de 0,3 UNT, reforçando assim que este parâmetro não pode ser um indicador da remoção deste protozoário pelo processo de filtração (EMELKO, 2003).

A dificuldade na detecção destes protozoários em amostras ambientais se dá devido à ausência de evidências epidemiológicas, metodologias de amostragem e análise adequadas (BRIANCESCO, BONADONNA, 2005). Além disso, há o alto custo da análise de detecção destes protozoários, e a exigência de pessoal qualificado. Outro fator é o desconhecimento de um indicador seguro, possível de ser utilizado para o processo de monitoramento da qualidade da água. Heller *et al* (2007) citam a necessidade de mais estudos buscando encontrar substitutos na quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., já que parâmetros comumente utilizados para o monitoramento de estações de tratamento de água, tais como, cor e turbidez são indicadores seguros no que diz respeito à qualidade do

tratamento, porém, não podem ser admitidos como substitutos quantitativos seguros quanto à remoção de *Cryptosporidium* spp. (EMELKO, 2003).

3.5 Técnicas de detecção dos protozoários em amostras de água

A presença destes protozoários está sendo verificada nos mais diversos ambientes aquáticos onde os oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. são identificados por meio de coloração com reação de imunofluorescência direta (RID), utilizando anticorpos conjugados com o corante fluorogênico FITC (que confere fluorescência aos organismos) e, que se mostra 12 vezes mais eficiente que as técnicas clínicas tradicionais. Esta etapa de coloração é realizada posteriormente a uma etapa de concentração das amostras (CLANCY *et al*, 1999, XIAO *et al*, 2001) que pode ser realizada por floculação com carbonato de cálcio, filtração em membranas ou ainda, cápsulas de filtração.

O protocolo de floculação com carbonato de cálcio foi baseado em trabalho de Vesey *et al* (1993). Esta técnica foi proposta para concentração de volumes de 10 L de água, sendo inicialmente adicionadas soluções de cloreto de cálcio e bicarbonato de sódio, sendo a seguir, ajustado o pH para 10 com a adição de hidróxido de sódio. Após um período de repouso de no mínimo 4 horas em temperatura ambiente, o precipitado é dissolvido com ácido sulfâmico, e a suspensão obtida é centrifugada e analisada por RID. Uma das dificuldades desta técnica é a grande quantidade de material particulado no sedimento analisado, interferindo na RID e podendo resultar em falso-positivos. O número de organismos floculados também pode variar devido às concentrações dos reagentes e valor do pH (CANTUSIO NETO, 2008).

Uma metodologia validada internacionalmente é a da American Society for Testing and Materials (ASTM), que propôs um método para detectar *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em água com baixa turbidez. Este protocolo é realizado com a filtração da amostra em cartucho, purificação em gradiente de densidade com uma

solução saturada de sacarose, e visualização, também, por RID. Uma vantagem deste método é a possibilidade de usar grandes volumes de amostra, de 100 a 1000 L; sendo uma desvantagem o seu alto custo e o requerimento de muito tempo de análise (QUINTERO-BETANCOURT *et al*, 2003).

Outra metodologia também validada foi proposta pela USEPA sendo conhecida como Método 1623. Esta metodologia é baseada na filtração e eluição da amostra através de cápsula de filtração, centrifugação de oocistos e cistos seguidos de separação imunomagnética (IMS) e visualização utilizando-se RID (USEPA,1999). Uma adaptação feita neste protocolo substitui a filtração em cápsula pela filtração em membranas, porém, o uso de membrana não é adequado para amostras com alta turbidez ou rica em matéria orgânica, além do alto custo do equipamento para a separação imunomagnética (QUINTERO-BETANCOURT *et al*, 2003).

Existem outras metodologias para detecção dos oocistos e cistos em amostras de água, tal como o protocolo de filtração em membrana modificado por Franco *et al*. (2001), que consiste em fazer a filtração das amostras em membranas de ésteres mistos de celulose, com 47 mm de diâmetro e porosidade nominal de 3 μm (marca Millipore®), utilizando-se de um sistema de filtração com bomba de vácuo e porta filtro da marca Millipore®. Os protozoários são recuperados das membranas por meio de raspagem e lavagem alternadas com solução de eluição (Tween 80, 0,1 %). O líquido resultante deste processo é transferido para tubos cônicos e concentrado por centrifugação, até a obtenção de um sedimento final com volume de 1 mL. Alíquotas de 5 μL são utilizadas para a avaliação e enumeração dos protozoários, realizada por RID.

Esta técnica é de baixo custo, utiliza-se a filtração de pequeno volume de amostra (1 L) e tem se mostrado eficiente na recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras ambientais (FRANÇA, 2007; CANTUSIO NETO, 2008) Assim, esta metodologia foi escolhida para a realização deste trabalho.

3.6 Processos de desinfecção de água: os POA como alternativa

Como a inativação dos protozoários patogênicos *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. pelos processos usuais de desinfecção não são efetivas, outras opções vêm sendo estudadas para que isso ocorra (MORITA *et al*, 2002).

Dentre estas alternativas, o uso da ozonização e da irradiação por luz ultravioleta (UV), vêm sendo estudados. O ozônio possui como vantagem o poder oxidante que causa dano à parede celular (CRAIK *et al*, 2000), porém, tem a desvantagem do elevado custo em relação à desinfecção por cloração, e ainda ter como possibilidade a geração de subprodutos prejudiciais à saúde humana, principalmente na presença de brometos. Na radiação por luz UV não há geração de subprodutos e sua ação, geralmente, inviabiliza a multiplicação do microrganismo em função de sua ação sobre o ácido nucléico (HIJNEN *et al*, 2006), porém, possui como desvantagem não deixar residual para possíveis contaminações que podem ocorrer na rede de distribuição (GÓMEZ-LOPES *et al*, 2009).

Os Processos Oxidativos Avançados (POA) são tecnologias que, embora façam uso de diferentes sistemas de reação, envolvem basicamente, a geração de radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) que são altamente oxidantes (CORDEIRO *et al*, 2004; MATTOS *et al*, 2003).

O radical $\bullet\text{OH}$, popular por degradar compostos químicos recalcitrantes é um dos mais efetivos oxidantes, sendo seu potencial de oxidação superior a de outros agentes químicos (CHO, YOON, 2008). Na Tabela 03 são apresentados alguns potenciais de oxidação de algumas espécies.

Tabela 03: Potenciais redox de algumas espécies oxidantes

Espécies	E^0 (V, 25 °C)
Flúor	3,03
Radical hidroxila	2,80
Oxigênio atômico	2,42
Ozônio	2,07
Peróxido de hidrogênio	1,78
Permanganato	1,68
Dióxido de cloro	1,57
Ácido hipocloroso	1,49
Cloro	1,36
Bromo	1,09
Iodo	0,54

Fonte: DOMÈNECH *et al* (2001)

Segundo Hargreaves *et al* (2007), a produção de espécies reativas de oxigênio é dependente do pH, sendo que a inativação por estas espécies é mais acentuada em valores de pH mais elevados.

Dentre os vários processos para a obtenção destes radicais livres, existem os processos homogêneos, onde o catalisador e o substrato formam uma única fase; e os sistemas heterogêneos, quando o substrato e o catalisador formam um sistema com mais de uma fase; geralmente, são processos que possuem catalisadores na forma sólida. Estes sistemas homogêneos e heterogêneos podem ser submetidos à irradiação ou não. Uma apresentação sistemática dos processos pode ser vista na Tabela 04.

Tabela 04: Sistemas de Processos Oxidativos Avançados (POA)

	Com Irradiação
	O ₃ /UV
	H ₂ O ₂ /UV
	Feixe de elétrons
	US (ultra-som)
Sistemas	H ₂ O ₂ /Fe ²⁺ (Foto-Fenton)
Homogêneos	H ₂ O ₂ /US
	UV/US
	Sem Irradiação
	O ₃ /H ₂ O ₂
	O ₃ /OH ⁻
	H ₂ O ₂ /Fe ²⁺ (Fenton)
	Com Irradiação
	TiO ₂ /O ₂ /UV
Sistemas	TiO ₂ /H ₂ O ₂ /UV
Heterogêneos	Sem Irradiação
	Eletro-Fenton

Fonte: DOMÈNECH *et al* (2001)

Dentre estes processos destacam-se a utilização de ozônio em pH elevado (O₃/OH⁻); ozônio com peróxido de hidrogênio (O₃/H₂O₂) ou sob luz ultravioleta (O₃/H₂O₂/UV); fotocatalise heterogênea (TiO₂/UV); o reagente de Fenton (Fe²⁺/H₂O₂/H⁺) ou foto-Fenton (Fe²⁺/H₂O₂/H⁺/UV) (MATTOS *et al*, 2003).

Devido à alta reatividade do radical •OH, ele interage com uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos. Normalmente tais processos não produzem subprodutos nocivos à saúde do homem quando bem aplicados, dessa maneira, são considerados tecnologias limpas, fazendo com que o interesse pelos POA tenha crescido enormemente (CORDEIRO *et al*, 2004).

Entre as vantagens associadas com o uso dos processos oxidativos avançados, Domènech *et al* (2001) citam:

- Não há somente uma troca de fase do contaminante (como ocorre com o tratamento com carvão ativado, por exemplo), mas sim uma transformação química;
- Geralmente, se alcança a mineralização completa (destruição) do contaminante;
- Usualmente não geram lodo, evitando assim a necessidade de um processo de tratamento e/ou disposição;
- É útil para uso com contaminantes refratários, que resistem a outros métodos de tratamento, como o biológico;
- Tratam contaminantes em concentrações muito baixas (na ordem de ppb, por exemplo);
- É ideal para diminuir a concentração de subprodutos formados em processos como a desinfecção;
- Geralmente, melhoram a qualidade organoléptica da água tratada.
- Em muitos casos, consomem menos energia que outros métodos (por exemplo, a incineração);
- Eliminam efeitos provocados por desinfetantes e oxidantes como o cloro sobre a saúde humana.

Os POA têm importante aplicação nos processos de desinfecção, onde sua ação na destruição de bactérias já foi bastante avaliada (RODRIGUES *et al*, 2007; GUIMARÃES *et al*, 2004).

Dentre os semicondutores utilizados em POA, na fotocatalise heterogênea, o dióxido de titânio (TiO₂) é o mais amplamente estudado devido principalmente à sua não toxicidade, foto e quimioestabilidade em uma ampla faixa de pH (NOGUEIRA, JARDIM, 1998; ALROUSAN *et al*, 2009). Sua ação foi avaliada para destruição de bactérias, resultando na redução de 99,97 % de *E. coli* após exposição por 30 minutos (RODRIGUES *et al*, 2007) e para *Clostridium perfringens* e colifagos, alcançando-se inativações de aproximadamente 98,0 % para ambos (GUIMARÃES *et al*, 2004). No

trabalho de Yao *et al* (2007) esse tratamento mostrou-se uma eficiente alternativa ao controle químico de bactérias fitopatogênicas veiculadas por água de irrigação: as taxas de inibição de crescimento destas foram de 99,0 % após 60 minutos de irradiação com luz UV e na presença de TiO₂.

A redução na formação de colônias de *Legionella pneumophila* com esse processo (TiO₂/UV) também foi descrita por Cheng *et al* (2007) alcançando redução de 2,77 a 4,18 log de redução, dependendo da cepa avaliada, com 1000 mg L⁻¹ de TiO₂ e dose de UV de 291,6 W s cm⁻². Para *Cryptosporidium parvum* foi requerido um CT (concentração e tempo de contato) de 9,3 x 10⁻⁵ mg min L⁻¹, quando avaliado o radical •OH para alcançar-se 2 log de inativação deste protozoário. O processo de geração do radical •OH utilizado foi o foto-Fenton mediado por ferrioxalato (CHO, YOON, 2008).

Observou-se, a partir de cultura celular, a inativação de oocistos de *C. parvum* na ordem de 1,3; 2,6 e 3,3 log, alcançadas com TiO₂ na presença de UV, com doses de 2,7; 8,0 e 40 mJ cm⁻², respectivamente (RYU *et al*, 2008).

3.7 O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e sua ação

O efeito bactericida do peróxido de hidrogênio nos sistemas biológicos é conhecido há muitos anos por sua eficácia, versatilidade e razoável segurança na manipulação, obtida seguindo as normas básicas de segurança no laboratório. Portanto, tem-se mostrado eficiente para inibição de crescimento e/ou inativação de microrganismos patogênicos tais como bactérias e seus esporos, fungos, vírus e protozoários, quando usadas em concentração e condições operacionais ideais (WEIR *et al*, 2002; LABAS *et al*, 2008).

Usualmente considera-se que a inibição do crescimento microbiano não é resultado direto das propriedades oxidativas do peróxido de hidrogênio, mas a consequência da atividade de outras espécies químicas fortemente oxidantes que são

derivadas desta molécula, que são os radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$). Estes radicais livres causam o chamado estresse oxidativo, um fenômeno particular que gera danos aos componentes celulares dos microrganismos, podendo levar a conseqüências irremediáveis. Entre os danos, há a redução permeabilidade podendo afetar a integridade da membrana celular e até mesmo gerar alterações no DNA das células. A ação que afeta a integridade da membrana celular ocorre pela reação de peroxidação com os lipídios presentes na membrana, sendo que uma das conseqüências desta reação é o aumento na rigidez desta, resultando na redução da permeabilidade ou, outra mudança que produz uma deterioração da organização interna da membrana (LABAS *et al*, 2008).

Por ser um composto muito versátil e altamente oxidante, o peróxido de hidrogênio, em condições específicas, mostra-se superior ao cloro, ao dióxido de cloro e ao permanganato de potássio na sua ação desinfetante quando combinado, por exemplo, com luz ultravioleta e, por isso é bastante empregado no tratamento de água, esgoto e efluentes industriais em países desenvolvidos, a pelo menos 20 a 25 anos (MATTOS *et al*, 2003).

Em um estudo sobre desinfecção de água com tratamento fotocatalítico (TiO_2/UV) realizado por Ireland *et al* (1993), a adição de H_2O_2 neste processo aumentou a eficiência do tratamento para inativação de *Escherichia coli*.

Segundo J. Koivunen, Heinonen-Tanski (2005), para a concentração de 150 mg L^{-1} de H_2O_2 foi obtida redução menor que 0,2 log de inativação para *Enterococcus faecalis* e MS2 coliphage.

A avaliação da ação do peróxido de hidrogênio na inativação de protozoários tem sido pouco relatada. Poucos são os trabalhos de avaliação de peróxido de hidrogênio na inativação de *Giardia* spp. Hernández *et al* (2009) relataram a avaliação de um produto comercial, a base de peróxido de hidrogênio, porém, aplicado a trofozoíta de *Giardia*.

Em relação ao *Cryptosporidium* spp. são notados apenas alguns trabalhos na literatura especializada, onde são avaliados a eficácia de alguns produtos comerciais contra *C. parvum* (QUILEZ *et al*, 2003; CASTRO-HERMIDA *et al*, 2006).

O desinfetante líquido de peróxido de hidrogênio, numa concentração de 6 % por 20 min, reduziu a infectividade de oocistos de *C. parvum* em mais de 3 log quando aplicado na desinfecção de instrumentos médicos de endoscopia (BARBEE *et al*, 1999).

Fazendo a exposição de oocistos de *C. parvum* ao oxidante peróxido de hidrogênio, numa concentração de 6 % por 4 minutos, Weir *et al* (2002) conseguiram redução de 1.000 vezes dos focos de infecção em cultivo celular quando comparados com os obtidos sem a ação deste oxidante.

Na realização de estudos de inativação de oocistos de *C. parvum*, desinfetantes com H₂O₂ a 1,25 %, obtidos comercialmente, foram eficazes para inativar 100 % dos oocistos de *C. parvum* no ensaio de infectividade, sendo necessário tempo de contato de 120 minutos (QUILEZ *et al*, 2005).

Em um ensaio de infectividade com oocistos de *C. parvum* apenas 10,7 % (3/28) dos animais foram infectados, porém, com uma intensidade de infecção menor do que a obtida nos animais usados como controle. O agente principal foi o peróxido de hidrogênio presente num produto comercial na concentração de 3 % (CASTRO-HERMIDA *et al*, 2006).

3.8 A luz UV e sua ação

O efeito biocida da irradiação por luz ultravioleta (UV) tem sido aplicado em processos de desinfecção (BELOSEVIC *et al*, 2001). Esta já tem sido utilizada há muitos anos, em processos de desinfecção de água utilizada em indústrias

farmacêuticas, para fins médicos e na preparação de alimentos. Também já está sendo empregada rotineiramente para desinfecção em tratamento de água e em tratamento secundário e terciário de esgoto em algumas partes da Europa (ROCHELLE *et al*, 2005). Na América do Norte, o uso tem como objetivo a redução de bactérias coliformes termotolerantes em efluentes (BELOSEVIC *et al*, 2001).

Embora as lâmpadas de baixa pressão (LP) sejam geralmente utilizadas em sistemas pequenos de desinfecção, as lâmpadas de média pressão (MP) estão sendo empregadas em grandes estações de tratamento tanto de água quanto de esgoto (CHEN *et al*, 2009). As lâmpadas MP são policromáticas, emitindo radiação numa faixa de comprimento de onda (180 – 1370 nm), enquanto que as lâmpadas LP são monocromáticas, emitindo no comprimento de onda de 253,7 nm. (USEPA, 1999).

A lâmpada UV pode ter uma redução da sua eficiência em decorrência do período de uso (CORDEIRO *et al*, 2004) e tal redução na eficiência pode afetar os resultados obtidos nos experimentos de desinfecção. Portanto, deve-se realizar o monitoramento da potência de emissão da lâmpada regularmente.

Além do tempo de uso da lâmpada, outros fatores também são citados por poderem influenciar a eficiência da desinfecção por irradiação com luz UV. A presença de ferro, sulfeto, nitrito e fenol, no líquido a ser desinfetado absorvem a radiação no mesmo comprimento de onda que é geralmente utilizado para a desinfecção (254 nm), podendo assim diminuir a ação desinfetante do processo. A presença de matéria orgânica também pode reduzir a cinética de inativação, uma vez que esta pode “competir” com as bactérias pela absorção da radiação incidente (IRELAND *et al*, 1993). Caron *et al* (2007) acreditam que a presença de partículas pode prejudicar a ação da luz UV, pois estas podem funcionar como abrigo para os microrganismos, sendo necessária uma dose maior de UV para a inativação.

Porém, nem todo material particulado influencia de forma negativa nos resultados de inativação com luz UV. São 3 fatores sobre a natureza do particulado que

pode levá-lo ou não a prejudicar a desinfecção com UV: tamanho e concentração das partículas; natureza da partícula e o grau de associação com microrganismos alvo (CARON *et al*, 2007).

Sabe-se que a luz UV é absorvida por muitos compostos intracelulares, porém é a absorção pelas moléculas do ácido desoxirribonucléico (DNA) ou ribonucléico (RNA) que resulta no maior dano (BELOSEVIC *et al*, 2001). Com a exposição à luz UV, ocorre a dimerização das bases nitrogenadas da pirimidina e a replicação do DNA inibida ou alterada, causando morte ou mutação celular. (CORDEIRO *et al*, 2004). Sendo assim, o comprimento de onda considerado mais biocida é de 254 nm, pois é o mais absorvido pelo DNA, porém, segundo Chen *et al* (2009) como a composição do DNA varia de um organismo para outro, o comprimento de onda também pode variar.

Segundo Belosevic *et al* (2001), existem dados na literatura que confirmam a inativação de bactérias coliformes termotolerantes por irradiação UV, porém, bactérias formadoras de esporos são mais resistentes a esse efeito, necessitando de doses de UV 9 vezes maiores para alcançar-se a mesma ordem de magnitude de inativação dos referidos microrganismos.

Quanto à redução de infectividade de *C. parvum* observou-se 3 log de redução na infectividade após dose de radiação UV de 25 mJ cm⁻², tanto com lâmpada de baixa quanto de média pressão (CRAIK *et al*, 2001). Em pesquisa realizada por Morita *et al*. (2002) com a utilização de radiação UV para redução de infectividade de oocistos de *C. parvum*, foi possível alcançar a inativação de 4 log com doses de 1,92 mJ cm⁻² de UV, bem menores do que a recomendada pelo Serviço de Saúde Pública dos EUA para redução de 2 log de bactérias coliformes, 16 mJ cm⁻² (MORITA *et al*, 2002).

Em relação a efluentes, o problema na utilização deste processo de desinfecção por UV, é que após o tratamento pode ocorrer uma reativação celular, tanto na ausência de luz (*dark repair*) que tem sido relatado para quase todas as bactérias, quanto a foto-reativação (*photo-reactivation*) em exposição prolongada à luz (HIJNEN *et*

al, 2006). Tais efeitos podem ser devido ao prolongado tempo de detenção dentro de tubulações, seguida pela disposição em águas superficiais. Sendo assim, torna-se imprescindível a segurança quanto a dose de radiação UV utilizada de forma a garantir a ausência de qualquer um dos processos de reativação (CORDEIRO *et al*, 2004).

Um estudo realizado pelo método de análise de infectividade animal conduzido por Belosevic *et al* (2001), indicou que cistos de *G. muris* e oocistos de *C. parvum* não recuperaram a infectividade após a exposição à lâmpada de média pressão em doses iguais ou superiores a 60 mJ cm^{-2} de UV. Estes resultados sugerem que a inativação permanente por irradiação UV pode ser alcançada utilizando-se doses apropriadas ao organismo alvo. Também nesse trabalho é sugerido que oocistos de *C. parvum* são mais suscetíveis a inativação por UV média pressão quando comparado com cistos de *G. muris*.

A inativação de oocistos *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. por irradiação de luz UV vem sendo descrita na literatura. Morita *et al* (2002) e Rochelle *et al* (2005) discutiram acerca da real capacidade de reparo do DNA do protozoário e seu nível de infectividade após a radiação por luz UV. Rochele *et al* (2005) ainda apontam que existem evidências de que o *Cryptosporidium* spp. é incapaz de reativar e recuperar sua infectividade após a irradiação com UV, pois embora o DNA possa ser reparado, proteínas essenciais para a infectividade também podem sofrer danos irreparáveis causados pela irradiação UV. Kruithof *et al* (2007) relataram reativação dos protozoários com exposição de até 25 mJ cm^{-2} , porém, com doses superiores a 45 mJ cm^{-2} não foram observadas reativação. Já Zia *et al* (2008) concluíram que não havia evidências do processo de reparo em oocistos de *C. parvum* em doses até 5 mJ cm^{-2} .

Sendo assim, o mecanismo de recuperação de infectividade de alguns microrganismos, tais quais os protozoários é um desafio para a validação e confiabilidade dos verdadeiros efeitos germicidas obtidos com a radiação UV (BELOSEVIC *et al*, 2001).

Em um estudo realizado por McGuigan *et al* (2006) oocistos de *C. parvum* foram expostos a um sistema de desinfecção solar por batelada utilizando-se um simulador de irradiação solar global de 830 W m^{-2} e temperatura constante de $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Após 10h de exposição, 10,0 % dos oocistos ainda demonstravam excistação, porém, nenhum foi capaz de causar a infecção em ratos. Nas mesmas condições experimentais, cistos de *G. muris* foram incapazes de causar infecção após 4 h de exposição. Os autores consideram provável que, nas mesmas condições experimentais se obtenham os mesmos resultados para cistos de *G. lamblia*. Utilizando-se da microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi observada uma deterioração da parede do oocisto de *C. parvum* após a exposição por 10 h. Isto foi sugerido como uma consequência da formação de moléculas reativas de oxigênio, uma vez que esta exposição nas mesmas condições, porém, na ausência do simulador, ocorreu menor deterioração na parede dos oocistos.

Utilizando-se ensaios de infectividade animal, Hayes *et al* (2003) alcançaram inativação de 4,4 log de cistos de *G. muris* com dose de $2,3 \text{ mJ cm}^{-2}$ de UV. Shin *et al* (2009) alcançaram mais de 3 log de inativação de cistos *G. lamblia* após exposição a UV com dose de 1 mJ cm^{-2} em avaliações que incluíram ensaio de infectividade animal.

Numa grande parte dos trabalhos já publicados, a avaliação da eficiência de UV na inativação de protozoários foi realizada utilizando métodos inadequados, portanto, os resultados devem ser analisados com cautela. Muitos dos métodos, como os corantes vitais e o método de excistação *in vitro* super ou subestimam a eficiência de processo de inativação. Além disso, na literatura são encontradas doses a partir de 1 mJ/cm^2 até 40.000 mJ/cm^2 como sendo eficientes em inativar protozoários (CLANCY *et al*, 2000, SHIN *et al*, 2009).

Verifica-se, pelos resultados obtidos nos trabalhos mais recentes, que a reativação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (ZIA *et al*, 2008) e cistos de *Giardia* spp. (SHIN *et al*, 2009) não tem sido comprovada ao se utilizar a metodologia de infectividade animal.

3.9 A peroxidação assistida por luz UV

A utilização da peroxidação assistida por luz UV (UV/H₂O₂) é um POA onde há uma sinergia entre os dois processos; o da irradiação UV e a peroxidação, ou seja, há um aumento da eficiência dos dois processos quando são utilizados em conjunto, comparados aos mesmos, aplicados individualmente.

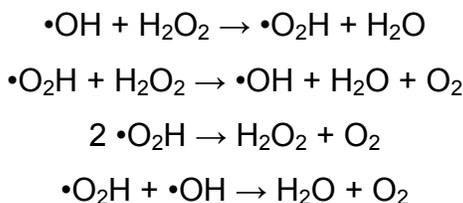
Uma molécula de H₂O₂ produz teoricamente, dois radicais hidroxila quando submetida a uma fonte de energia suficiente para romper a ligação entre os dois átomos de oxigênio (DOMÈNECH *et al*, 2001):



Segundo a literatura, um aumento da eficiência no processo de geração de radicais hidroxilas por fotólise do H₂O₂ ocorre em meio mais básico (LEGRINI, *et al* 1993; DOMÈNECH *et al*, 2001).

O uso dessa opção de POA oferece grandes vantagens: o oxidante é comercialmente acessível, é termicamente estável e pode ser armazenado em seu local de uso (com os cuidados necessários) (DOMÈNECH *et al*, 2001).

Uma desvantagem é que quando em excesso, o peróxido de hidrogênio pode produzir outros tipos de reações e, sendo estas competitivas, podem produzir um efeito que reduziria a eficiência de degradação. As reações podem ser as seguintes:



Portanto, as reações que consomem $\cdot\text{OH}$ diminuem a probabilidade de ocorrer a oxidação de interesse. Sendo assim, deve-se determinar a quantidade ótima de H_2O_2 , para se evitar o excesso do oxidante, o que pode retardar ou prejudicar a degradação.

Segundo Mamane *et al* (2007), a aplicação de radiação por luz UV em combinação com o peróxido de hidrogênio proporciona um aumento da degradação oxidativa de poluentes, sendo que a maior eficiência na geração de radicais hidroxilas é obtida em comprimento de onda curto (200 - 280 nm).

A utilização do processo UV/ H_2O_2 já tem sido bastante avaliada na degradação de poluentes e fármacos como MTBE (HU *et al*, 2008); disruptores endócrinos (EDC) (LINDEN *et al*, 2007); ácido dicloroacético (ZALAZAR *et al*, 2007); ibuprofeno (YUAN *et al*, 2009) além da inativação de microrganismos, tais como; *E. coli*, esporos de *B. subtilis*, e vírus MS2 (MAMANE *et al*, 2007; ALROUSAN *et al*, 2009).

Assim, pelos extensos estudos para aplicação dos processos oxidativos avançados, aliada à necessidade de novos métodos que inativem os protozoários patogênicos *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., propôs-se um estudo de avaliação de dano nestes protozoários pela peroxidação assistida pela luz ultravioleta.

Capítulo 4

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliação do dano morfológico na parede de cistos de *G. duodenalis* e oocistos de *Cryptosporidium* spp. e, assim inferir a eficiência dos processos, foram realizados 6 ensaios de peroxidação e 6 ensaios de peroxidação assistida por luz ultravioleta com duas concentrações de peróxido de hidrogênio e dose de UV diferentes, totalizando 24 ensaios (Tabela 05).

Tabela 05: Número de ensaios e condições experimentais dos processos avaliados.

Número de ensaios de peroxidação	Condições experimentais
3	6 g de H ₂ O ₂ e 60 min tempo de contato
3	6 g de H ₂ O ₂ e 30 min tempo de contato
6	15 mg de H ₂ O ₂ e 5,5 s tempo de contato
Número de ensaios de POA	Condições experimentais
3	6 g H ₂ O ₂ e dose UV 5.472 mW s cm ⁻²
3	6 g H ₂ O ₂ e dose UV 2.736 mW s cm ⁻²
6	15 mg H ₂ O ₂ e 44 mW s cm ⁻²

Todos os experimentos de avaliação dos processos de desinfecção propostos foram realizados no Laboratório de Processos Oxidativos Avançados do Departamento de Saneamento e Ambiente da Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo da UNICAMP. As etapas de visualização por RID foram realizadas no Laboratório de Protozoologia (Microscopia de Fluorescência) do Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP e, a etapa de visualização por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica do mesmo instituto.

4.1 Sistema de tratamento

O reator fotoquímico consiste de um sistema de bancada, composto por um cilindro de vidro de borossilicato de 3,6 cm de diâmetro interno e 42,0 cm de comprimento, com uma lâmpada germicida (15 W, $\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$ e 2,1 cm de diâmetro interno) inserida no centro (Figura 01). O volume interno de trabalho do reator de $190 \pm 0,05 \text{ mL}$.

O sistema integral que foi utilizado no presente estudo inclui um reservatório com capacidade total de 1 litro, para disposição das amostras, e uma bomba peristáltica para movimentação da suspensão contendo os microrganismos no reservatório (Figura 02). Durante todo o tempo de detenção hidráulica (TDH) a suspensão esteve sobre um agitador magnético para garantir uma homogeneização dos microrganismos e, portanto, sua dispersão na “água sintética”. O sistema utilizado foi baseado em trabalho de Guimarães, Barreto (2003), com as devidas adaptações.

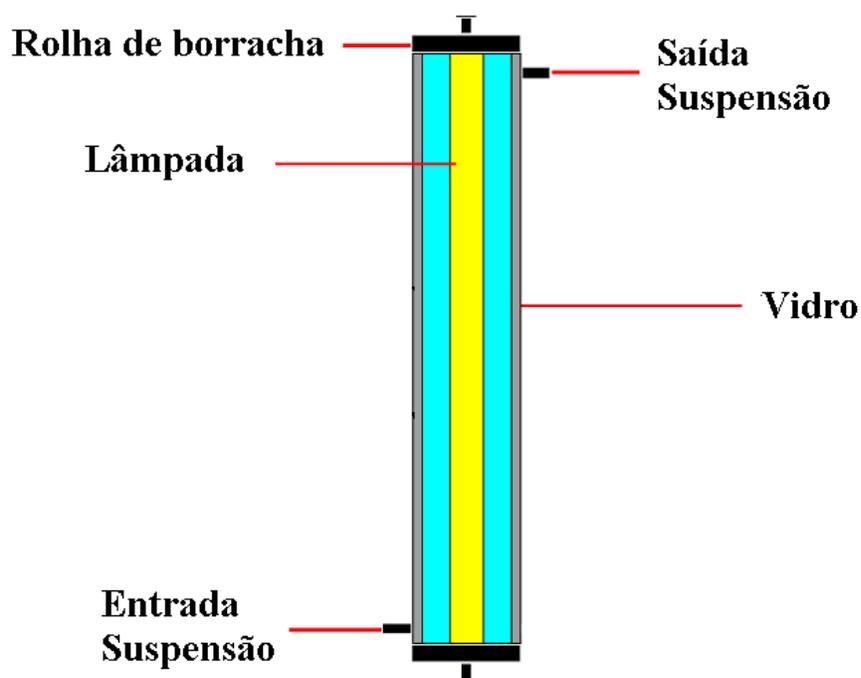


Figura 01: Esquema do reator fotoquímico.

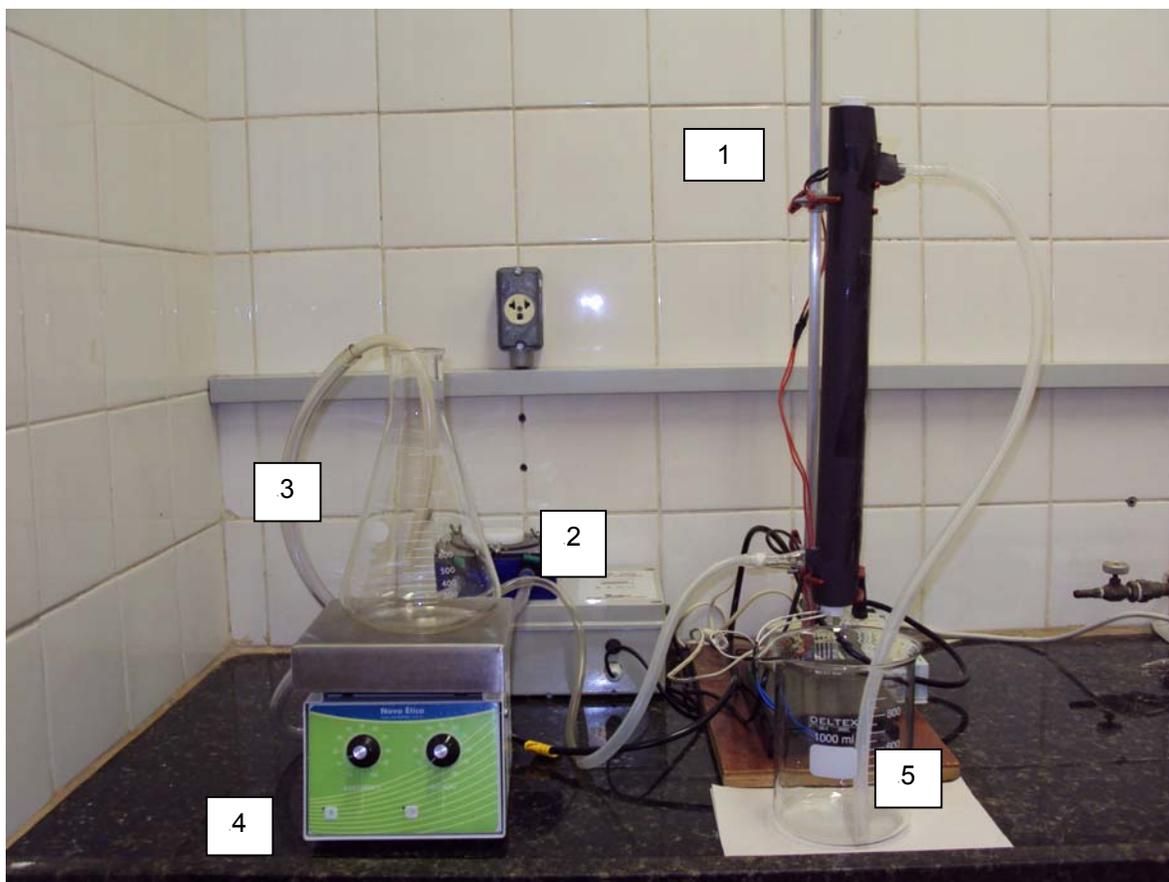


Figura 02: Sistema do reator fotoquímico utilizado nos experimentos, sendo (1) reator fotoquímico, (2) bomba peristáltica, (3) reservatório, (4) agitador magnético e (5) recipiente de coleta após processo.

4.2 Preparo da “água sintética”

Como objetivo de padronização, em todos os ensaios foi utilizada uma solução salina aqui chamada de “água sintética”, correspondendo a uma solução aquosa com as características químicas e físicas estabelecidas segundo o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20^a edição (APHA, 1998) conforme composição e características presentes nas Tabelas 06 e 07, respectivamente.

Tabela 06: Composição da água sintética

Reagentes	Concentração (mg L⁻¹)
NaHCO ₃	12,0
CaSO ₄	6,0
MgSO ₄	7,5
KCl	0,5

Tabela 07: Especificações químicas da água sintética

Parâmetro	Padrão recomendado, a 25 °C
Dureza equivalente mg L ⁻¹ CaCO ₃	10,0 a 13,0
Alcalinidade total mg L ⁻¹ CaCO ₃	10,0 a 14,0
pH	6,4 a 6,8

O volume de um litro da água sintética foi preparado pouco antes da realização de cada ensaio; apenas as soluções contendo os sais foram armazenadas sob refrigeração (4° C). O controle de dureza, alcalinidade e pH foram realizados periodicamente a cada 12 ensaios.

4.3 Preparo do inóculo contendo oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia duodenalis*.

Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram adquiridos comercialmente junto à Fundação Ensino e Pesquisa URA (FUNEP) – Uberaba/ MG; purificados a partir de fezes bovinas, em alíquotas com concentração de 5 x 10⁶ organismos e conservados em tampão fosfato salino (PBS) com antibióticos e fungicidas para evitar a proliferação de bactérias e fungos, e mantidos sob refrigeração a 4° C. Os cistos de *G. duodenalis* foram concentrados a partir de amostras clínicas fornecidas pelo Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, pela metodologia de purificação em sacarose, segundo descrição de Smith, Smith (1989). Cistos de *G. duodenalis* foram mantidos sem diluição em tampão fosfato salino (PBS), porém acrescido de antibióticos e

fungicidas e mantidos em refrigeração a 4° C. A diluição dos cistos a partir da matriz purificada foi realizada 1 dia antes da realização dos ensaios e utilizada durante um período máximo de 3 dias.

Previamente à inoculação dos organismos na água sintética, estes foram diluídos em PBS (1:9) com o propósito de estipular o número de oocistos e cistos nessa etapa de contaminação artificial. Para isso, foi realizada a enumeração dos organismos em lâmina de Reação de Imunofluorescência Direta (RID) (descrita no item 4.6.1) obtendo-se desta forma, o número de oocistos ou cistos em 5 µL presentes em cada um dos 3 poços da lâmina. A leitura destas 3 alíquotas (totalizando 15 µL) foi feita sempre por 3 microscopistas distintos, e sem o conhecimento prévio do resultado de cada contagem, obtendo-se o valor médio do número de formas presentes na diluição (inoculo).

A identificação da *G. duodenalis* foi realizada utilizando-se o Kit DNA ZR Fungal/Bacterial DNA®, e a amplificação por PCR com gene da proteína *giardin* (MAHBUBANI *et al*, 1992) no laboratório de Análise Genética Molecular do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes da Universidade Estadual de Campinas.

4.4 Contaminação artificial das amostras com oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia duodenalis* e ensaios com H₂O₂ e H₂O₂/UV

Um litro de água sintética foi contaminado artificialmente, com um número aproximado de 10³ oocistos de *Cryptosporidium* spp. e de cistos de *G. duodenalis*, sob constante agitação. Após a contaminação, a água sintética foi submetida aos processos oxidativo (H₂O₂) e oxidativo avançado (H₂O₂/UV).

Os 24 experimentos (12 de peroxidação e 12 de POA) foram realizados com características experimentais diferenciadas alterando-se a concentração do peróxido e dose de irradiação UV.

Uma concentração de 6 g de H₂O₂ por litro com dose de luz UV de 5.472 mW s cm⁻², foi avaliada em 3 ensaios de POA. Esta dose foi obtida com um tempo de ensaio de 60 min, para os ensaios de POA e para os 3 ensaios de peroxidação.

Mantendo a mesma concentração de peróxido (6 g), uma dose menor de irradiação UV foi também avaliada em 3 ensaios e para isso, o tempo de exposição dos organismos à irradiação foi reduzido para 30 min, resultando em uma dose de UV de 2.736 mW s cm⁻². Este tempo de contato foi mantido também para os 3 ensaios de peroxidação realizados neste grupo de experimentos. Nestes 12 experimentos (POA e peroxidação) a vazão de recirculação da suspensão no reator foi de 82 mL min⁻¹.

Outro grupo de experimentos (n=12) foi realizado para avaliar uma concentração de peróxido e dose de irradiação de UV menores que as utilizadas anteriormente: concentração de 15 mg H₂O₂ por litro e dose de luz UV de 44 mW s cm⁻². Nestes experimentos a vazão de recirculação da suspensão no reator foi de 2068 mL min⁻¹, e o tempo de ensaio de aproximadamente 30 segundos, para ambos os processos avaliados, POA e peroxidação.

Nos experimentos de POA, a utilização da lâmpada UV foi realizada após a estabilização da radiação emitida, alcançada ligando-se a lâmpada aproximadamente 15 minutos antes do início dos experimentos.

Para o cálculo do tempo total de iluminação no POA, utilizou-se a equação (I). A intensidade da radiação UV emitida pela lâmpada foi verificada com o auxílio de um radiômetro Cole Parmer, modelo VLX 3W, calibrado para o comprimento de onda de 254 nm, uma vez que, devido ao uso, pode haver uma redução da intensidade de emissão UV da lâmpada ao longo do tempo.

$$t_{ilum} = \left(\frac{V_{reator}}{V_{res}} \right) t_{tot} \quad (I)$$

sendo, t_{ilum} = tempo de iluminação e,
 t_{tot} = tempo total do experimento
 V_{reator} = volume do reator
 V_{res} = volume do reservatório

A intensidade da radiação média dentro do reator, recebida pela água sintética foi de aproximadamente 8 mW s cm^{-2} . A dose foi calculada segundo a equação (II), sendo produto da intensidade pelo tempo de iluminação:

$$D = I \times t_{ilum} \quad (II)$$

sendo: D : dose de radiação ultravioleta (W s cm^{-2})
 I : intensidade de radiação (W cm^{-2})
 t_{ilum} : tempo de iluminação (s)

4.5 Técnica de concentração das amostras por Filtração em Membrana.

Após passarem pelos processos de oxidação, as amostras de água sintética de ambos os grupos foram concentradas, de acordo com protocolo modificado de Franco *et al* (2001), como descrito a seguir.

Um (01) litro de amostra foi filtrado em membranas de ésteres mistos de celulose, com 47 mm de diâmetro e porosidade nominal de $3 \mu\text{m}$ (Millipore®), utilizando-se um sistema de filtração com bomba de vácuo e porta filtro (Millipore®) (Figura 03). Após a filtração, as membranas foram cuidadosamente retiradas e colocadas em placas

plásticas estéreis para realizar a etapa de recuperação de cistos e oocistos presentes nas amostras. Para tanto, as superfícies das membranas foram raspadas com alça plástica macia (Figura 04 - A), seguida de lavagens manuais de maneira alternada por 20 minutos, com solução de eluição (Tween 80, 0,1 %) (Figura 04 - B). O líquido resultante foi transferido para tubos cônicos e concentrado por centrifugação (1.050 *g*; 10 minutos), o sobrenadante aspirado e o sedimento resultante lavado com água destilada e novamente submetido à centrifugação, nas mesmas condições de velocidade e tempo (Figura 05 - A).

Após o descarte do sobrenadante, o sedimento desta segunda centrifugação, foi ressuspenso em água Milli-Q; o volume total de 1 mL transferido para tubos de microcentrifugação e mantidos sob refrigeração a 4 °C para posterior análise dos danos morfológicos (Figura 05 - B).



Figura 03: Suporte para filtração

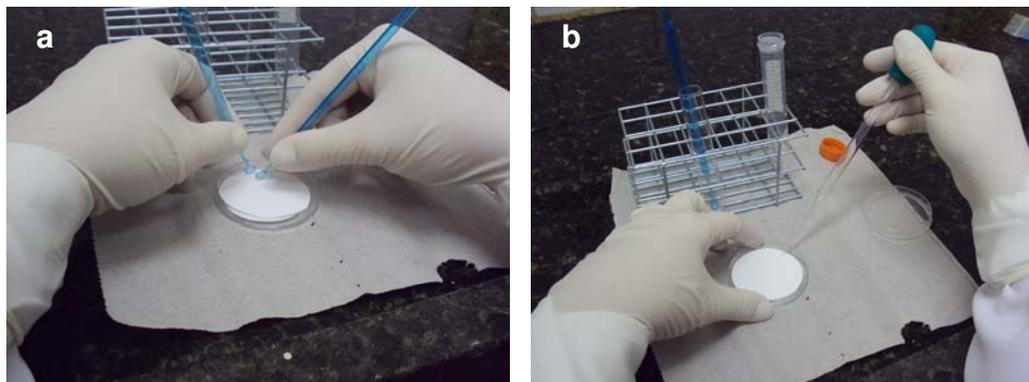


Figura 04: Raspagem (a) e Lavagem (b) da membrana

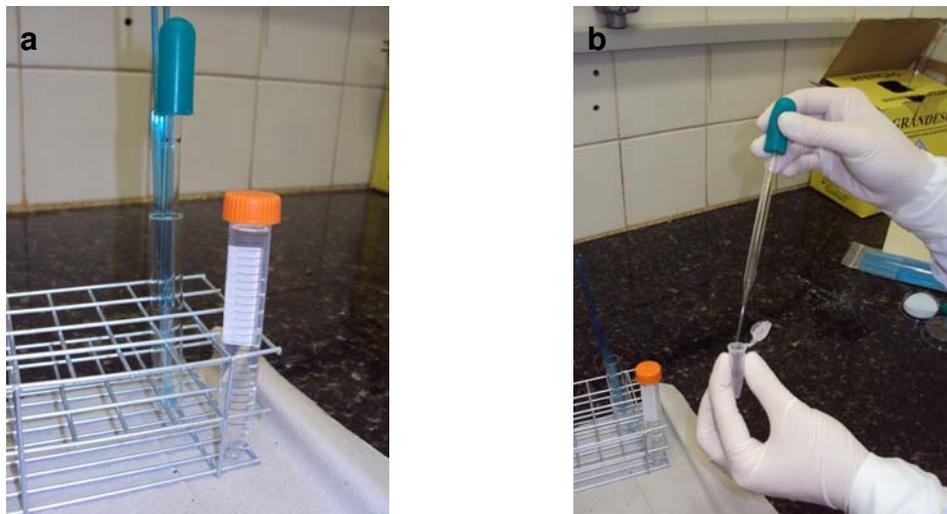


Figura 05: Lavagem do sedimento e centrifugação (a) e Transferência para tubo de microcentrifugação (b)

4.6 Avaliação da eficiência dos processos de desinfecção

A eficiência dos processos oxidativo e oxidativo avançado foi inferida por meio da técnica de visualização por Reação de Imunofluorescência Direta (RID) e pela observação em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

4.6.1 Reação de Imunofluorescência Direta (RID)

Com a finalidade de se retirar alíquotas dos sedimentos para a realização da RID, as amostras foram submetidas ao protocolo de homogeneização (REDLINGER *et al*, 2002), conforme descrito em seguida.

O tubo contendo a amostra concentrada foi agitado em vórtex Phoenix® AP-56, por 2 minutos e a seguir invertido 3 vezes com o propósito de tornar a distribuição de cistos e oocistos presentes no tubo de microcentrifugação, homogênea; a transferência de cada alíquota para o poço da lâmina de RID era feita imediatamente após este processo (Figura 06). Uma alíquota de 5 µL do sedimento final foi cuidadosamente espalhada nos poços das lâminas, que após secagem em temperatura ambiente, foi fixada com 10 µL de metanol (10 minutos). Depois de secas, foi adicionada uma gota do reagente contendo os anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia* e uma gota de contra-corante e mantidas por 30 minutos em câmara úmida e protegidas da luz. Em seguida, foi realizada uma lavagem utilizando-se a solução tampão fosfato (pH 7,5 presente no kit Merifluor® e diluída a 1:20) para retirada do excesso de anticorpo. Esta lavagem foi realizada com a lâmina inclinada a 45° sem tocar o poço contendo as amostras e, em seguida, realizada a montagem com lamínula. O kit de RID utilizado nesta pesquisa é validado pela U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) dos Estados Unidos da América. Para uma melhor avaliação, cada experimento foi realizado em triplicata, ou seja, uma lâmina para cada ensaio, totalizando 15 µL de amostra analisada.



Figura 06: Transferência de alíquota de 5 μ L de amostra para poço da lâmina

Para a observação da RID, o microscópio utilizado foi de epifluorescência, com filtro de excitação na faixa de 450 a 490 nm e filtro de barreira a 520 nm. Os critérios de positividade para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *G. duodenalis* em amostras ambientais e adotadas pela USEPA (2005) são:

- o tamanho e o formato similares aos oocistos (3 a 8,5 μ m) e cistos (8 a 15 μ m);
- o grau de fluorescência verde-maçã brilhante predominante na parede, fluorescência sem difusão quando focada no microscópio;
- visualização de caracteres morfológicos como axonemas, corpos em crescente e núcleos para cistos e; número, presença de esporozoítos e sutura nos oocistos quando observados também em Microscopia de Campo Claro- MCC e de Contraste de Fase- MCF e,
- ausência de poros ou deformidades nas extremidades.

Estes critérios foram tomados como base para a classificação dos danos aos organismos que foram submetidos aos processos oxidativos. Na técnica de coloração por RID são utilizados anticorpos monoclonais anti-*Giardia* e anti-*Cryptosporidium* conjugados com o fluorocromo FITC. A reação baseia-se na ligação do anticorpo com os epítomos presentes na parede dos cistos. Sob irradiação (490 nm) o fluorocromo fluoresce num tom verde-maçã brilhante permitindo a observação da parede do organismo (Figura 07).

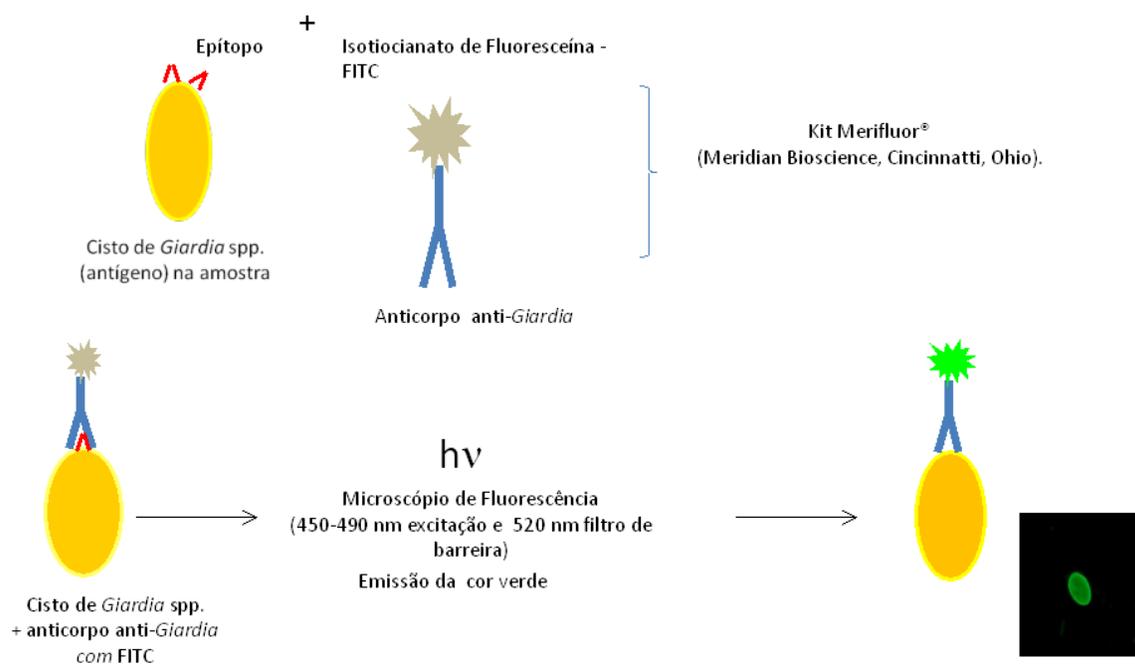


Figura 07: Reação da ligação dos epítopos da parede de cistos/ocistos com o anticorpo com FITC e fluorescência para observação.

Se a mesma estiver danificada, a ligação antígeno-anticorpo não ocorrerá, provocando falhas na visualização, o que pode ser considerado como um possível dano na parede dos cistos (confirmado também pela observação em campo claro). Assim, criou-se uma classificação dos organismos observados por RID segundo a Tabela 08.

Tabela 08: Avaliação visual dos danos nos organismos após RID

Classificação dos oocistos e cistos após os ensaios de desinfecção

- A: Organismo sem dano e com fluorescência padrão
- B: Organismo sem dano e com fluorescência alterada
- C: Organismo com dano e com fluorescência padrão
- D: Organismo com dano e com fluorescência alterada

Quando os organismos observados apresentavam redução na fluorescência, ou seja, o indicativo de uma possível alteração na superfície, realizava-se uma confirmação da leitura com Microscopia de Campo Claro (MCC). Esta visualização permite observar a presença de estruturas sobre ou agregadas aos cistos e oocistos e

assim, verificar se a alteração na fluorescência e ou na forma ocorreu pela destruição dos epítomos de ligação com o anticorpo ou, se este foi impedido de se ligar à parede em função da estrutura aderida ao organismo.

4.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A técnica MEV permite uma avaliação da superfície do microrganismo com aumento de até 8.000 vezes, e, portanto, uma observação bastante detalhada do dano causado pelos agentes oxidantes, na parede dos organismos. Para isso, o seguinte protocolo foi realizado: alíquotas de 10 µL do sedimento foram depositadas em lamínulas com 13 mm de diâmetro e mantidas em temperatura ambiente para secar. Após este período as amostras foram pré-fixadas com glutaraldeído (3 % em PBS) por 2 horas. Após 3 lavagens com solução PBS (pH 7,2) por 10 minutos cada, foi adicionada à amostra tetróxido de ósmio (OsO_4 - 1 %), procedimento realizado numa capela. O material foi mantido por 1 hora em temperatura ambiente e, em seguida foram promovidas novas lavagens com PBS. Uma desidratação seriada com etanol 30, 50, 70, 90 e 100 % por 10 minutos cada foi realizada, previamente à secagem com dióxido de carbono. Em seguida, as lamínulas foram montadas em suporte tipo *Stub* e cobertas com uma camada fina de metal (ouro-paládio) sendo posteriormente observadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol® modelo JSM5800 LV.

A avaliação do dano foi realizada tendo como base à coloração de RID. Os danos visualizados pelo método de MEV eram somente para detalhar e confirmar os danos observados, portanto, não houve contagem e determinação de porcentagem de dano pela técnica de MEV.

4.7 Limpeza do reator

Entre cada experimento o reator foi descontaminado para retirar possíveis resíduos químicos e organismos que poderiam permanecer aderidos no reator. Para os experimentos realizados para o grupo A, a descontaminação ocorreu da seguinte maneira: circulou-se primeiramente 500 mL de solução de eluição (Tween 80 a 0,1 %), depois 1 L de água Milli-Q com hipoclorito de sódio a 1 %, em seguida 1 L água Milli-Q e, novamente 500 mL de solução de eluição. O objetivo do uso da solução de eluição circulada no reator é evitar que possíveis organismos remanescentes no sistema ficassem aderidos à superfície do reator e interferissem nos resultados dos próximos experimentos.

Para os experimentos realizados para o grupo B, a limpeza foi realizada utilizando-se as mesmas soluções, porém, apenas a solução de eluição foi recirculada. As demais (água Milli-Q com ou sem hipoclorito) foram descartadas após a passagem pelo reator. O tempo de circulação pelo sistema foi também alterado em função da dose de UV utilizada neste segundo bloco de experimentos, da seguinte maneira: circulou-se primeiramente 500 mL de cada solução; solução de eluição (Tween 80 a 0,1 %); depois água Milli-Q com hipoclorito de sódio a 1 % sendo descartada; em seguida água Milli-Q sendo também descartada e, novamente solução de eluição recirculada. Esse controle foi realizado com um tempo de aproximadamente 2 minutos para cada solução e com uma vazão de aproximadamente 730 mL min⁻¹.

4.8 Controle da metodologia de recuperação dos protozoários

4.8.1 Controle negativo

Para que se pudessem detectar possíveis contaminações em todo o processo (da passagem da solução pelo reator até a confecção da lamina de RID), foram realizados experimentos controle-negativo: circulou-se 1 litro de água Milli-Q no reator do sistema experimental (mesmo tempo e vazão utilizados nos ensaios), sendo posteriormente submetida à etapa de filtração em membrana e confeccionada a lâmina de RID para observação de possíveis cistos ou oocistos que ficaram retidos no reator. Este experimento foi realizado logo após um ensaio controle-positivo, descrito abaixo.

4.8.2 Controle positivo

O controle positivo foi utilizado para avaliação da sensibilidade da metodologia de recuperação utilizada (Filtração em Membrana). Para isso realizaram-se dois ensaios: no primeiro inocularam-se aproximadamente 10^3 oocistos e cistos em 1 L de água Milli-Q e, no segundo inoculou-se o mesmo número em água sintética para avaliar a interferência das substâncias componentes na recuperação dos organismos. A enumeração foi realizada da mesma maneira que para a preparação do inóculo (item 3.3). Após a contaminação artificial, a solução foi submetida ao mesmo procedimento de circulação realizados nos ensaios com processos oxidativos e de recuperação dos protozoários (filtração em membrana), porém sem a presença de peróxido de hidrogênio e luz ultravioleta. Após a confecção da lâmina de RID e a devida observação, a porcentagem de recuperação dos organismos foi obtida utilizando-se a seguinte equação:

$$Y = \left(\frac{r}{i} \right) \cdot 100 \quad (\text{III})$$

sendo:

Y = Porcentagem de recuperação;

r = Número de oocistos ou cistos recuperados;

i = Número de oocistos ou cistos inoculados.

4.9 Concentração de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

Com o objetivo de quantificação e monitoramento do peróxido de hidrogênio em todos os ensaios nos quais esse oxidante era adicionado, foi utilizado um método analítico espectrofotométrico adaptado de NOGUEIRA *et al* (2005).

A referida análise é baseada na reação de óxido-redução entre o composto alvo, ou seja, o peróxido de hidrogênio presente na solução e íons metavanadato numa solução ácida de coloração amarela. Após a reação obtém-se uma coloração vermelha, devido à formação do cátion peroxovanádio, que apresenta máximo de absorbância em 450 nm, que é monitorada por espectrofotometria.

4.10 Tratamento dos resíduos gerados

O íon metavanadato utilizado para quantificação e monitoração de peróxido de hidrogênio possui potencial tóxico, portanto, todo o resíduo foi reservado para posterior tratamento antes da sua disposição final.

Todos os resíduos biológicos gerados durante os experimentos, assim como as soluções utilizadas na limpeza do reator foram fervidas, por pelo menos um minuto, para total inativação dos protozoários, antes do descarte.

Capítulo 5

Resultados e Discussões

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Controle-negativo

Nos experimentos controle-negativo, realizados com água destilada, nenhum organismo foi observado nos 3 poços da lâmina, indicando que não ocorreu a aderência de organismos nos componentes do sistema utilizado nos ensaios e, portanto, a etapa de limpeza realizada após cada experimento foi eficiente.

Após um ensaio de recuperação (controle positivo), a primeira solução de eluição que circulou no sistema, oriunda da etapa de limpeza, foi analisada e não foi encontrado nenhum organismo. A etapa de limpeza, realizada entre um ensaio e outro, era feita com a duração de 1 hora para cada solução circulada no sistema o que consumia muito tempo impossibilitando a realização de novos experimentos com pequenos intervalos de tempo. Assim, o tempo de limpeza foi reduzido para 30 minutos para cada solução, da seguinte forma: a primeira solução de eluição foi recirculada (30 min); a solução de hipoclorito foi recirculada por 10 minutos e nos 20 minutos restantes ela foi sendo descartada; em seguida água Milli-Q foi descartada durante todo tempo (30 min) e, finalmente uma segunda solução de eluição foi recirculada. Este procedimento reduziu o tempo de lavagem do reator de 4 para 2 horas.

Para assegurar que esta redução de tempo na etapa de limpeza não alterava a eficiência do processo de lavagem, todas as soluções de um dos procedimentos de lavagem foram filtradas e processadas como as demais amostras para confecção de lâminas de RID. Um oocisto de *Cryptosporidium* spp. foi observado na primeira solução de eluição recirculada pelo reator (Figura 08). Porém, nenhum outro organismo foi detectado na avaliação das outras 3 soluções que compõem a etapa de limpeza do reator. Considerando-se estes resultados optou-se por manter a redução do tempo de limpeza do reator, de forma a otimizar a realização dos experimentos.



Figura 08: Oocisto de *Cryptosporidium* spp. visualizado após lavagem do reator (400x).

5.2 Controle-positivo

Foram realizados ensaios controles-positivo para avaliação da sensibilidade do método, utilizando-se matrizes diferentes: um experimento empregando água Milli-Q e outro com a água sintética utilizada nas avaliações dos tratamentos. Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Figura 09) e cistos de *G. duodenalis* (Figura 10), foram visualizados e enumerados com base nos parâmetros adotados pela USEPA (2005) como descrito no item 4.6.1.

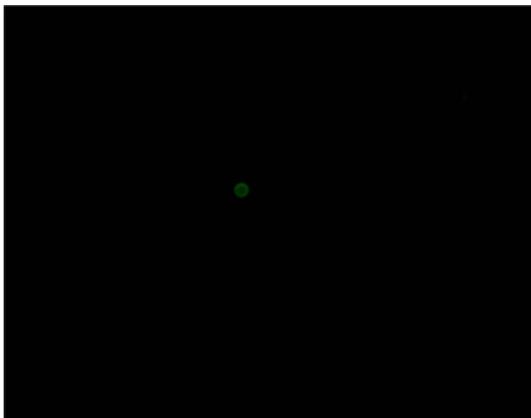


Figura 09: Oocisto de *Cryptosporidium* spp. (200x)

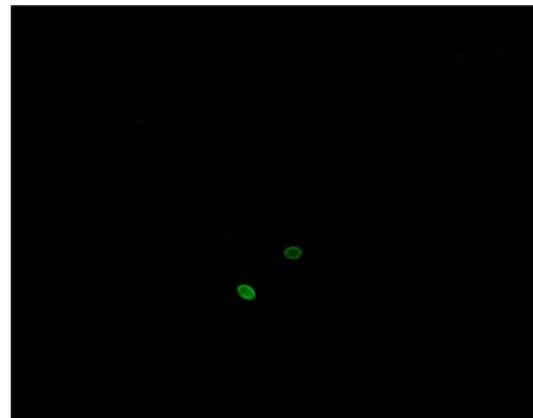


Figura 10: Cistos de *G. duodenalis* (200x)

As porcentagens de recuperação, nos experimentos controle-positivo, foram em média de 54,0 % para cistos e de 53,0 % oocistos.

Durante a padronização do inóculo, 2 experimentos controle-positivo apresentaram resultados de recuperação de cistos de *G. duodenalis* acima de 100 % e foram, portanto, descartados. Taxas acima desta porcentagem foram também relatadas por Cantusio Neto *et al* (2006) e, segundo Lindquist *et al.* (1999) isto pode ser atribuído às variações inerentes à etapa de preparação e diluição da suspensão dos organismos. A enumeração das formas (seja de cistos ou oocistos) é também uma etapa crítica, uma vez que os métodos de contagem não são muito precisos. Há ainda o problema da distribuição não homogênea dos organismos na suspensão, a idade dos cistos e oocistos e, o uso de organismos obtidos de amostras fecais frescas que apresenta maior facilidade de agregação, após purificação por gradiente de sacarose (LINDQUIST, 1999). Todos estes fatores podem levar à não exatidão do número de organismos inoculados (FERGUSON *et al*, 2004).

Esta interferência afeta a contagem final dos organismos (Figura 11), dificultando a padronização do inóculo. Isto significa que se houver o problema de distribuição não homogênea dos organismos na suspensão, pode ocorrer um erro na determinação do número que será inoculado (FERGUSON *et al*, 2004). Em função da maior possibilidade de agregação das formas, adotou-se o prazo limite de utilização do inóculo (diluição das fezes purificadas em PBS) em 3 dias, sendo que a matriz com as fezes purificadas foram utilizadas no prazo máximo de 30 dias após o processo de purificação em sacarose.

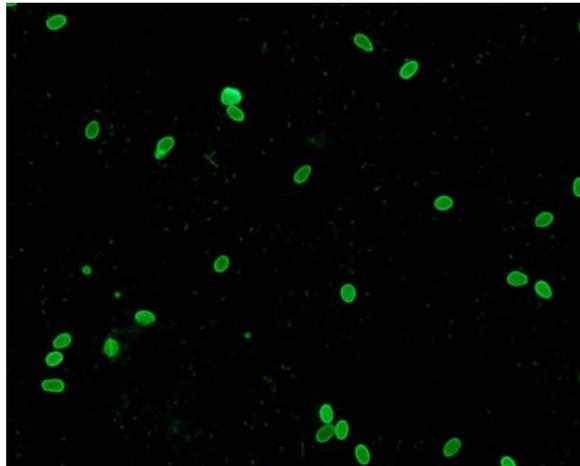


Figura 11: Cistos de *G. duodenalis* observados no inoculo corado com RID para enumeração das formas (200x).

O resultado destas modificações pôde ser observado no terceiro experimento realizado, onde a taxa de recuperação obtida foi de 54,0 %. De uma maneira geral, a variabilidade das porcentagens de recuperações é inerente à preparação do inóculo e aos diferentes métodos de detecção destes protozoários que, além da baixa reprodutibilidade alcançada em experimentos inter-laboratoriais, também são obtidos em diferentes ensaios realizados num mesmo laboratório (FRICKER, CRAB, 1998; COOK *et al*, 2006).

5.3 Processos oxidativos utilizados

Após a passagem da suspensão contendo os microrganismos no reator, verificou-se que tanto nos 12 ensaios de peroxidação quanto nos 12 ensaios de peroxidação assistida por luz UV, a quantidade de microrganismos recuperados sofreu variação, independente das concentrações de peróxido de hidrogênio e dose de UV avaliadas.

5.3.1 Primeira etapa de experimentos

5.3.1.1 Processo Químico: Peroxidação (6 g H₂O₂ /60 min)

Em três ensaios de peroxidação com tempo de contato de 60 min, 16 cistos de *G. duodenalis* (média de 5,3 cistos por ensaio) e 13 oocistos de *Cryptosporidium* spp. (média de 4,3 oocistos por ensaio) foram observados para avaliação de danos causados pelo processo (Figura 12). O número total de cistos de *G. duodenalis* e oocistos de *Cryptosporidium* spp. observado foi semelhante.

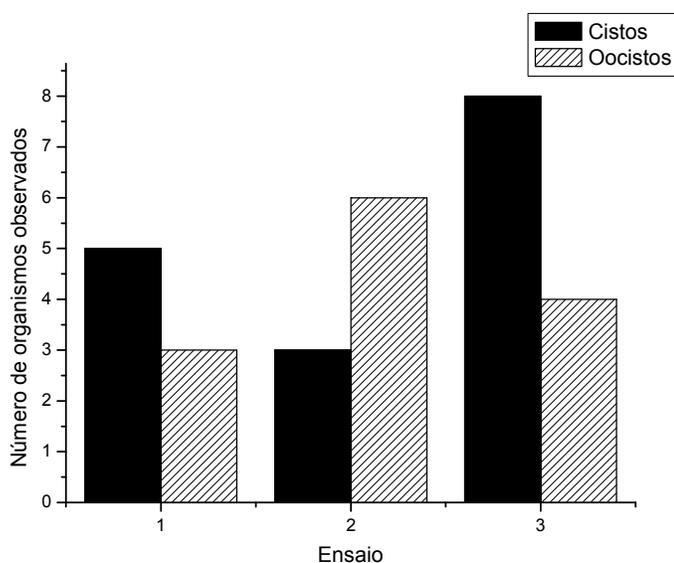


Figura 12: Número de organismos observados após peroxidação (6 g H₂O₂ /60 min).

Na avaliação dos danos observados na parede dos cistos de *G. duodenalis* foi possível analisar a porcentagem de cistos em apenas duas categorias propostas de dano (Figura 13) e, verificar que a maioria dos cistos não apresentou nenhuma alteração de fluorescência, classificada como A (Figura 14), sendo possível a constatação de alteração de fluorescência, classificada como B, em apenas 25 % dos cistos.

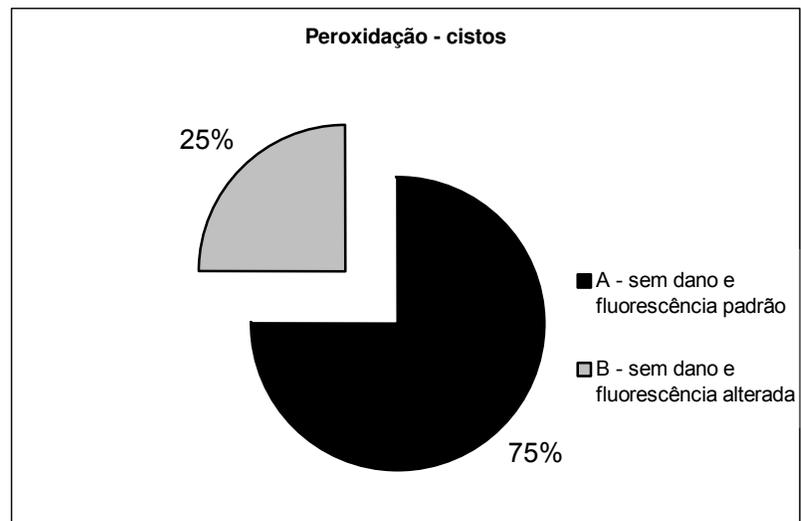


Figura 13: Porcentagem e classificação de cistos de *G. duodenalis* observados após peroxidação (6 g H_2O_2 / 60 min).

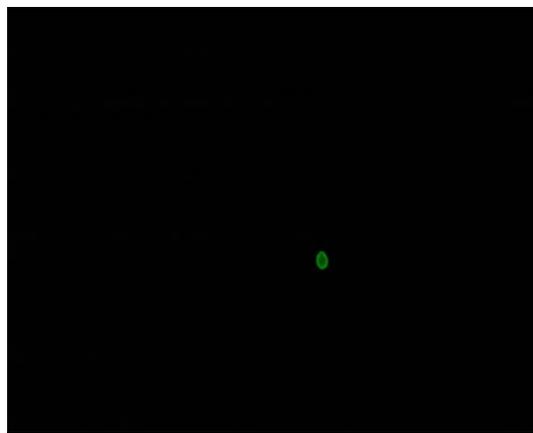


Figura 14: Cisto de *G. duodenalis* corado por RID, classificação A (200x).

Na avaliação de *Cryptosporidium* spp. os 13 oocistos recuperados e observados foram classificados de acordo com o dano que apresentavam (Figura 15).

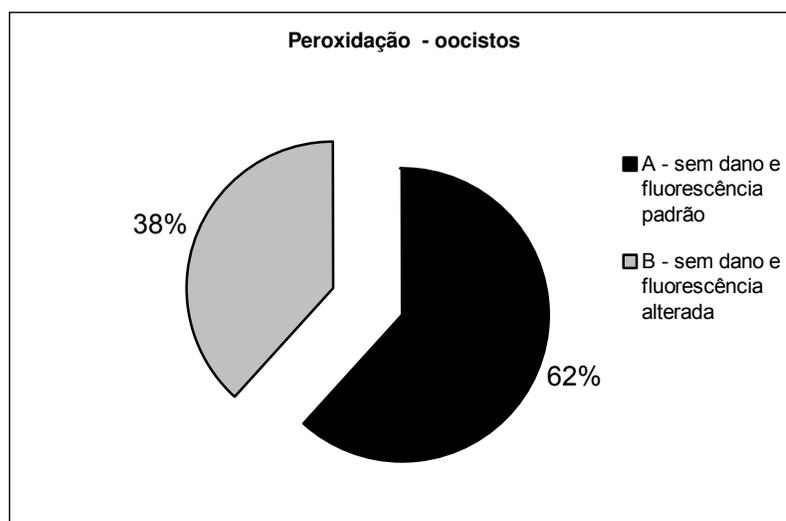


Figura 15: Porcentagem e classificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. observados após peroxidação (6 g H₂O₂ / 60min)

Verifica-se que a maioria dos oocistos não apresentou nenhum tipo de alteração seja de fluorescência ou forma (Figura 16).

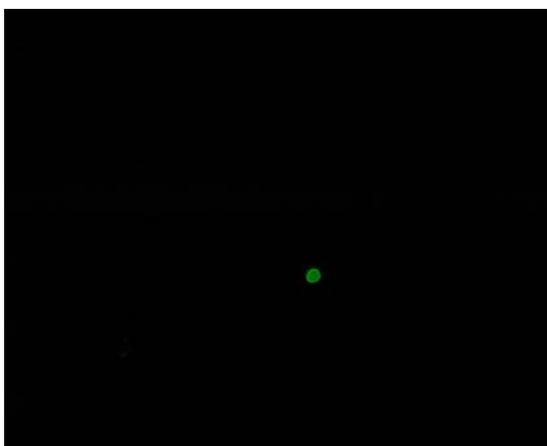


Figura 16: Oocisto de *Cryptosporidium* spp. (A) (400X)

Quando observado os resultados dos experimentos de forma isolada, cistos de *G. duodenalis* foram recuperados em maior número do que oocistos de *Cryptosporidium* spp. em dois deles, porém, na média, o processo de peroxidação nas condições avaliadas (6 g H₂O₂ / 60 min) não gerou resultados tão diferentes quanto ao número recuperado e, de danos observados em cistos e oocistos.

5.3.1.2 Processo Químico: Peroxidação (6 g H₂O₂ /30 min)

Nos ensaios onde o tempo de contato dos organismos foi menor (30 minutos) 237 cistos de *G. duodenalis* (média de 79 cistos por ensaio) e 57 oocistos de *Cryptosporidium* spp. (média de 19 oocistos por ensaio) foram observados para avaliação de danos causados pelo processo (Figura 17), resultando em um aumento na recuperação dos organismos de cerca de 1.481 % e 438 % para cisto e oocisto, respectivamente.

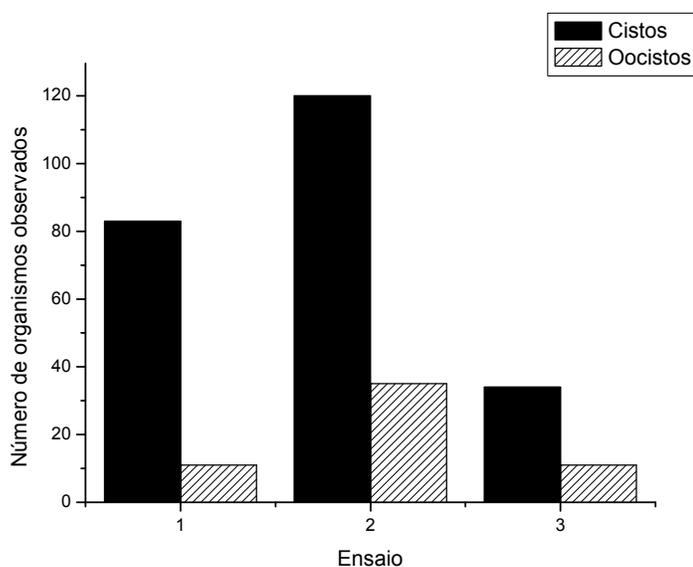


Figura 17: Número de organismos observados após peroxidação (6 g H₂O₂ /30 min)

A diferença entre o número de oocistos de *Cryptosporidium* spp e cistos de *G. duodenalis* recuperados foi diferente, obtendo-se mais cistos que oocistos.

Os cistos de *G. duodenalis* recuperados foram avaliados quanto ao dano causado pelo processo (Figura 18) e verificou-se que a maioria dos cistos apresentou as características padrão de forma e fluorescência, porém observou-se alguma alteração em 11 % dos cistos.

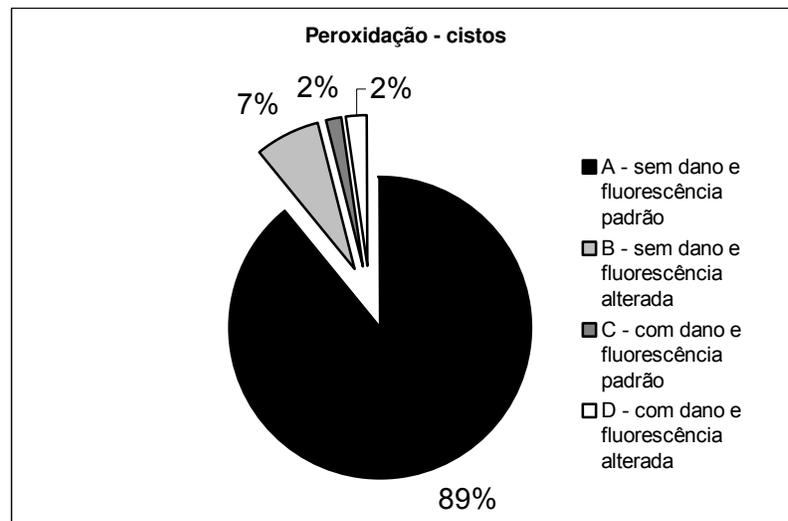


Figura 18: Porcentagem e classificação de cistos de *G. duodenalis* observados após peroxidação (6 g H₂O₂ /30 min).

Algumas formas apresentavam dano aparente quando observadas na RID (Figura 19), mas ao serem confirmadas pelo MCC, verificou-se que a ausência de fluorescência não ocorria em função de danos nos epítomos, mas da agregação de material particulado (provavelmente resíduos da purificação das fezes) ao cisto.

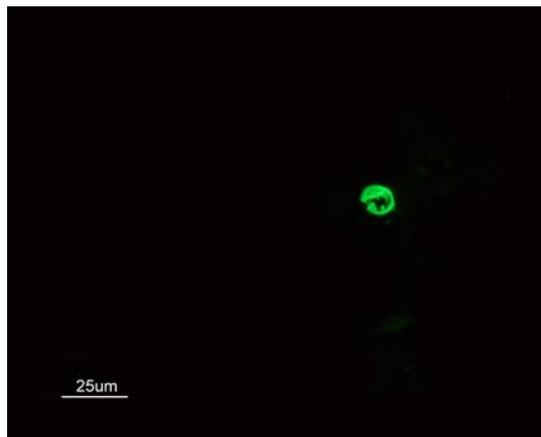


Figura 19: Cisto de *G. duodenalis* classificação A corado por RID (400x).

Por outro lado, foram observados 2,0 % dos cistos de *G. duodenalis* com dano na forma e na fluorescência (Figura 20).



Figura 20: Cisto de *G. duodenalis* classificação D corado por RID (400x).

Avaliando-se os 57 oocistos de *Cryptosporidium* spp. recuperados, quanto ao dano (Figura 21), observou-se que 46,0 % apresentaram as características padrão. A maioria teve a fluorescência alterada (Figura 22-a), além de 5,0 % dos oocistos apresentarem alteração de forma (Figura 22-b).

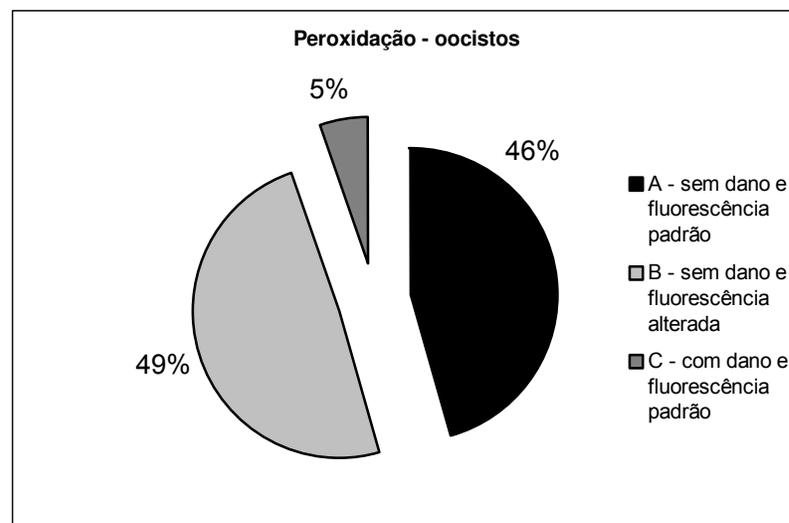


Figura 21: Porcentagem e classificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. observados após peroxidação (6 g H₂O₂ /30 min).

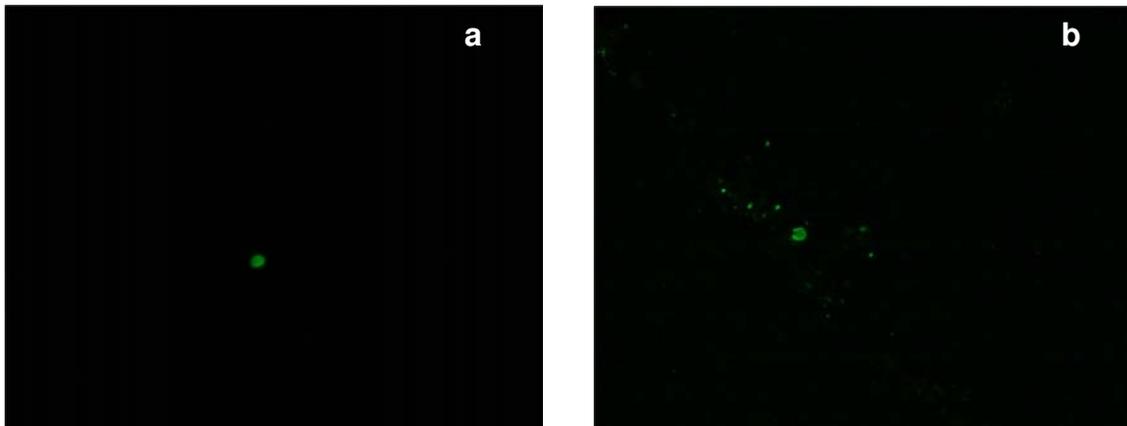


Figura 22: Oocisto classificação B (a) e classificação C (b) corado por RID (200x).

Com a avaliação pelo método de MEV observou-se que o cisto de *G. duodenalis* após a peroxidação (Figura 23-b), apresentou alguns poros em comparação com um cisto (Figura 23-a) presente em uma amostra bruta que não foi submetida à peroxidação.

Na avaliação do oocisto de *Cryptosporidium* spp. após o ensaio com peroxidação (Figura 24-b), pode-se inferir que a parede dos organismos foi oxidada de forma a apresentar algumas irregularidades quando comparada ao oocisto de *Cryptosporidium* spp. (Figura 24-a) presente em uma amostra bruta, que não apresenta alteração quanto a sua forma nem quanto à integridade da parede celular.

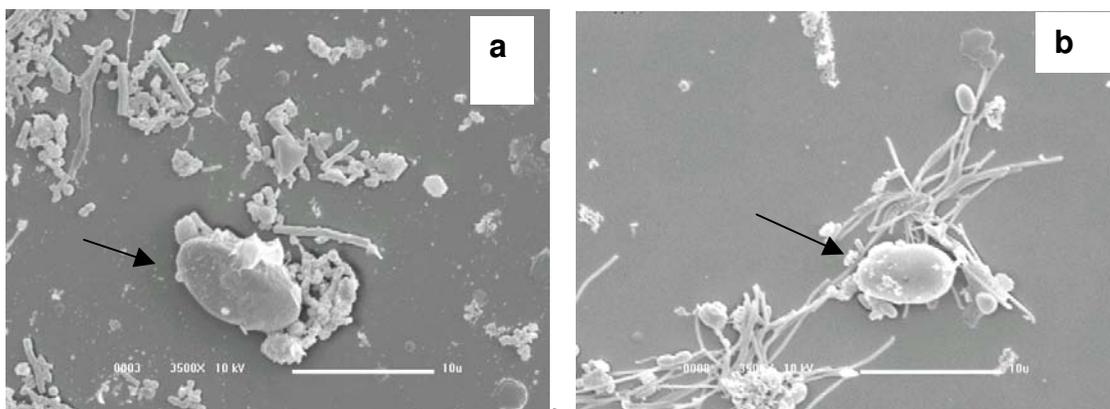


Figura 23: Cisto de *G. duodenalis* em amostra bruta 3500x (a) e após peroxidação 3500x (b).

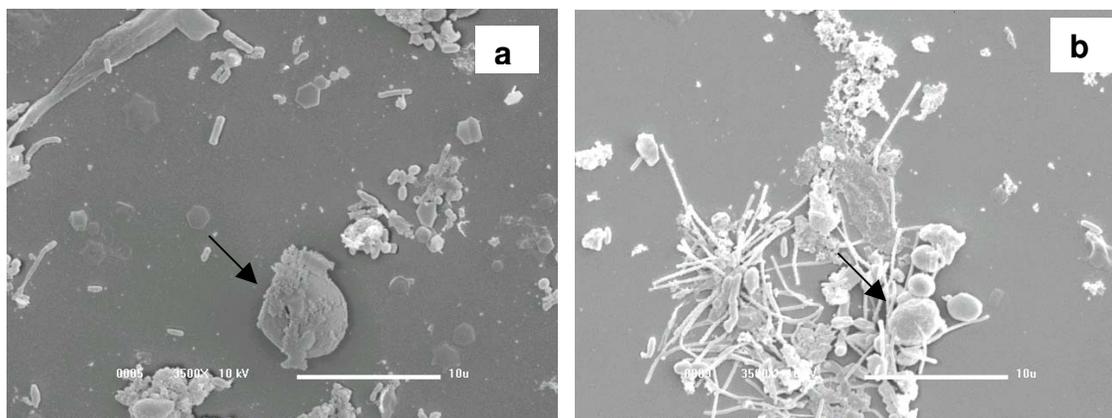


Figura 24: Oocisto de *Cryptosporidium spp.* em amostra bruta 3500x (a) e após peroxidação 3500x (b)

Ao se avaliar as duas concentrações de peróxido utilizadas, verificou-se que o número de cistos e oocistos recuperados após os ensaios com 6 g H₂O₂ e tempo de contato de 30 min foi muito maior do que aqueles recuperados após os ensaios do com 6 g H₂O₂ e tempo de contato de 60 min.

Pode-se verificar que após 30 min de tempo de contato, foram observados tanto cistos quanto oocistos com danos que não haviam sido observados com o tempo de contato de 60 min. Porém, é importante destacar que, após o tempo de contato de 60 min recuperaram-se menos organismos e com alteração de dano somente em fluorescência. Sendo assim, sugere-se que os danos observados após 30 min também tenham ocorrido durante o tempo transcorrido com 60 min. Uma hipótese para explicar isso seria que com um tempo de contato maior, os epítomos da parede dos cistos e oocistos foram modificados de tal forma a não se ligarem mais aos anticorpos, impedindo assim, sua visualização por RID.

Independentemente do tempo de contato avaliado, notou-se, também, um número menor de organismos recuperados e uma redução de fluorescência nos oocistos de *Cryptosporidium spp.* quando comparado aos cistos de *G. duodenalis*, podendo-se inferir uma maior susceptibilidade dos oocistos ao peróxido de hidrogênio.

5.3.1.3 Processo Oxidativo Avançado: Peroxidação Assistida por Luz

Ultravioleta (6 g H₂O₂/ 5.472 mW s cm⁻² UV)

O número de cistos de *G. duodenalis* observado foi bem maior do que o número de oocistos de *Cryptosporidium* spp. após os três ensaios de POA (Figura 25), além disso, em dois experimentos nenhum oocisto foi recuperado para observação.

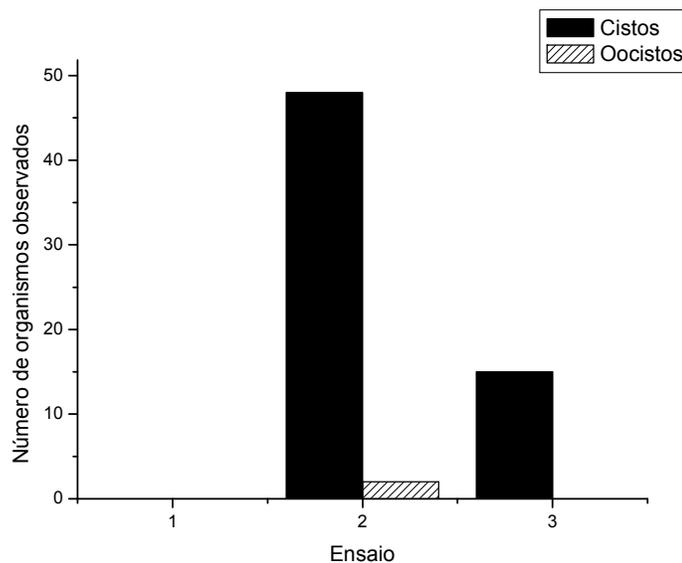


Figura 25: Número de organismos observados após POA (6 g H₂O₂/ 5.472 mW s cm⁻² UV)

Na avaliação dos cistos de *G. duodenalis* recuperados e observados foi possível analisar a porcentagem desses organismos em cada uma das escalas de dano propostas, utilizando-se da observação de 63 organismos (média de 21 cistos por ensaio) (Figura 26).

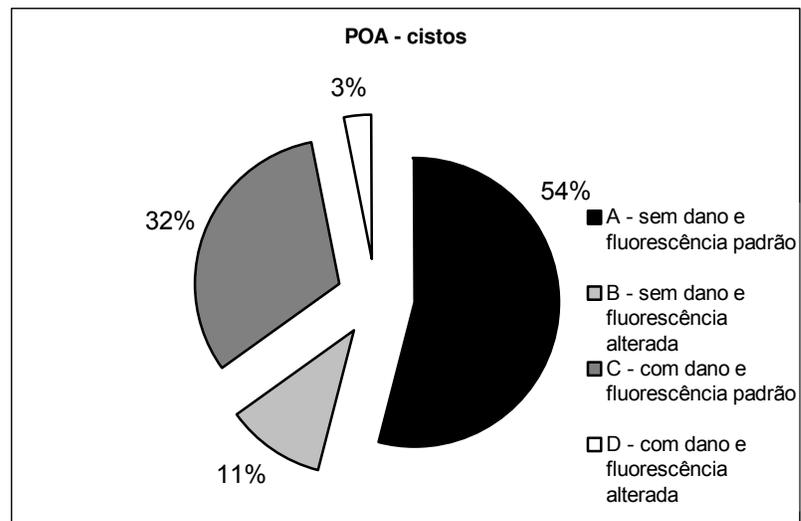


Figura 26: Porcentagem e classificação de cistos de *G. duodenalis* observados após POA (6 g H₂O₂/5.472 mW s cm⁻² UV)

Pela análise dos cistos de *G. duodenalis* que passaram pelo reator fotoquímico, notou-se que a maioria deles (54 %) não sofreu nenhum tipo de dano (Figura 27), porém, cerca de 46,0 % dos cistos analisados tiveram alguma alteração de forma e/ou fluorescência, diferenciando bastante dos resultados obtidos após o processo de peroxidação isolado (com a mesma concentração do oxidante). Alteração de forma foi observada por RID (Figura 28) e confirmada pela microscopia de campo claro (MCC).

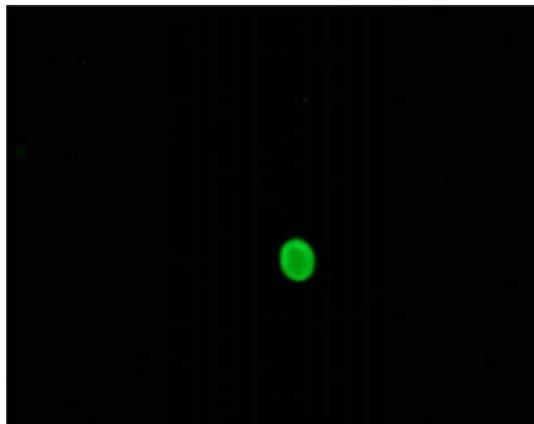


Figura 27: Cisto de *G. duodenalis* classificação A corado por RID após POA (400x).

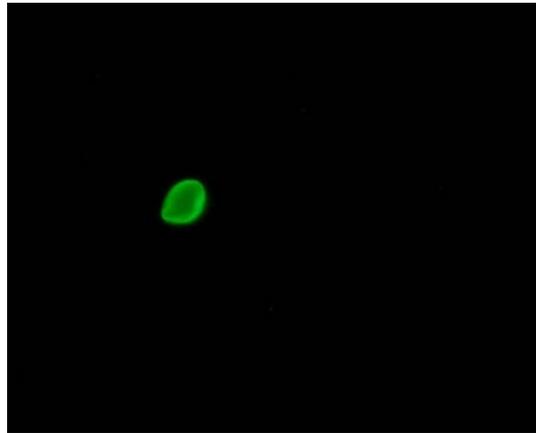


Figura 28: Cisto de *G. duodenalis* classificação C corado por RID após POA (600x)

O maior dano, determinado na classificação como possuindo alteração de forma e fluorescência, foi observada em 3,0 % dos cistos (Figura 29).

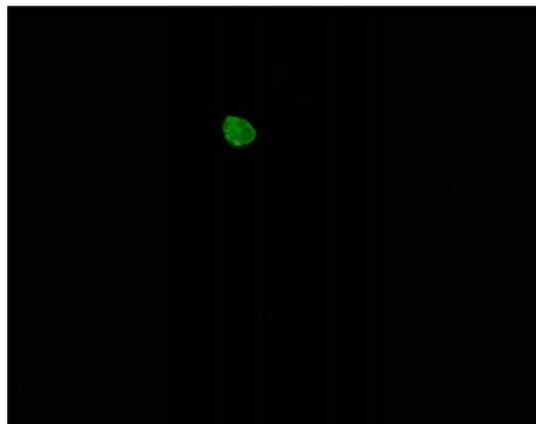


Figura 29: Cisto de *G. duodenalis* classificação D corado por RID após POA (400x).

Quanto aos experimentos de *Cryptosporidium* spp., somente dois oocistos foram observados sendo que um deles apresentou alteração de fluorescência e outro com alteração de forma e fluorescência (Figura 30).

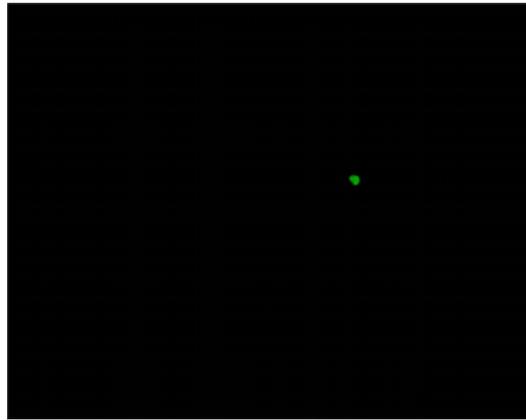


Figura 30: Oocistos de *Cryptosporidium* spp. classificação D corado por RID após POA (200x).

Quando avaliada a quantidade de cistos e oocistos recuperados após o POA, verificou-se que o processo foi mais eficiente na redução do número de oocistos quando comparado com cistos, que foram recuperados em média 30 vezes mais que oocistos.

5.3.1.4 Processo Oxidativo Avançado: Peroxidação Assistida por Luz

Ultravioleta (6 g H₂O₂/ 2.736 mW s cm⁻² UV)

Com uma dose de UV de 2.736 mW s cm⁻² (reduzida em relação ao experimento anterior) apenas cinco oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram observados nos três ensaios posteriores (média de 1,6 oocistos por ensaio) e, 26 cistos (média 8,6 cistos/experimentos) de *G. duodenalis* (Figura 31).

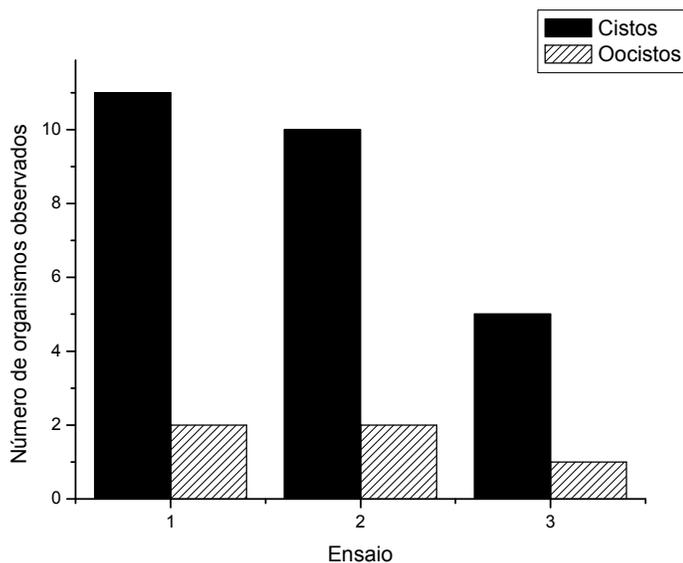


Figura 31: Número de organismos observados após POA (6 g H₂O₂/ 2.736 mW s cm⁻² UV)

Em relação ao dano causado pelo POA, 35,0 % dos cistos apresentaram algum tipo de alteração (Figura 32).

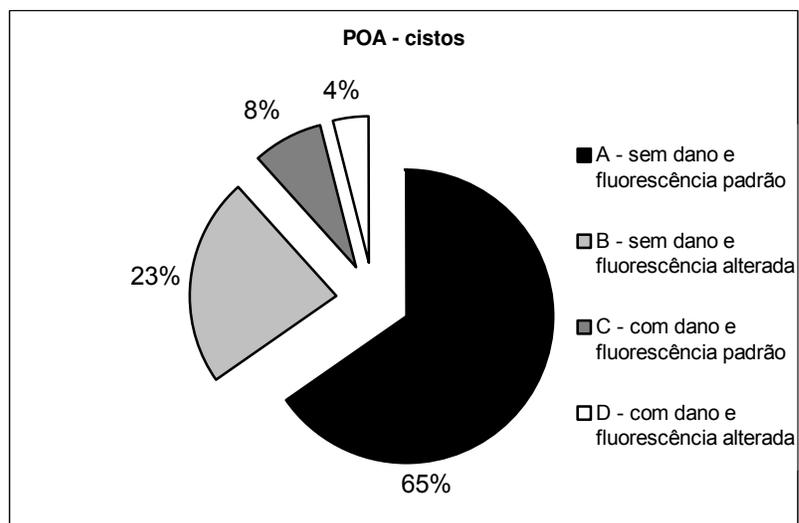


Figura 32: Porcentagem e classificação de cistos de *G. duodenalis* observados após POA (6 g H₂O₂/ 2.736 mW s cm⁻² UV)

Em algumas análises realizadas com RID, inicialmente foram atribuídos danos aos organismos (Figura 33), no entanto, numa segunda etapa, quando os mesmos

foram observados pelo método de MCF ou MCC, concluiu-se que não havia ocorrido alteração de forma.

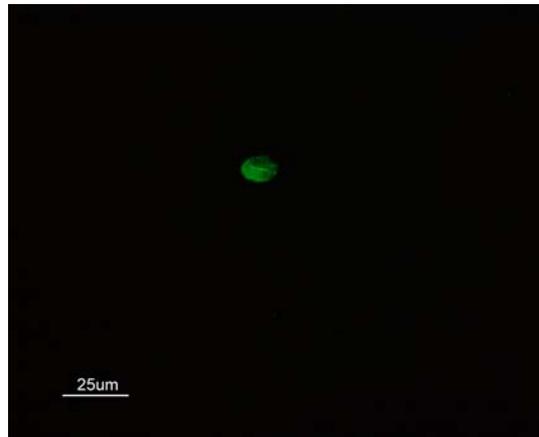


Figura 33: Cisto de *G. duodenalis* classificação B corado por RID após POA (400x).

Também foram observados cistos que apresentavam aparente alteração de forma ao serem visualizados por RID, porém esta alteração não foi confirmada pela MCF, mostrando uma agregação dos organismos com o material particulado resultante do processo de purificação. Porém, sombras escuras observadas sobre o mesmo cisto e, considerados por RID como uma alteração de fluorescência (Figura 34), foi confirmada por MCF, pois não havia nenhuma estrutura sobre o organismo que impedisse a ligação do anticorpo.

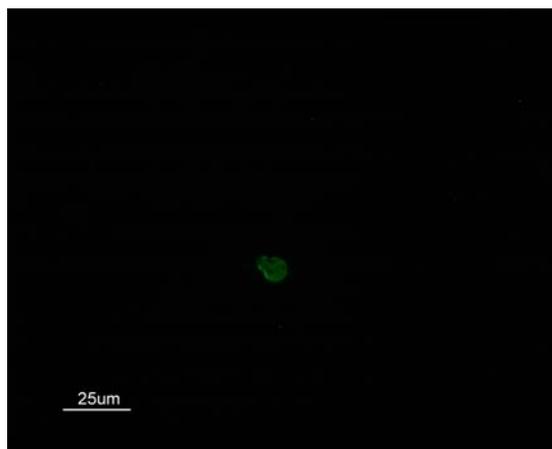


Figura 34: Cisto de *G. duodenalis* classificação D corado por RID após POA (400x).

Assim, como quando uma alta dose de UV foi utilizada, a maioria dos cistos de *G. duodenalis* ainda permaneceu sem alteração, porém foi verificado que a quantidade de cistos danificados foi menor.

Após a redução da dose de UV (de 5.472 para 2.736 mW s cm⁻²) a quantidade recuperada de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi maior, sendo que 60,0 % deles apresentaram alteração na fluorescência (Figura 35). Porém, 40,0 % ainda mantiveram o padrão de fluorescência sem alteração (Figura 36).

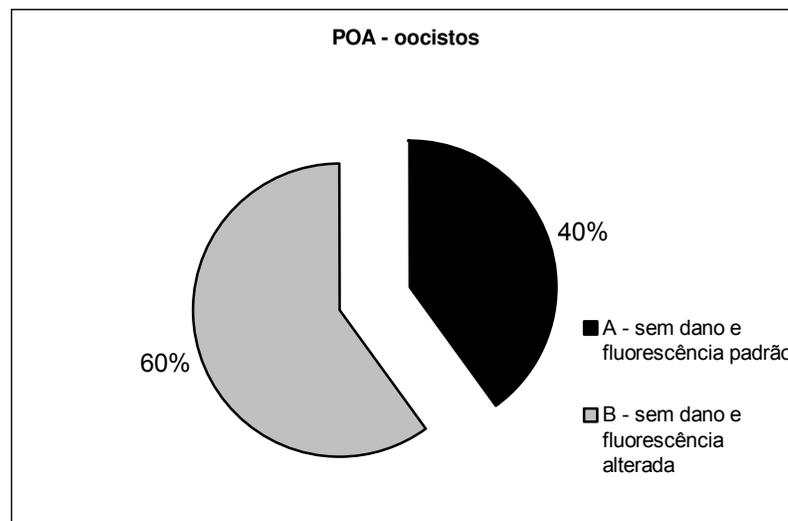


Figura 35: Porcentagem e classificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. observados após POA (6 g H₂O₂/ 2.736 mW s cm⁻² UV)

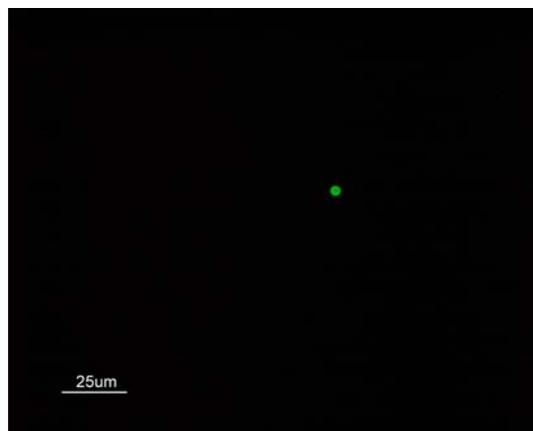


Figura 36: Oocistos de *Cryptosporidium* spp. classificação A corado por RID após POA (200x).

Comparando os resultados obtidos pelo POA com dose de UV de 5.472 mWs cm⁻² e 6 g de H₂O₂, verificou-se que o número de cistos de *G. duodenalis* recuperado e observado, foi mais que o dobro do que os cistos recuperados após os ensaios com dose de UV de 2.736 mWs cm⁻² e mesma concentração de peróxido. Isso pode ser resultante do efeito da agregação dos organismos, uma vez que nesta fase do trabalho ainda não havia sido alterado o preparo e o tempo de manutenção do inóculo. Porém, considerando os danos observados nos cistos recuperados dos dois grupos, verificou-se que a maior dose de UV resultou em 35 % de alteração de forma, contra apenas 12 % alcançada com a menor dosagem de UV. A quantidade de organismo sem dano também foi menor após o POA com alta dose (5.472 mWs cm⁻² UV), 54 % contra 65 % após a menor dose de UV utilizada no POA (2.736 mWs cm⁻²).

Para avaliação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. submetidos aos ensaios com POA, na dose de UV de 5.472 mWs cm⁻² UV e 6 g de H₂O₂, verificou-se que a recuperação e observação do dano foi prejudicada, uma vez que se obteve um número muito reduzido de organismos, apenas dois após os 3 ensaios realizados nas mesmas condições.

Resultados semelhantes foram obtidos após aplicação do POA com a dose menor de UV (2.736 mWs cm⁻²), onde apenas 5 oocistos puderam ser recuperados e observados. Neste caso, verificou-se que o fator que realmente influenciava a recuperação dos oocistos era a presença do H₂O₂ e não a ação da irradiação de UV. Esta hipótese está de acordo com os dados obtidos por Santos *et al* (2010) que mostra recuperação de oocistos após fotólise, superiores às obtidas após processos de peroxidação e POA (H₂O₂/UV).

Independente das concentrações do peróxido e doses de UV utilizadas, as observações das imagens obtidas por MEV relativas à parede do cisto *G. duodenalis* após o ensaio com POA (Figura 37-b), é possível sugerir que ocorreu uma oxidação, quando comparada ao cisto presente na amostra bruta (Figura 37-a), que apresenta uma superfície lisa, sem nenhum poro ou reentrância, e sem nenhum tipo de alteração

de forma ou integridade da parede. Quanto ao oocisto de *Cryptosporidium* spp., após submissão ao POA (Figura 38-b), observou-se nitidamente uma alteração de forma e também sinais que evidenciam uma oxidação na sua parede, diferente da integridade apresentada pelo oocisto observada quando presente na amostra bruta (Figura 38-a).

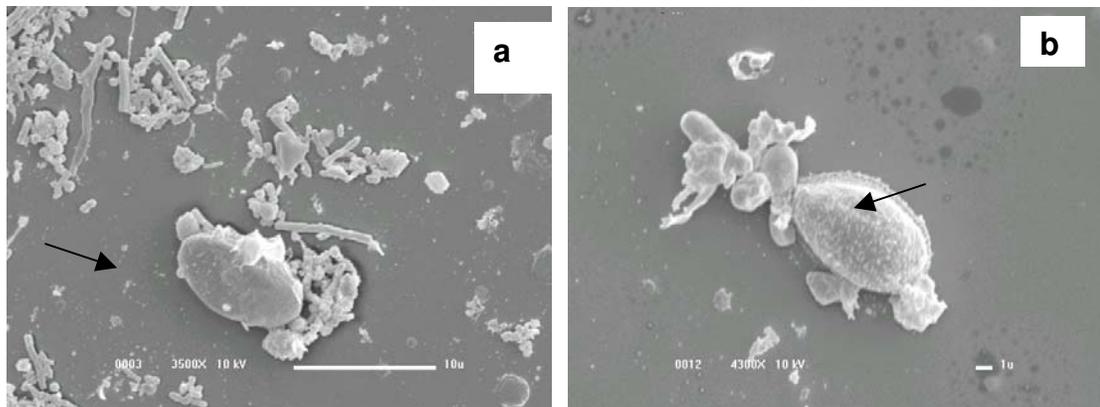


Figura 37: Cisto de *G. duodenalis* em amostra bruta 3500x (a) e após POA 4300x (b)

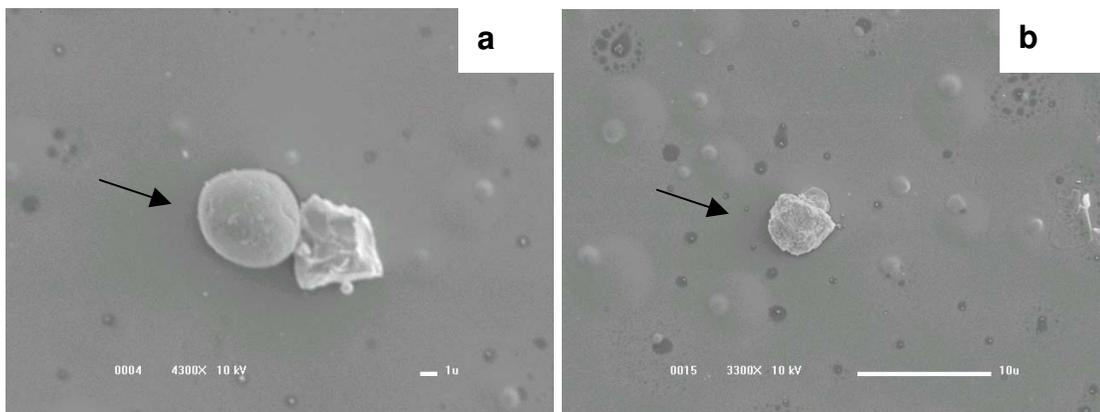


Figura 38: Oocisto de *Cryptosporidium* spp. em amostra bruta 4300x (a) e após POA 3300x (b)

5.3.1.5 Comparação entre os processos peroxidação e POA

Ao comparar os dois processos avaliados peroxidação e POA, independente das doses utilizadas, observa-se que cistos *G. duodenalis* foram recuperados em um número 3 vezes maior após peroxidação em relação àquele obtido quando aplicado o

POA (Figura 39). Em relação aos danos, o POA mostrou-se também mais eficiente: 42,7 %, contra 11,9 % de cistos danificados após a peroxidação.

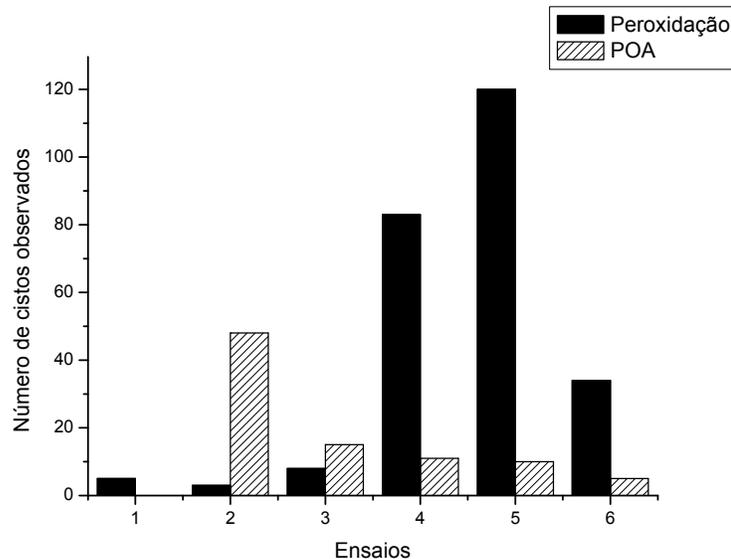


Figura 39: Número de cistos de *G. duodenalis* observados após peroxidação e POA

Com relação à redução dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., verifica-se que a recuperação foi bem maior após os ensaios de peroxidação quando comparado ao recuperado após os ensaios de POA: 70 e 7 oocistos foram recuperados para observação, respectivamente (Figura 40). Quanto ao dano causado pelos processos à parede dos oocistos, 14,3 % apresentam alguma alteração de forma após o POA, enquanto este dano foi observado em apenas 5,0 % dos oocistos após a peroxidação.

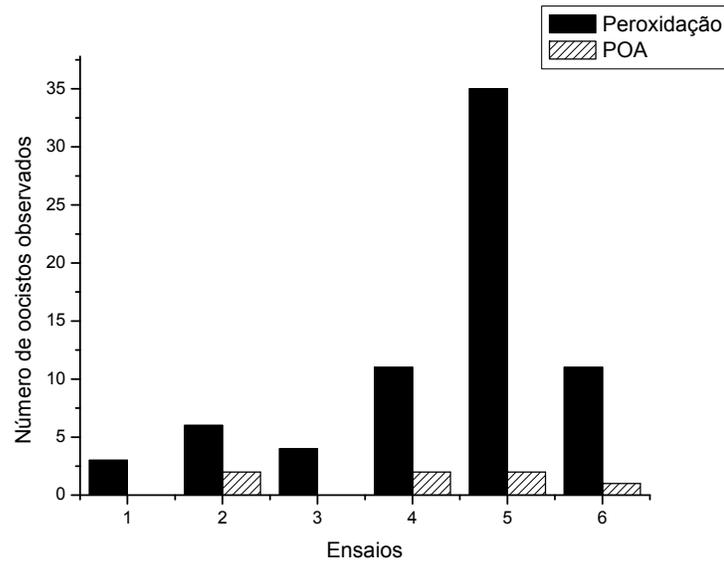


Figura 40: Número de oocistos de *Cryptosporidium* spp. observados após peroxidação e POA

Também foi realizada uma comparação da ação dos dois processos na parede de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *G. duodenalis*, com a metodologia de MEV. As imagens são mostradas nas Figuras 41 e 42.

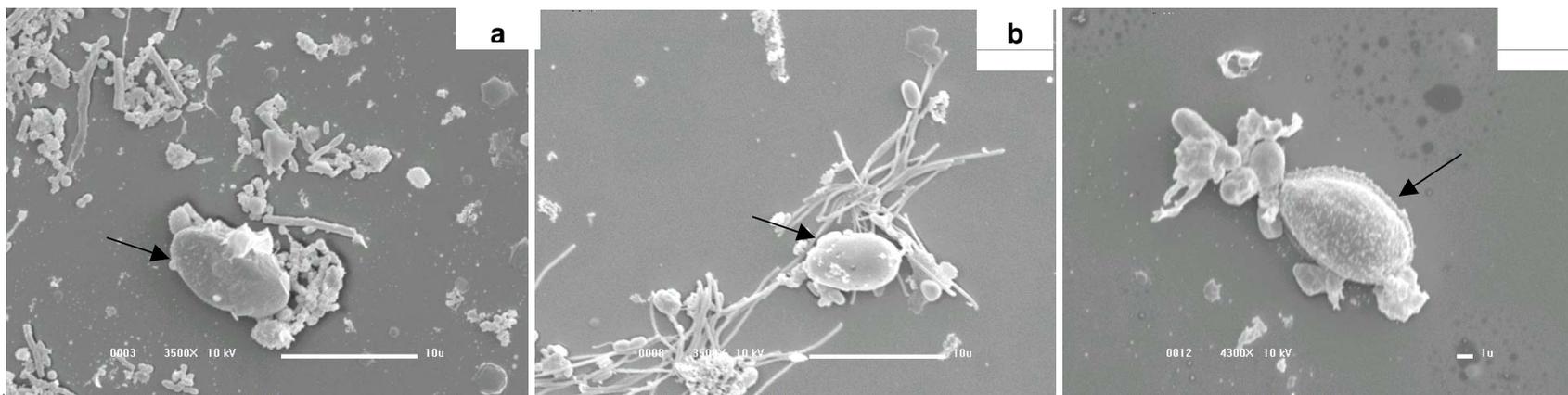


Figura 41: Cisto de *G. duodenalis* em amostra bruta 3500x (a), após peroxidação 3500x (b) e após POA 4300x (c)

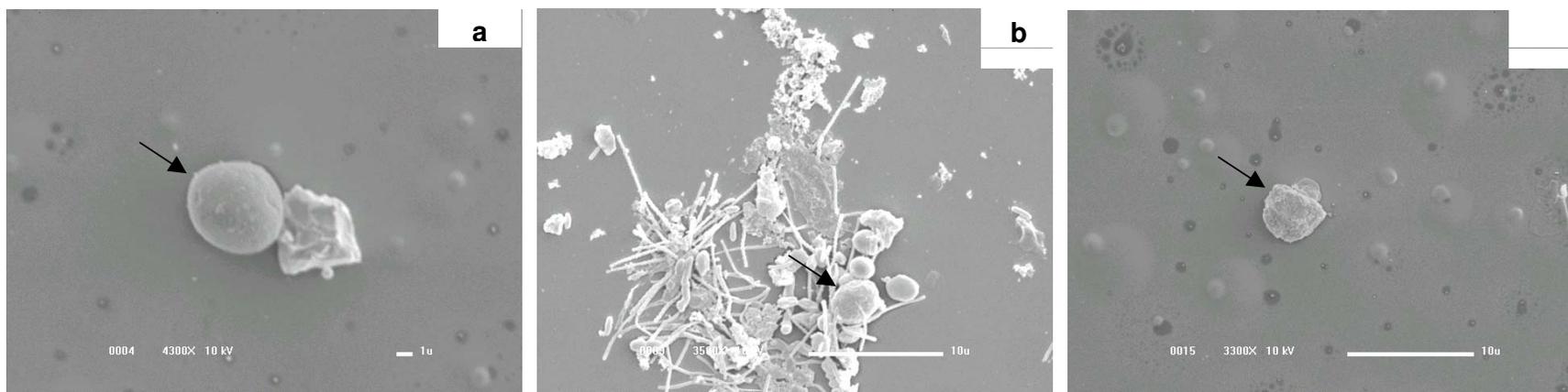


Figura 42: Oocisto de *Cryptosporidium* spp. em amostra bruta 4300x (a), após peroxidação 3500x (b) e após POA 3300x (c)

Verifica-se que, após o processo de peroxidação, o cisto de *G. duodenalis* apresentou alguns poros quando comparado com o cisto recuperado da amostra bruta, e, após o POA, observou-se a presença de uma retração de membrana, além da oxidação da parede do organismo. Assim pode-se inferir que a superfície do organismo foi mais danificada pelo POA, quando comparado ao processo de peroxidação nas condições estudadas.

Com relação ao *Cryptosporidium* spp. verifica-se algumas rugosidades na parede do oocisto após o ensaio de peroxidação, sem aparente alteração de sua forma. Porém, após o POA, o oocisto apresenta parede completamente rugosa e irregular com conseqüente alteração de forma, descaracterizando o formato padrão arredondado do organismo. Esta observação detalhada do oocisto submetido ao POA mostra dano mais evidente do que o causado pela peroxidação, confirmando uma maior eficiência deste processo nas condições estudadas.

Uma observação pertinente que pode também ser feita é a de fundo de lâmina, onde se verifica que, após o POA há menos sujidade quando comparada com o campo referente à amostra bruta e/ou após a peroxidação (Figura 41 e 42). Segundo Cheal *et al* (2009), os radicais hidroxila reagem com proteínas por múltiplos mecanismos, que levam a eventos de quebra do principal polipeptídeo e modificações na cadeia, tais como hidroxilação e formação de carbonila, resultando num efeito mais significativo do que o de outros oxidantes, tais como o peróxido aplicado de maneira isolada. Os tipos de alterações verificadas na parede dos protozoários observados neste estudo corroboram com os relatados por McGuigan *et al* (2006) que observaram dobras na parede do oocisto de *Cryptosporidium parvum* gerando acentuada alteração no formato do protozoário após 10 h de desinfecção com simulador de irradiação solar de 830 W m⁻².

Resultados obtidos por França (2007), que avaliou os danos na parede de cistos e oocistos que sofreram tratamento fotoeletroquímico, também foram semelhantes aos obtidos neste trabalho, porém com um tempo de ensaio de 90 minutos, superior ao aplicado neste trabalho e, evidentemente, em outras condições de ensaio. A autora relatou também redução da fluorescência padrão quando

avaliado pela coloração de RID e presença de poros e reentrâncias na avaliação com MEV.

É importante salientar que as condições experimentais até aqui estudadas no presente trabalho não são passíveis para uma transferência e aplicação em escala real, uma vez que as concentrações de peróxido de hidrogênio são extremamente altas. Dessa forma, optou-se pela realização de ensaios com uma concentração de oxidante na ordem de miligramas por litro, como preconizadas pelo POA, e uma dose de UV mais baixa.

5.3.2 Segunda etapa de experimentos

5.3.2.1 Processo Químico: Peroxidação (15 mg H₂O₂/ 5,5 s)

Durante os seis processos de peroxidação foi utilizada uma concentração de 15 mg H₂O₂ L⁻¹. Embora tenham ocorrido variações entre os ensaios realizados, o número de cistos de *G. duodenalis* recuperado foi bem maior do que o número de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Figura 43).

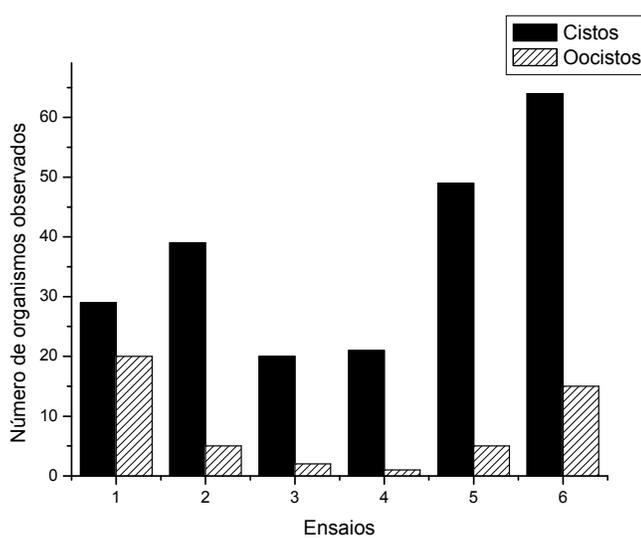


Figura 43: Número de organismos observados após peroxidação (15 mg H₂O₂/ 5,5 s)

Nos ensaios de peroxidação, 222 cistos (média de 37 cistos por ensaio) foram avaliados e classificados de acordo com os danos observados (Figura 44).

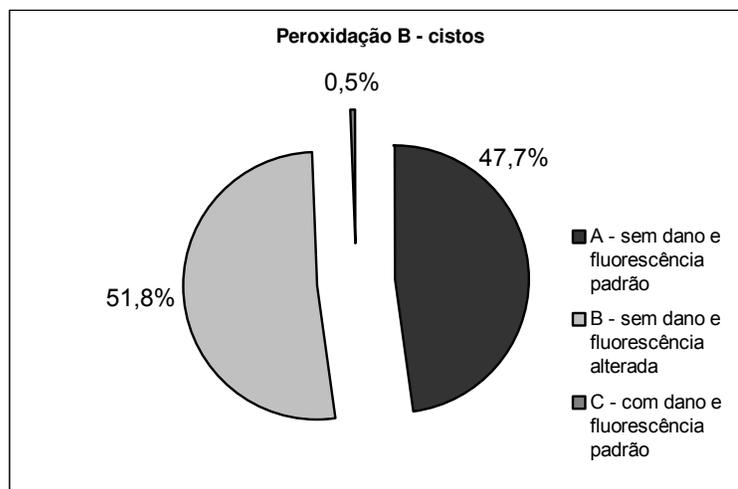


Figura 44: Porcentagem e classificação de cistos de *G. duodenalis* observados após peroxidação (15 mg H₂O₂/ 5,5 s).

Observou-se que aproximadamente 48,0 % dos cistos de *G. duodenalis* avaliados, após serem submetidos ao processo de peroxidação, ainda apresentaram padrão característico de fluorescência (Figura 45).



Figura 45: Cisto de *G. duodenalis* classificação A corado com RID (600x).

Por outro lado, foi observado que mais da metade dos cistos de *G. duodenalis* (Figura 44) apresentavam o padrão de fluorescência alterado (Figura 46).

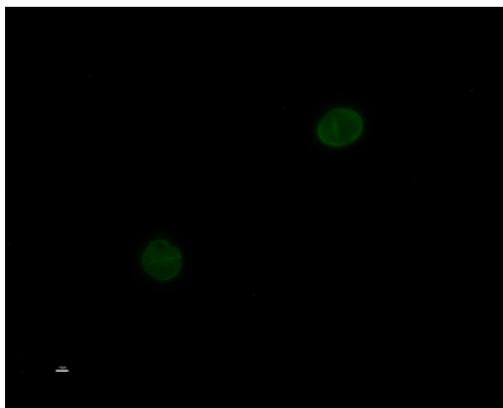


Figura 46: Cistos de *G. duodenalis* classificação B corados com RID (600x)

Muitas das observações realizadas pela microscopia de RID, inicialmente aparentavam classificação de dano D, com alteração de forma e fluorescência (Figura 47), mas ao serem confirmadas pela MCC indicavam que o organismo estava com material aderido. Assim foi classificado como dano B (alteração de fluorescência).

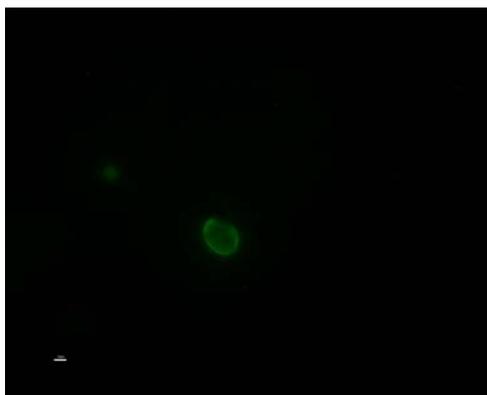


Figura 47: Cisto de *G. duodenalis* classificação B corado com RID (600x)

Na avaliação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., um número total de 48 oocistos (média de 8 oocistos por ensaio) foi recuperado nos 6 ensaios de peroxidação e, analisados quanto aos danos (Figura 48).

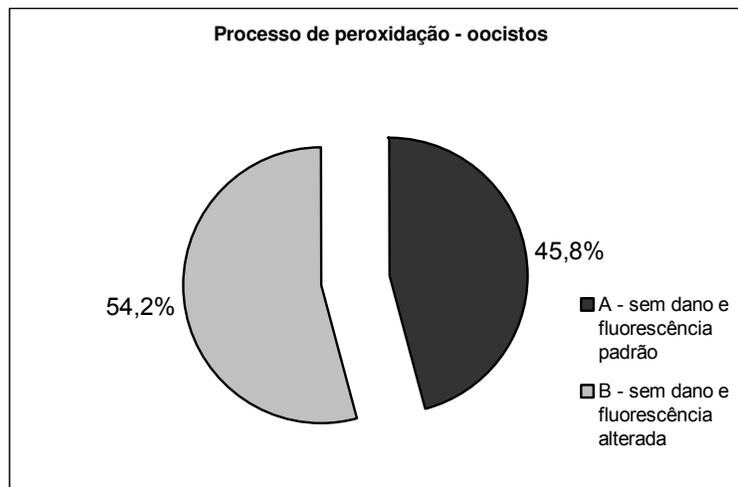


Figura 48: Porcentagem e classificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. observados após peroxidação (15 mg H₂O₂/ 5,5 s)

Levando-se em consideração a fluorescência, 45,8 % dos oocistos observados apresentaram a fluorescência e o formato sem alteração (classificação A) quando observada por RID (Figura 49). Porém, a maior parte dos oocistos observados teve alteração de fluorescência sem dano na forma do organismo (Figura 50).

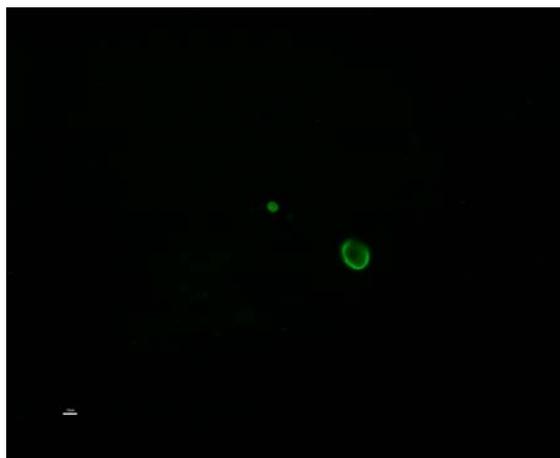


Figura 49: Oocisto de *Cryptosporidium* spp. classificação A e cisto de *G. duodenalis* classificação B corados por RID (400x).

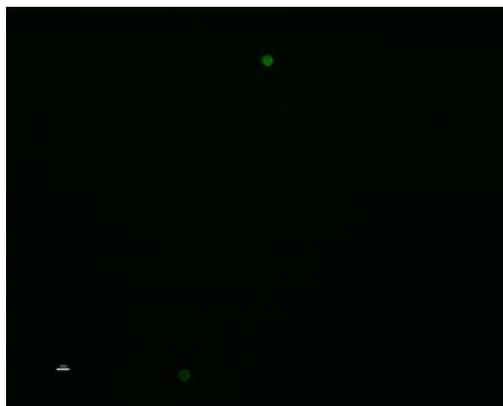


Figura 50: Oocistos de *Cryptosporidium* spp. classificação B corados por RID (400x).

Na avaliação utilizando-se da técnica MEV, foram visualizadas alterações quanto a integridade da parede do cisto de *G. duodenalis* após a peroxidação (Figura 51-b). Embora apresentando grande sensibilidade ao peróxido, os oocistos de *Cryptosporidium* spp. que foram recuperados após a peroxidação (Figura 52-b) não indicaram nenhuma alteração de forma ou na superfície do organismo.

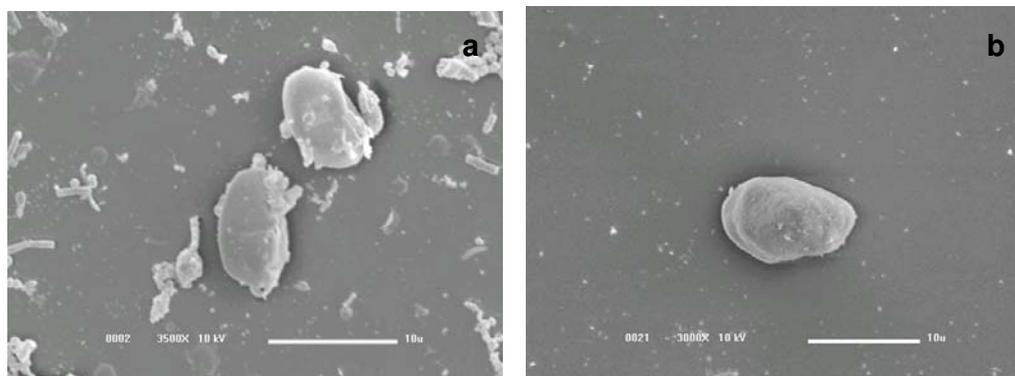


Figura 51: Cisto de *G. duodenalis* em amostra bruta 3500x (a) e após peroxidação 3000x (b).

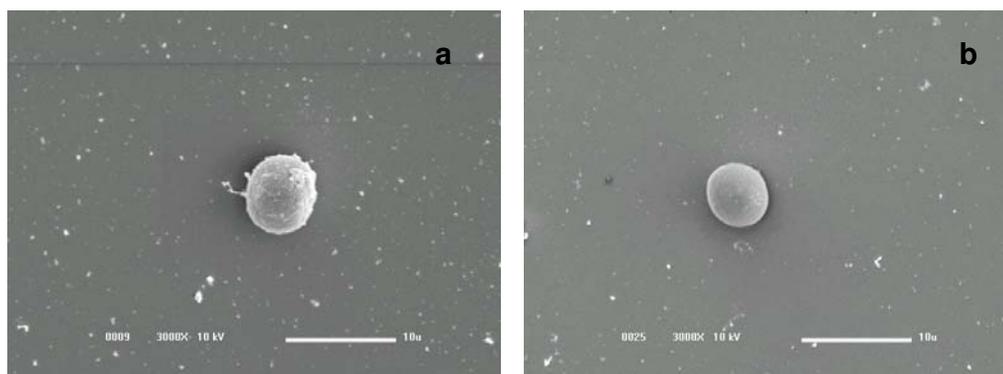


Figura 52: Oocisto de *Cryptosporidium* spp. em amostra bruta 3000x (a) e com peroxidação 3000x (b)

5.3.2.2 Processo Oxidativo Avançado: Peroxidação Assistida por Luz Ultravioleta (15 mg H₂O₂/44 mW s cm⁻² UV)

Após os ensaios de POA, o número de cistos de *G. duodenalis* recuperado foi bem maior do que o número de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Em comparação a todos os ensaios anteriores, este grupo de ensaios foi o que apresentou maior homogeneidade entre eles, para ambos os organismos (Figura 53).

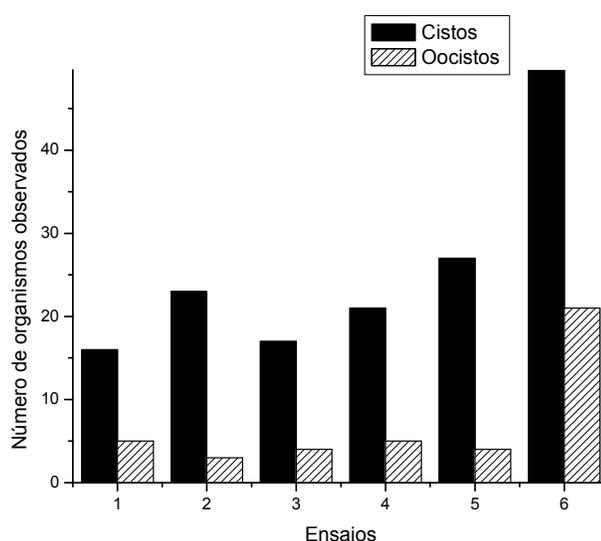


Figura 53: Número de organismos observados após POA (15 mg H₂O₂/44 mW s cm⁻² UV)

As observações dos possíveis danos causados aos cistos de *G. duodenalis*, quando submetidos ao processo em questão, foram feitas observando-se 159 organismos (média de 26,5 cistos por ensaio) recuperados após o processo (Figura 54).

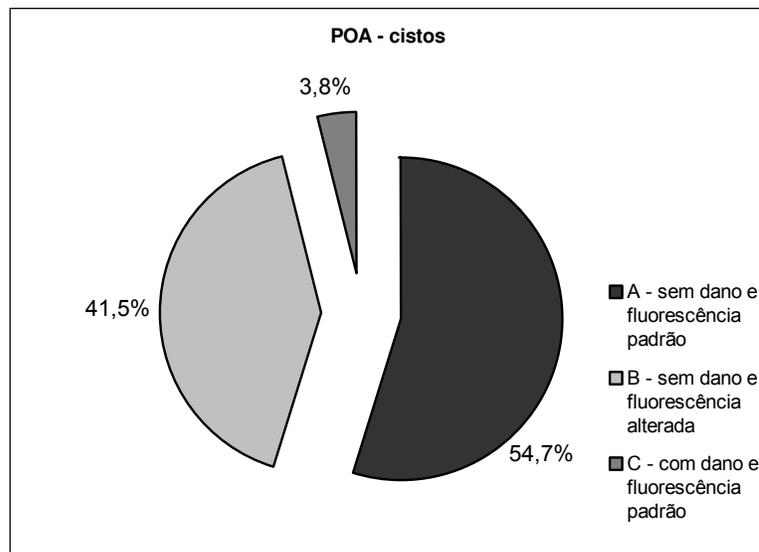


Figura 54: Porcentagem e classificação de cistos de *G. duodenalis* observados após POA (15 mg H₂O₂/44 mW s cm⁻² UV)

Pela análise dos cistos de *G. duodenalis* que passaram pelo reator fotoquímico, observou-se que a maioria dos cistos permaneceu com forma e fluorescência inalteradas (Figura 55), porém, cerca de 42 % teve alteração de fluorescência (Figura 56 e 57). Estes dados não são tão diferentes dos obtidos após os ensaios de peroxidação, porém, após o POA uma quantidade maior de cistos (3,8 %) sofreu alteração de forma, enquanto que, na peroxidação, somente 0,5 % dos cistos apresentaram este tipo de dano.

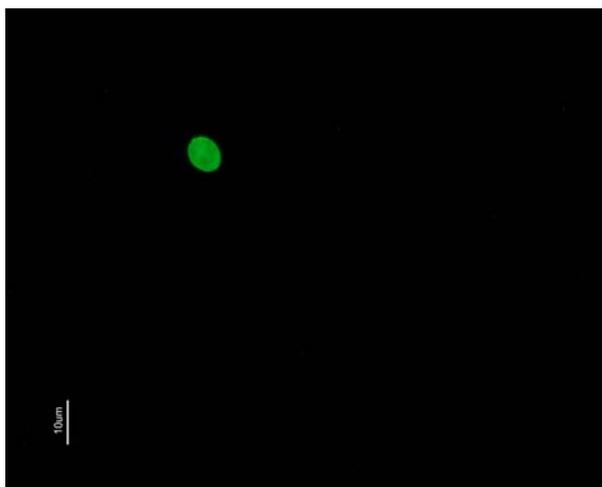


Figura 55: Cisto de *G. duodenalis* classificação A corado com RID (400x).

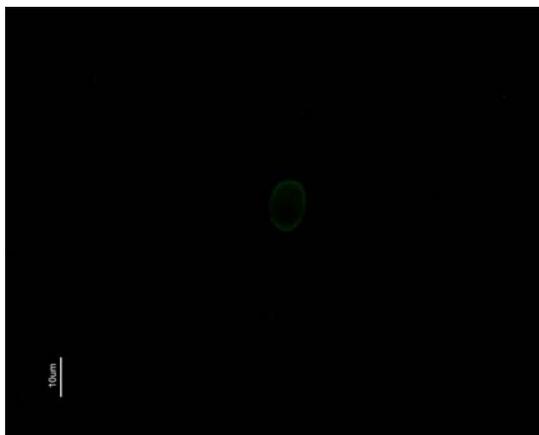


Figura 56: Cisto de *G. duodenalis* classificação B corado por RID (600x).

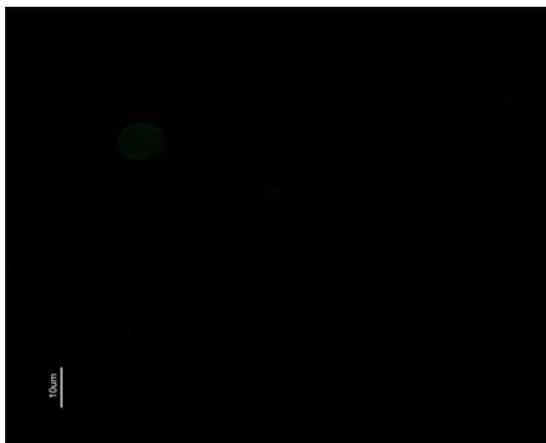


Figura 57: Cisto de *G. duodenalis* classificação B corado por RID (600x).

Um total de 42 oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram observados e analisados quanto aos possíveis danos após 6 ensaios de POA (média de 7 oocistos por ensaios) (Figura 58).

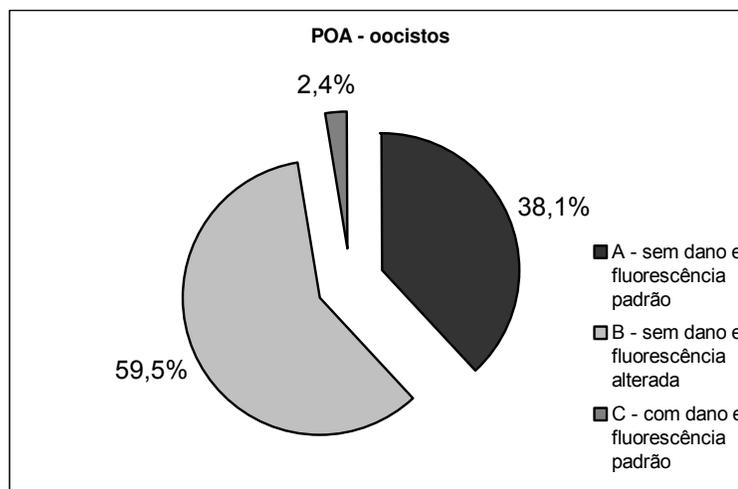


Figura 58: Porcentagem e classificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. observados após POA (15 mg H₂O₂/44 mW s cm⁻² UV)

Pelas visualizações é possível afirmar que 38,1 % dos oocistos exibiam aspecto similar aos padrões de reconhecimento (forma e fluorescência padrão) (Figura 59), o restante apresentou alteração de fluorescência (Figura 60) e, 2,4 % alteração de forma.



Figura 59: Oocisto de *Cryptosporidium* spp. classificação A corados com RID (400x).

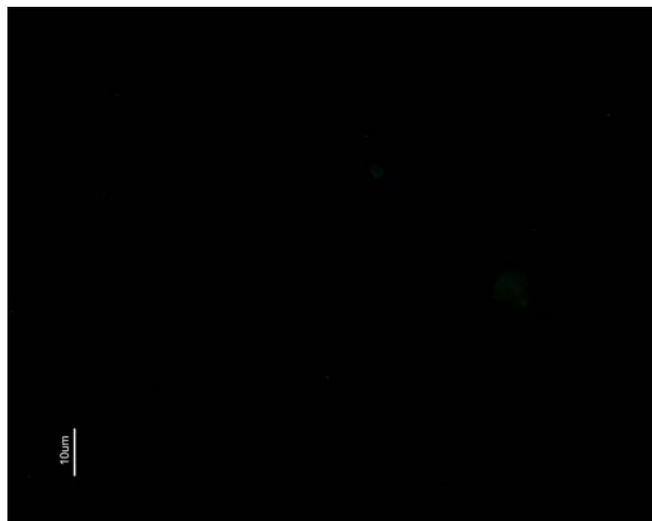


Figura 60: Oocisto de *Cryptosporidium* spp. classificação B corado com RID (200x)

Na avaliação por MEV dos cistos de *G. duodenalis* (Figuras 61 a e b) não foi verificada alterações na forma, porém, na parede do cisto pode-se observar rugosidades na sua superfície. Na avaliação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Figura 62 a e b) alterações na parede, como reentrâncias, foram observadas.

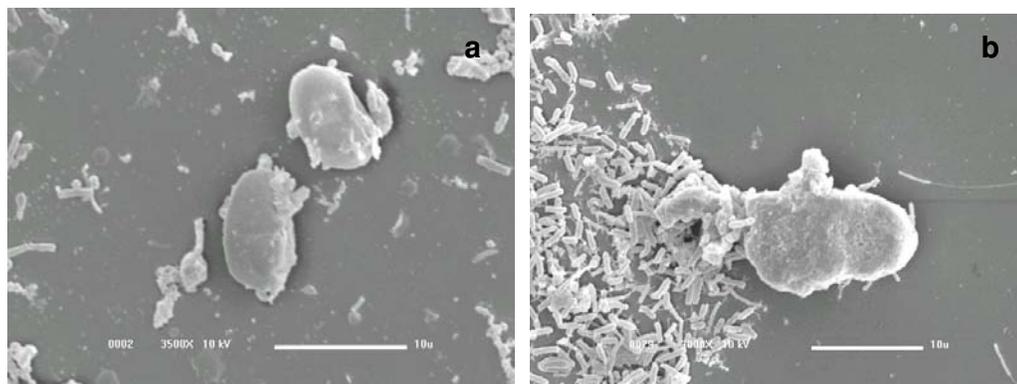


Figura 61: Cisto de *G. duodenalis* em amostra bruta 3500x (a) e após POA 3000x (b)

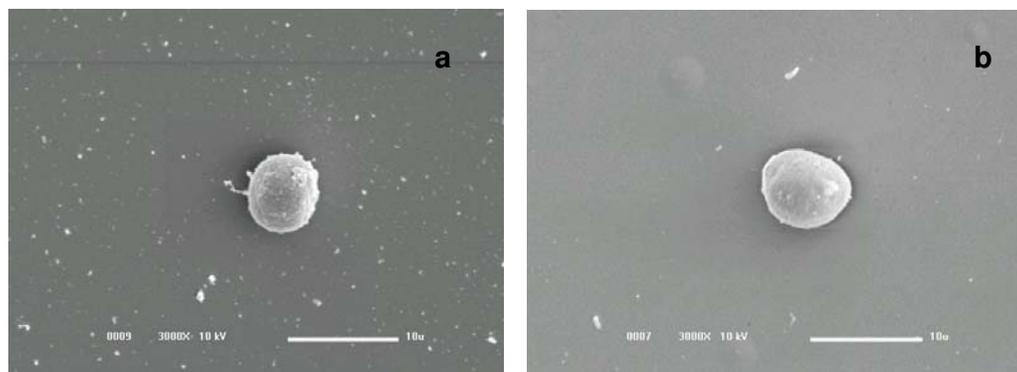


Figura 62: Oocisto de *Cryptosporidium* spp. em amostra bruta 3000x (a) e após POA 3000x (b)

O POA foi mais agressivo e eficiente na redução dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. quando comparada a ação sobre os cistos de *G. duodenalis* nas condições avaliadas.

5.3.2.3 Comparação entre os processos

De uma maneira geral, na comparação entre os ensaios de peroxidação e POA, o número de cistos de *G. duodenalis* recuperado entre os ensaios, mostra-se uma maior homogeneidade (Figura 63). Porém, ao se avaliar a quantidade de cistos recuperados, verifica-se que após o POA o número foi na maioria das vezes menor do que a quantidade recuperada após a peroxidação, em 5 dos 6 ensaios realizados.

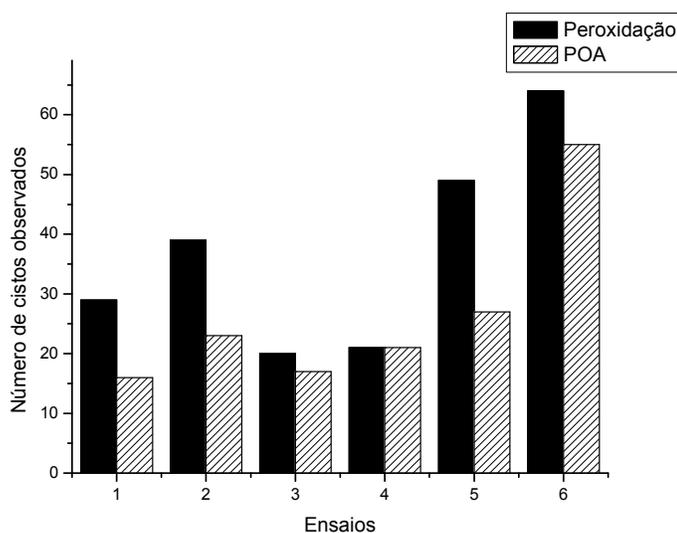


Figura 63: Número de cistos de *G. duodenalis* após os 6 ensaios de peroxidação e os 6 ensaios de POA

Quanto à fluorescência em cistos de *G. duodenalis*, os resultados não foram discrepantes entre os processos: peroxidação com 48,0 % e POA com 55,0 % dos cistos com fluorescência padrão.

Porém, pode-se observar que aproximadamente 4,0 % de cistos apresentaram alteração de forma (classificação C) após os ensaios de POA, sendo este tipo de dano observado somente em 0,5 % dos cistos após a peroxidação.

Na análise dos dois processos, levando-se em consideração os oocistos de *Cryptosporidium* spp., verifica-se que o número total recuperado e avaliado foi bastante semelhante, ou seja, 42 organismos após o POA e 48 após a peroxidação (Figura 64).

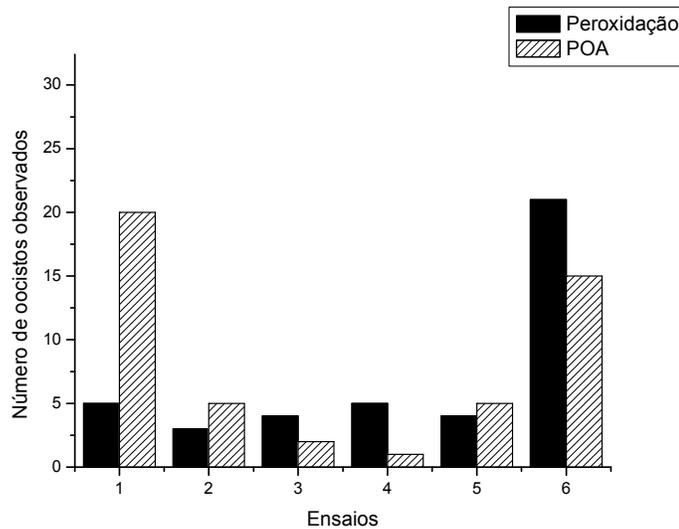


Figura 64: Número de oocistos de *Cryptosporidium* spp. após os 6 ensaios de peroxidação e os 6 ensaios de POA

Com relação aos danos causados à parede dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. o POA causou alteração de forma em 2,4 % dos oocistos, enquanto que a peroxidação causou somente alteração no padrão de fluorescência.

Uma seqüência de imagens dos cistos de *G. duodenalis* e oocistos de *Cryptosporidium* spp., respectivamente, em amostra bruta, após peroxidação e após POA auxiliam na visualização comparativa da ação dos processos sobre estes organismos (Figura 65 e 66). Conforme já apresentado, nos ensaios realizados nas condições da segunda etapa experimental (15 mg H₂O₂ e 44 mW s cm⁻² UV), poucos foram os cistos e oocistos observados e relatados com alterações de forma. Portanto, tendo o organismo somente a alteração de fluorescência, a verificação desta alteração com a visualização na análise em MEV, foi prejudicada. Isso ocorre porque algumas alterações na superfície da parede do protozoário só serão percebidas na falha da ligação antígeno-anticorpo, que é observada com RID e, nem sempre tais falhas são visíveis pela visualização com MEV.

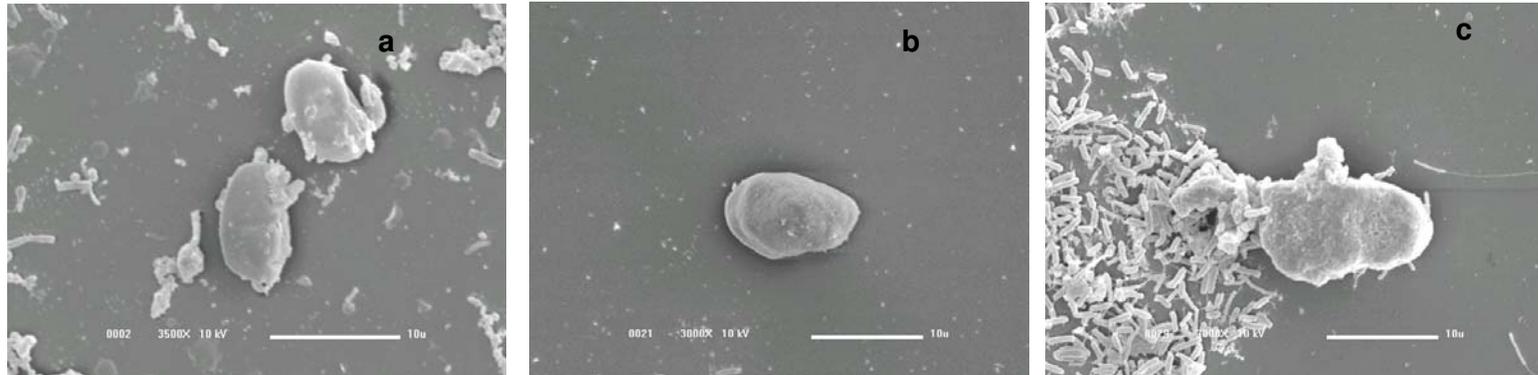


Figura 65: Cisto de *G. duodenalis* em amostra bruta 3500x (a), após peroxidação 3000x (b) e após POA 3000x (c)

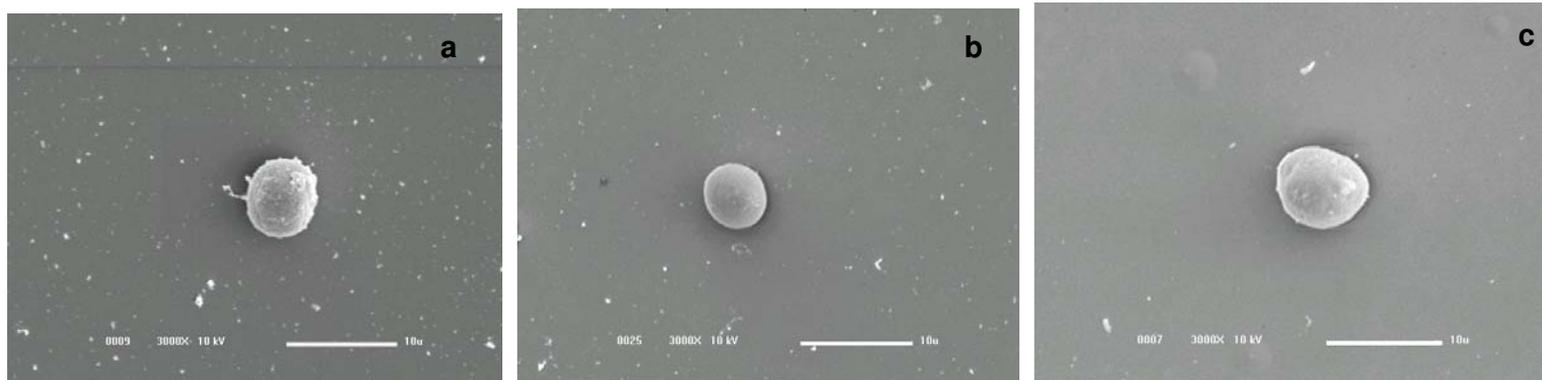


Figura 66: Oocisto de *Cryptosporidium* spp. em amostra bruta 3000x (a), após peroxidação 3000x (b) e após POA 3000x (c)

Com relação à observação do fundo do campo, nos ensaios da segunda etapa experimental, tomou-se o cuidado de captar imagens do campo para melhor ilustrar a ação dos agentes oxidantes dos processos (Figura 67). Assim, pode-se verificar que após os ensaios de POA (Figura 67-b), a visualização era facilitada, pois o campo era mais limpo do que as que eram realizadas com amostra pós peroxidação (Figura 67-a).

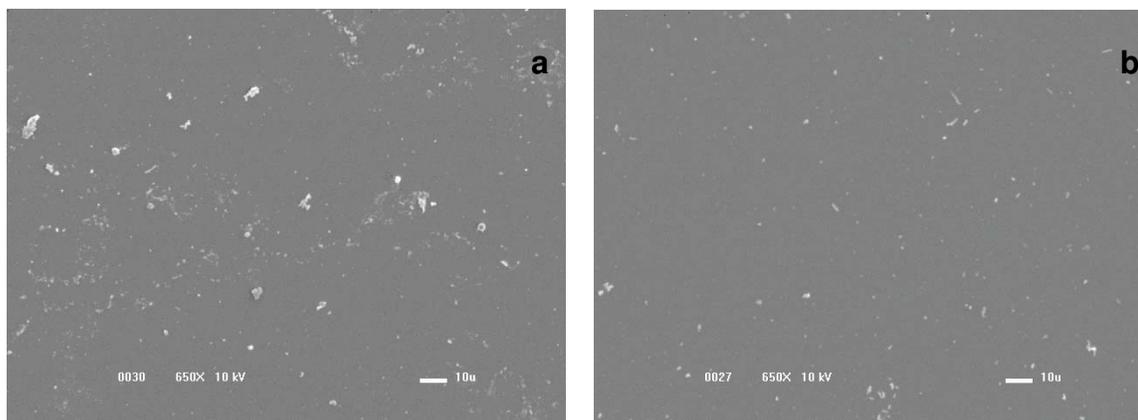


Figura 67: Campo microscópico após peroxidação (a) e POA (b) na MEV (650x).

Isto ocorreu provavelmente pela ação sinérgica existente no POA entre o oxidante (peróxido de hidrogênio) e a luz ultravioleta, com a conseqüente formação do radical hidroxila, um poderoso e não seletivo oxidante.

5.4 Monitoramento do peróxido de hidrogênio

5.4.1 Monitoramento do Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) da Primeira etapa de experimentos.

Para o monitoramento do consumo do oxidante foi utilizado um método baseado na reação de óxido-redução entre o peróxido de hidrogênio presente na solução e o íon

metavanadato numa solução ácida. A detecção foi realizada utilizando-se da espectrofotometria, $\lambda = 450 \text{ nm}$ (Nogueira *et al*, 2005). Para tanto, foi necessário que se confeccionasse uma curva analítica (Figura 68).

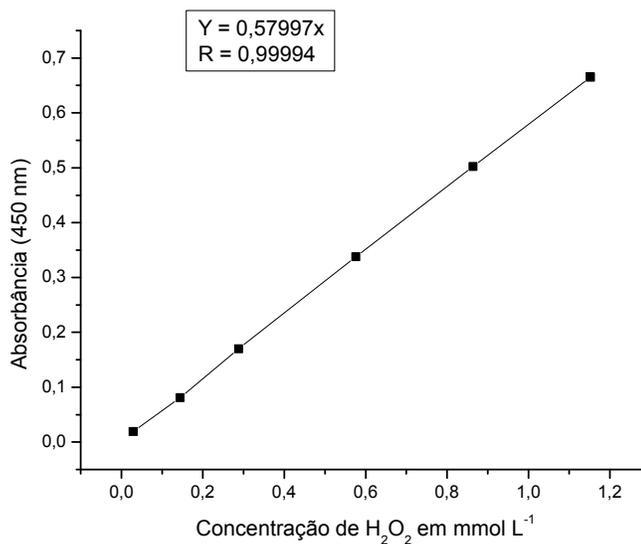


Figura 68: Curva analítica para determinação da concentração de H₂O₂

A partir da curva analítica pode-se determinar a quantidade de peróxido de hidrogênio inicialmente adicionada à água sintética com a inoculação dos protozoários e, a quantidade de peróxido remanescente no final do ensaio. Portanto, foi possível determinar-se o consumo do oxidante nos processos estudados. Foi realizada a quantificação de consumo de peróxido de hidrogênio em dois ensaios de POA e dois ensaios de peroxidação. Os resultados estão apresentados na Tabela 09.

Tabela 09: Consumo de peróxido de hidrogênio nos diferentes tipos de processos

Ensaio	H ₂ O ₂ inicial (mmol L ⁻¹)	H ₂ O ₂ final (mmol L ⁻¹)	Consumo de H ₂ O ₂ (mmol L ⁻¹)
H ₂ O ₂	215,64	211,67	3,97
H ₂ O ₂	210,01	204,38	5,63
POA	216,49	207,55	8,94
POA	206,7	202,39	4,31

Pode-se verificar que em média, o consumo de peróxido de hidrogênio foi maior nos POA do que nos ensaios onde se aplicou o oxidante isoladamente.

5.4.2 Monitoramento do Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) da Segunda etapa de experimentos.

Nos ensaios realizados na segunda etapa experimental o consumo de peróxido de hidrogênio foi muito pequeno, tanto para os ensaios de peroxidação quanto para o POA. Acredita-se que a dose de UV não tenha possibilitado a geração de uma grande quantidade de radicais hidroxila, não sendo possível a detecção deste consumo. Assim, o consumo de peróxido de hidrogênio se encontrou abaixo do limite de detecção que foi determinado em 0,0797 mmol L⁻¹. Isso seria possível, pois segundo Betancourt, Rose (2004), a vazão influencia na eficiência da luz UV, podendo se obter diferentes taxas de geração de radicais hidroxila ou mesmo desinfecção com variações, baseada na vazão do efluente. Segundo Chen *et al* (2009) a utilização da radiação UV em um sistema de fluxo contínuo é complexa, sendo necessária a sua avaliação de acordo com as características do projeto e do efluente a ser desinfetado.

5.5 Comparação entre as concentrações do oxidante e a dose da luz UV utilizadas nos ensaios de POA

Em relação ao número de organismos recuperados, cistos de *G. duodenalis* foram observados em maior número após os experimentos onde a concentração de peróxido e doses de UV foram menores (Figura 69).

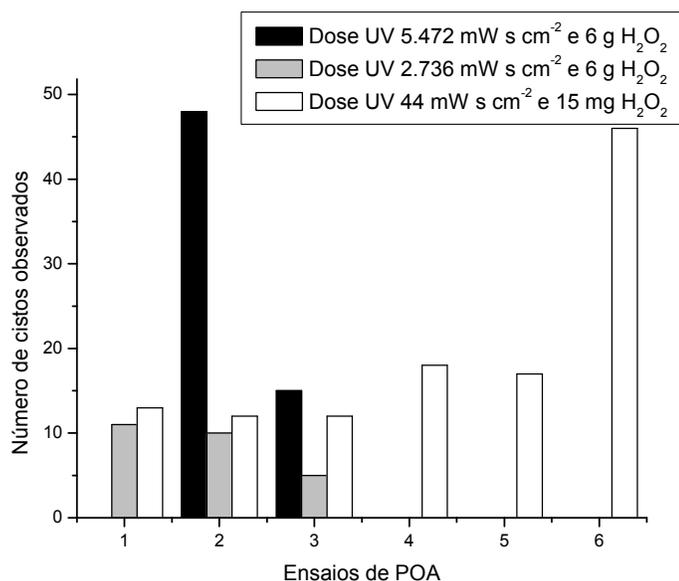


Figura 69: Número de cistos observados de *G. duodenalis* após POA

Verificou-se uma grande quantidade de cistos após a maior dose de UV (5.472 mW s cm⁻² e 6 g H₂O₂) o que pode ser explicado, novamente, pela agregação dos organismos utilizados nos primeiros ensaios realizados.

Com a menor dose de UV utilizada, 44 mW s cm⁻² e 15 mg H₂O₂, observou-se uma redução do número de cistos de *G. duodenalis* na maioria dos ensaios realizados (Figura 70), além disso, a porcentagem de cistos de *G. duodenalis* com alteração de fluorescência foi a maior alcançada em todas as condições estudadas, apresentando 41,5 % dos cistos.

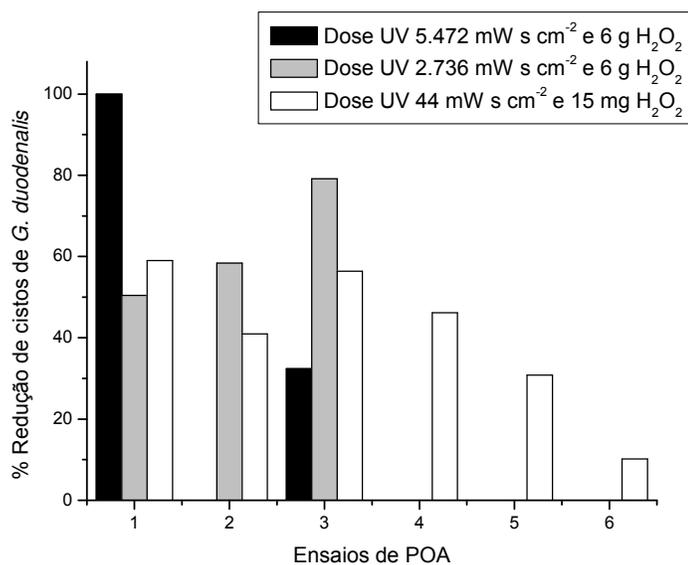


Figura 70: Porcentagem de redução de cistos de *G. duodenalis* após POA

A alteração de fluorescência foi observada em 41,5 % e alteração de forma em 3,8 % dos cistos após a aplicação da menor concentração de peróxido e menor dose de radiação UV.

Com relação aos oocistos de *Cryptosporidium* spp., verificou-se que a utilização de uma dose de UV de 5.472 mW s cm⁻² e 6 g H₂O₂, resultou na recuperação de apenas dois oocistos de *Cryptosporidium* spp. e, assim, pode-se inferir que esta dose foi o suficiente para a destruição das formas ou, a degradação dos epítomos da parede do organismo, impossibilitando a ligação antígeno-anticorpo. O mesmo foi observado após a utilização da dose de 2.736 mW s cm⁻² e 6 g H₂O₂. Sendo assim, pode-se inferir que estas doses são eficientes na redução de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Verificou-se também que, após a utilização de uma menor dose de UV (44 mW s cm⁻² e 15 mg H₂O₂) obteve-se recuperação de um número maior de organismos (Figura 71).

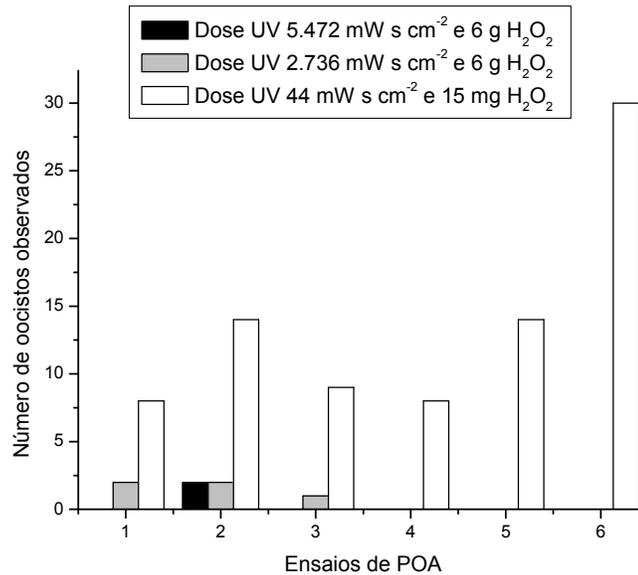


Figura 71: Número de oocistos de *Cryptosporidium* spp. após POA

Verificou-se que a redução da dose de UV não influenciou na ação do processo nem em relação aos oocistos de *Cryptosporidium* spp. quanto aos cistos de *G. duodenalis*. A menor redução de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi obtida após a redução da concentração de peróxido de hidrogênio para 15 mg L⁻¹ que ocorreu nos ensaios com utilização de menor dose de UV 44 mW s cm⁻² (Figura 72).

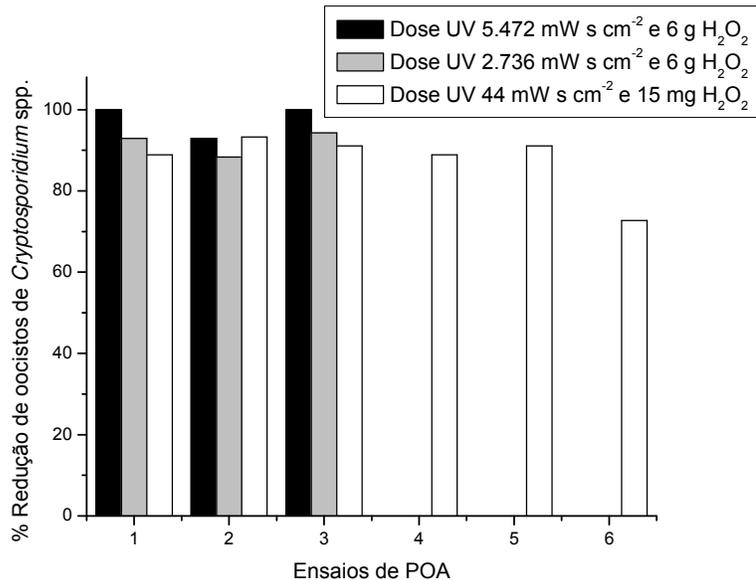


Figura 72: Porcentagem de redução de oocistos de *Cryptosporidium* spp. após POA

Com relação aos danos observados nos oocistos de *Cryptosporidium* spp. após os ensaios de POA, observou-se que o dano obtido pelos organismos recuperados foi bem pronunciado, já que a maioria dos organismos (59,5 %) apresentou alteração de fluorescência e em 2,4 % foram constatadas alterações de forma.

Quanto à avaliação dos processos de desinfecção, vale ressaltar que as metodologias utilizadas em muitos estudos disponíveis na literatura, são do tipo “batelada” sem recirculação onde a solução aquosa, em geral, é de um pequeno volume (menos que 100 mL), inoculada com grande concentração de protozoários (cerca de 10^6 organismos) e ficam sob a irradiação UV pelo tempo estipulado para a dose desejada. É utilizada uma placa de Petri, com a solução contendo os organismos que geralmente fica sobre um agitador e a uma distância pré-estipulada da lâmpada (LI *et al*, 2008, SHIN *et al*, 2009).

Este método difere do adotado no presente estudo onde um volume maior, de 1000 mL, é circulado pelo tempo necessário até que se alcance a dose estipulada, por um sistema complexo, com bomba, mangueiras e o reator fotoquímico. Este sistema,

embora de bancada, se assemelha aos reatores instalados em estações de Tratamento de Água, para desinfecção por UV.

A diferença de método deve ser considerada, pois a movimentação dos organismos no líquido que está sendo desinfetado é diferente, podendo afetar o alcance da irradiação no organismo, interferindo, portanto na eficiência final do processo.

Capítulo 6

Conclusões

6. Conclusões

- O Processo oxidativo avançando com a utilização de dose de irradiação UV de 5.472 mW s cm⁻² e concentração de peróxido de hidrogênio de 6 g L⁻¹ permitiu a redução de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia duodenalis*;
- Os organismos recuperados e observados após o POA com dose de irradiação UV de 5.472 mW s cm⁻² e concentração de peróxido de hidrogênio de 6 g L⁻¹ foram 2 oocistos de *Cryptosporidium* spp. com alteração de forma e/ou fluorescência e 63 cistos de *Giardia duodenalis*, sendo que 46,0 % deles apresentaram algum tipo de dano na forma e/ou na fluorescência;
- O Processo oxidativo avançando com a utilização de dose de irradiação UV de 44 mW s cm⁻² e concentração de peróxido de hidrogênio de 15 mg L⁻¹ alterou 45,3 % dos cistos de *Giardia duodenalis* e dos 61,9 % dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. na forma e/ou na fluorescência;
- Segundo os resultados pode-se inferir que o POA, nas condições estudadas, pode ser utilizado como processo de desinfecção para inativação dos protozoários avaliados;
- Oocistos de *Cryptosporidium* spp. mostraram-se mais sensíveis ao POA quando comparado com os cistos de *Giardia duodenalis*.

Capítulo 7

Referências

7. Referências

APHA-AWWA-WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 20th ed., Washington DC: American Public Health Association, 1998.

ALROUSAN, D.M.A.; DUNLOP, P.S.M.; McMURRAY, T.A.; ANTHONY BYRNE, J. Photocatalytic inactivation of *E. coli* in surface water using immobilised nanoparticle TiO₂ films. **Water Research**, v. 43, p. 47-54, 2009.

BARBEE, S.L.; WEBER, D.J.; SOBSEY, M.D.; RUTALA, W.A. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity by disinfection and sterilization processes. **Gastrointestinal endoscopy**, v. 49, n. 5, 1999.

BELLAMY, W.D.; CLEASBY, J.L.; LOGSDON, G.S.; ALLE, M.J. Assessing treatment plant performance. **Journal of the American Water Works Association**, v. 85, n. 12, p. 34-38, 1993.

BELOSEVIC, M.; CRAIK, S.A.; STAFFORD, J.L.; NEUMANN, N.F.; KRUITHOF, J.; SMITH, D.W. Studies on the resistance/reactivation of *Giardia muris* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts exposed to medium-pressure ultraviolet radiation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, p. 197-203, 2001.

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

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE – Portaria 518 de 25 de Março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.

BRIANCESCO, R.; BONADONNA, L. An Italian study on *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater, freshwater and treated water. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 104, p. 445-457, 2005.

CACCIÒ, S.M.; DE GIACOMO, M.; AULICINO F.A.; POZIO E. *Giardia* Cysts in Wastewater Treatment Plants in Italy. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3393-3398, 2003.

CACCIÒ, S.M.; THOMPSON, R.C.A.; McLAUHLIN, J.; SMITH, H.V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **TRENDS in Parasitology**, v. 21, n. 9, p. 430-437, 2005.

CACCIÒ, S.M.; RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 160, p. 75–80, 2008.

CACCIÒ, S.M.; SPRONG, H. *Giardia duodenalis*: Genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 107-112, 2010.

CANTUSIO NETO, R.; SANTOS, L.U.; FRANCO, R.M.B. Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* species cysts and *Cryptosporidium* oocysts by UV at a sludge treatment plant in Campinas, south-east Brazil. **Water Science & Technology**, v. 54, n. 3, p. 89-94, 2006.

- CANTUSIO NETO, R. **Estudo dos métodos: floculação em carbonato de cálcio e adaptação das técnicas de filtração em membrana e separação imunomagnética para a detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras hídricas.** 2008. 127 f. Tese de Doutorado – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- CAREY, C.M.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water Research**, v. 38, p. 818-862, 2004.
- CARMENA, D.; AGUINAGALDE, X.; ZIGORRAGA, C.; FERNÁNDEZ-CRESPO, J.C.; OCIO, J.A. Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 619-629, 2007.
- CARON, E.; CHEVREFILS Jr., G.; BARBEAU, B.; PAYMENT, P.; PRÉVOST, M. Impact of microparticles on UV disinfection of indigenous aerobic spores. **Water Research**, v. 41, p. 4546 – 4556, 2007.
- CASTRO-HERMIDA, J.A.; PORS, I.; MÉNDEZ-HERMIDA, F.; ARES-MAZÁS, E.; CHARTIER, C. Evaluation of two commercial disinfectants on the viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 340–345, 2006.
- CASTRO-HERMIDA, J.A.; GARCÍA-PRECEDO, I.; ALMEIDA, A.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; COSTA, J.M.C. da; MEZO, M. Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. **Water Research**, v. 42, p. 3528-3538, 2008.
- CASTRO-HERMIDA, J.A.; GARCÍA-PRECEDO, I.; ALMEIDA, A.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; COSTA, J.M.C. da; MEZO, M. Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: A health risk for humans and animals. **Water Research**, v. 43, p. 4133-4142, 2009.
- CHALMERS, R.M.; DAVIES, A.P. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 138–146, 2010.
- CHEAL, S.M.; NG, M.; BARRIOS, B.; MIAO, Z.; KALANI, A.K.; MEARES, C.F. Mapping Protein-Protein Interactions by Localized Oxidation: Consequences of the Reach of Hydroxyl Radical. **Biochemistry**, v. 48, p. 4577-4586, 2009.
- CHEN, R.Z.; CRAIK, S.A.; BOLTON, J.R. Comparison of the action spectra and relative DNA absorbance spectra of microorganisms: Information important for the determination of germicidal fluence (UV dose) in an ultraviolet disinfection of water. **Water Research**, v. 43, p. 5087-5096, 2009.
- CHENG, Y.W.; CHAN, R.C.Y.; WONG, P.K. Desinfection of *Legionella pneumophila* by photocatalytic oxidation. **Water Research**, v. 41, p. 842-852, 2007.
- CHENG, H.A.; LUCY, F.F.; GRACZYK, T.K.; BROADERS, M.A.; TAMANG, L.; CONNOLLY, M. Fate of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts and *Giardia duodenalis* cysts during secondary wastewater treatments. **Parasitol. Res.**, v. 105, p. 689-696, 2009.

- CHO, M., YOON, J. Measurement of OH radical CT for inactivating *Cryptosporidium parvum* using photo/ferrioxalate and photo/TiO₂ systems. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 759-766, 2008.
- CLANCY, J.L.; BUKHARI, Z.; MCCUIN, R.M.; MATHESON, Z.; FRICKER, C.R. USEPA method 1622. **Journal of the American Water Works Association**, v. 91, n. 9, p. 60-68, 1999.
- CLANCY, J.L.; BUKHARI, Z.; STERLING, C.R.; MARSHALL, M.M; KORICH, D.G.; SCHAEFER III, F.W.; ROSEN, J.S. Cell culture method not yet viable. **J. AWWA**, v. 92, n. 4, p. 4-6, 2000.
- COOK, N.; PATON, C.A.; WIKINSON, N.; NICHOLS, R.A.B.; BARKER, K.; SMITH, H.V. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 1: Development and optimization of methods. **International Journal Food Microbiology**, v. 109, n. 3, p. 215-221, 2006.
- CORDEIRO, A.C. de S.; LEITE, S.G.F.; DEZOTTI, M. Inativação por oxidação fotocatalítica de *Escherichia coli* e *Pseudomonas* sp. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 689-694, 2004.
- CORDÓN, G.P.; SOLDAN, O.C.P.; VÁSQUEZ, F.V.; SOTO, J.R.V.; BORDES, L.S.; MORENO, M.S.; ROSALES, M.J. Prevalence of enteroparasites and genotyping of *Giardia lamblia* in Peruvian children. **Parasitol. Res.**, v. 103, p. 459–465, 2008.
- CORSO, P.S.; KRAMER, M.H.; BLAIR, K.A.; ADDISS, D.G.; DAVIS, J.P.; HADDIX, A.C. Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 426-431, 2003.
- CRAIK, S.A.; FINCH, G.R.; BOLTON, J.R.; BELOSEVIC, M. Inactivation of *Giardia muris* cysts using medium-pressure ultraviolet radiation in filtered drinking water. **Water Research**, v. 34, n. 18, p. 4325-4332, 2000.
- CRAIK, S.A.; WELDON, D.; FINCH, G.R.; BOLTON, J.R.; BELOSEVIC, M. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts using medium- and low-pressure ultraviolet radiation. **Water Research**, v. 35, n. 6, p. 1387-1398, 2001.
- D'ANTONIO, R.G.; WINN, R.E.; TAYLOR, J.P.; GUSTAFSON, T.L.; CURRENT, W.L.; RHODES, M.M.; GARY, G.W.; ZAJAC, R.A. A Waterborne Outbreak of Cryptosporidiosis in Normal Hosts. **Ann Intern Med.**, v. 103, p. 886-888, 1985.
- DAWSON, D. Foodborne protozoan parasites. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 207-227, 2005.
- DILLINGHAM, R.A; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 1059-1066, 2002.
- DOMÈNECH, X., JARDIM, W. F., LITTER, M. I. **Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes**. In: Eliminación de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogénea, cap. 1, *Rede CYTED*, La Plata, 2001.
- EDELKOPF, M.B. Removal of viable and inactivated *Cryptosporidium* by dual- and tri-media filtration. **Water Research**, v. 37, p. 2998-3008, 2003.

ERLANDSEN, S.L.; MACECHKO, P.T.; KEULEN, H.V.; JARROLL, E.L. Formation of the *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. **Euk. Microbiol.**, v. 43, n. 5, p. 416-429, 1996.

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

FAYER, R.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **TRENDS in Parasitology**, v. 20, n. 11, p.531-536, 2004.

FARIAS, E.W.C.; GAMBÁ, R.C.; PELLIZARI, V.H. Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw sewage and creek water in the city of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 41-43, 2002.

FERGUSON C.; KAUCNER, C.; KROGH, M.; DEERE, D.; WARNECKE, M. Comparison of methods for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from raw waters. **Canadian Journal Microbiology**, v. 50, p. 675-682, 2004.

FRANÇA, R.B. *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e ovos de helmintos em esgoto hospitalar: destruição e análise do dano estrutural dos protozoários após o processo fotoeletroquímico. **Tese de Mestrado**. Unicamp. 159p., 2007.

FRANCO, R.M.B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 2, p.109-111, 2001.

FRANCO, R.M.B.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in bottled mineral water commercialized in the city of Campinas, state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 205-207, 2002.

FRANCO, R.M.B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em Saúde Pública. **Revista Panamericana de Infectología**, v. 9, n. 1, p. 36-43, 2007.

FRICKER, C.R.; CRABB, J. Waterborne cryptosporidiosis: detection methods and treatment options. **Advanced Parasitology**, v. 40, p. 241-278, 1998.

GEURDEN, T.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOUT, E. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 98–106, 2010.

GÓMEZ-COUSO, H.; MÉNDEZ-HERMIDA, F.; CASTRO-HERMIDA, J.A.; ARES-MAZÁS, E. *Giardia* in shellfish-farming areas: Detection in mussels, river water and waste waters. **Veterinary Parasitology**, v. 133, p. 13-18, 2005.

GÓMEZ-LOPES, M.D.; BAYO, J.; GARCÍA-CASCALES, M.S.; ANGOSTO, J. M. Decision support in disinfection technologies for treated wastewater reuse. **Journal of Cleaner Production**, v. 17, p. 1504-1511, 2009.

GUIMARÃES, J.R.; BARRETTO, A.S. Photocatalytic inactivation of *Clostridium perfringens* and coliphages in water. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 20, n. 4, p. 403-411, 2003.

- GUIMARÃES, J.R.; IBÁÑEZ, J.; LITTER, M. I.; PIZARRO, R. Eliminación de contaminantes por fotocátalisis heterogénea. 1. ed. Madrid: Editorial Ciemat, 1: 375-388, 2004.
- HAYES, S.L.; RICE, E.W.; WARE, M.W.; SCHAEFER III, F.W. Low pressure ultraviolet studies for inactivation of *Giardia muris* cysts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 54-59, 2003.
- HARGREAVES, A.; TAIWO, F.A.; DUGGAN, O.; KIRK, S.H.; AHMAD, S.I. Near-ultraviolet photolysis of b-phenylpyruvic acid generates free radicals and results in DNA damage. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 89, p. 110-116, 2007.
- HELLER, L.; BASTOS, R.K.X.; VIEIRA, M.B.C.M.; BEVILACQUA, P.D.; BRITO, L.L.A.; MOTA, S.M.M.; OLIVEIRA, A.A.; MACHADO, P.M.; SALVADOR, D.P.; CARDOSO, A.B. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 13, n. 2, p. 79-92, 2004.
- HELLER, L.; VIEIRA, M. B. C. M.; BRITO, L. L. A.; SALVADOR, D. P. Desempenho da Filtração Lenta em Areia Submetida a Cargas de Pico de Oocistos de *Cryptosporidium* spp, Bactérias e Sólidos: uma Avaliação em Instalação Piloto. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 27-38, 2006.
- HELLER, L.; VIEIRA, M.B.C.M.; BRITO, L.L.A.; SALVADOR, D.P. Association between the concentration of protozoa and surrogates in effluents of the slow sand filtration for water treatment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p.337-345, 2007.
- HERNÁNDEZ, F.; HERNÁNDEZ, D.; ZAMORA, Z.; DÍAZ, M; ANCHETA, O.; RODRIGUEZ, S.; TORRES, D. *Giardia duodenalis*: Effects of an ozonized sunflower oil product (Oleozon®) on in vitro trophozoites. **Experimental Parasitology**, v. 121, p. 208–212, 2009.
- HIJNEN, W.A.N.; BEERENDONK, E.F.; MEDEMA, G.J. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. **Water Research**, v. 40, p. 3-22, 2006.
- HIJNEN, W.A.N.; DULLEMONT, Y.J.; SCHIJVEN, J.F.; HANZENS-BROUWER, A.J.; ROSIELLE, M.; MEDEMA, G. Removal and fate of *Cryptosporidium parvum*, *Clostridium perfringens* and small-sized centric diatoms (*Stephanodiscus hantzschii*) in slow sand filters. **Water Research**, v. 41, p. 2151-2162, 2007.
- HU, T.-L. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts detection in the intake and rapid filter system in a water purification plant. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 1683–1686, 2002.
- HU, Q.; ZHANG, C.; WANG, Z.; CHEN, Y.; MAO, K.; ZHANG, X.; XIONG, Y.; ZHU, M. Photodegradation of methyl tert-butyl ether (MTBE) by UV/H₂O₂ and UV/TiO₂. **Journal of Hazardous Materials**, v. 154, p. 795-803, 2008.
- IRELAND, J.; KLOSTERMANN, P.; RICE, E.; CLARK, R. Inactivation of *E. coli* by titanium dioxide photocatalytic oxidation. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1668–1670, 1993.

J. KOIVUNEN, H.; HEINONEN TANSKI, H. Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments. **Water Research**, v. 39, p. 1519-1526, 2005.

JOACHIM, A. Human Cryptosporidiosis: An Update With Special Emphasis on the Situation in Europe. **Journal of Veterinary Medicine B.**, v. 51, p. 251-259, 2004.

KARANIS, P.; PAPADOPOULOU, C.; KIMURA, A.; ECONOMOU, E.; KOURENTI, C.; SAKKAS, H. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Natural, Drinking, and Recreation Water of Northwestern Greece. **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, v. 30, p. 49-58, 2002.

KARANIS, P.; SOTIRIADOU, I.; KARTASHEV, V.; KOURENTI, C.; TSVETKOVA, N.; STOJANOVA, K. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies of Russia and Bulgaria. **Environmental Research**, v. 102, p. 260-271, 2006.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of Water and Health**, v. 5, p. 1-38, 2007.

KATZ, D.E.; HEISEY-GROVE, D.; BEACH, M.; DICKER, R.C.; MATYAS, B.T. Prolonged outbreak of giardiasis with two modes of transmission. **Epidemiology Infectology**, v. 134, p. 935-941, 2006.

KRUIHOF, J.C.; KAMP, P.C.; MARTIJN, B.J. UV/H₂O₂ treatment: A practical solution for organic contaminant control and primary disinfection. **Ozone Science & Engineering**, v. 29, p. 273-280, 2007.

LABAS, M.D.; ZALAZAR, C.S.; BRANDI, R.J.; CASSANO, A.E. Reaction kinetics of bacteria disinfection employing hydrogen peroxide. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p. 78-87, 2008.

LEGRINI, O., OLIVEROS, E., BRAUN, A.M. Photochemical Process for Water Treatment. **Chem. Rev.**, v. 93, p. 671-698, 1993.

LI, D.; CRAIK, S.A.; SMITH, D.W.; BELOSEVIC, M. Survival of *Giardia lamblia* trophozoites after exposure to UV light. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, p. 56-61, 2008.

LINDEN, K.G.; ROSENFELDT, E.J.; KULLMAN, S.W. UV/H₂O₂ degradation of endocrine-disrupting chemicals in water evaluated via toxicity assays. **Water Science & Technology**, v. 55, n. 12, p. 313-319, 2007.

LINDQUIST, H.D.A.; DUFOUR, A.P.; WYMER, L.J.; SCHAEFER III, F.W. Criteria for evaluation of proposed protozoan detection methods. **Journal of Microbiological Methods**, v. 37, p. 33-43, 1999.

LOBO, M.L.; XIAO, L.; ANTUNES, F.; MATOS, O. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes and subtypes in raw and treated water in Portugal. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 732-737, 2009.

LONIGRO, A.; POLLICE, A.; SPINELLI, R.; BERRILLI, F.; DI CAVE, D.; D'ORAZI, C.; CAVALLO, P.; BRANDONISIO, O. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in Membrane-

Filtered Municipal Wastewater Used for Irrigation. **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, n. 12, p. 7916-7918, 2006.

MAHBUBANI, M. H.; BEJ, A. K.; PERLIN, M. H.; SCHAEFER III, F. W.; JAKUBOWSKI, W.; ATLAS, R. M. Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using Polymerase Chain Reaction and gene probes. **J. Clin. Microb.**, v. 30, n.1, p. 74-78, 1992.

MAMANE, H.; SHEMER, H.; LINDEN, K.G. Inactivation of *E. coli*, *B. subtilis* spores, and MS2, T4, and T7 phage using UV/H₂O₂ advanced oxidation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 146, p. 479-486, 2007.

MATTOS, I.L.de; SHIRAIISHI, K.A.; BRAZ, A.D.; FERNANDES, J.R. Peróxido de Hidrogênio: Importância e Determinação. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 373-380, 2003.

MCCARTHY, S.; NG, J.; GORDON, C.; MILLER, R.; WYBER, A.; RYAN, U.M. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in animals in irrigation catchments in the southwest of Australia. **Experimental Parasitology**, v. 118, p. 596–599, 2008.

McGUIGAN, K.G.; MÉNDEZ-HERMIDA, F.; CASTRO-HERMIDA, J.A.; ARES-MÁZAS, E.; KEHOE, S.C.; BOYLE, M.; SICHEL, M.P.; FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ, P.; MEYER, B.P.; RAMALINGHAM, S.; MEYER, E.A. Batch solar disinfection inactivates oocysts of *Cryptosporidium parvum* and cysts of *Giardia muris* in drinking water. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 453-463, 2006.

MACPHERSON, C.N.L. Human behavior and epidemiology of parasitic zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 35: 1319-1331, 2005.

MONIS, P.T.; THOMPSON, R.C.A. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, p. 233-244, 2003.

MONIS, P.T.; CACCIÒ, 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, 2009.

MORITA, S.; NAMIKOSHI, A.; HIRATA, T.; OGUMA, K.; KATAYAMA, H.; OHGAKI, S. et al. Efficacy of UV irradiation in inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5387-5393, 2002.

MOURA, L.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G.; WADA, M.Y.; JONES, J.L.; TUBOI, S.H.; CARMO, E.H.; RAMANHLHO, W.M.; CAMARGO, N.J.; TREVISAN, R.; GrRAÇA, R.M.T.; SILVA, A.J.; MOURA, I.; DUBEY, J.P.; GARRET, D.O. Waterborne Toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n.2, p. 326-329, 2006.

NEIRA-MUNOZ, E.; OKORO, C.; MCCARTHY, N.D. Outbreak of waterborne cryptosporidiosis associated with low oocyst concentrations. **Epidemiology and Infectology**, v. 135, p. 1159-1164, 2007.

NOGUEIRA, R.F.P.; JARDIM, W.R. A fotocatalise heterogênea e sua aplicação ambiental. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 69-72, 1998.

- NOGUEIRA, R.F.P.; OLIVEIRA, M.C., PATERLINI, W.C. Simple and fast spectrophotometric determination of H₂O₂ in photo-Fenton reactions using metavanadate. **Talanta**, v. 66, p. 86-91, 2005.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU) Ecossistemas e Saúde Humana – Avaliação Ecosistêmica do Milênio, 6pp, 2006.
- QUILEZ, J.; SANCHEZ-ACEDO, C.; AVEDAÑO, C.; DEL CACHO, E.; LOPEZ-BERNAD, F. Efficacy of Two Peroxygen-Based Disinfectants for Inactivation of *Cryptosporidium parvum* Oocysts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2479-2483, 2005.
- QUINTERO-BETANCOURT, W.; GENNACCARO, A.L.; SCOTT, T.M.; ROSE, B. Assessment of methods for detection of infectious *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in reclaimed effluents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5380-5388, 2003.
- REDLINGER, T.; CORELA-BARUD, V.; GRAHAM, J.; GALINDO, A. AVITIA, R. E. CARDENAS, V. Hyper endemic *Cryptosporidium* and *Giardia* in households lacking municipal sewer and water on the United States – México border. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 6, p. 794-798, 2002.
- ROBERTSON, L.J.; HERMANSEN, L.; GJERDE, B.K.; STRAND, E.; ALVSVAG, J.O.; Application of Genotyping during an Extensive Outbreak of Waterborne Giardiasis in Bergen, Norway, during Autumn and Winter 2004. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 72, n. 3, p. 2212–2217, 2006.
- ROCHELLE, P.A.; UPTON, S.J.; MONTELONE, B.A.; WOODS, K. The response of *Cryptosporidium parvum* to UV light. **TRENDS in Parasitology**, v. 21, n. 2, p. 81-87, 2005.
- RODRIGUES, C.P.; ZIOLLI, R.L.; GUIMARÃES, J.R. Inactivation of *Escherichia coli* in water by TiO₂-assisted disinfections using solar light. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 126-134, 2007.
- RYU, H.; GERRITY, D.; CRITTENDEN, J.C.; ABBASZADEGAN, M. Photocatalytic inactivation of *Cryptosporidium parvum* with TiO₂ and low-pressure ultraviolet irradiation. **Water Research**, v. 42, p. 1523 – 1530, 2008.
- SANTOS, L.U.; GUADAGNINI, R.A.; FRANCO, R.M.B.; GUIMARÃES, J.R. Photoperoxidation (H₂O₂/UV) on *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia duodenalis* cysts. **J. Adv. Oxid. Technol.** 2010 (submetido).
- SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “Neglected Diseases Initiative”. **TRENDS in Parasitol.**, v. 22, n. 5, p. 203-208, 2006.
- SEARCY, K.E.; PACKMAN, A.I.; ATWILL, E.R.; HARTER, T. Association of *Cryptosporidium parvum* with Suspended Particles: Impact on Oocyst Sedimentation. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 1072-1078, 2005.
- SHIN, G.A.; LINDEN, K.G.; FAUBERT, G. Inactivation of *Giardia lamblia* cysts by polychromatic UV. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 790-792, 2009.
- SKERRETT, H.E.; HOLLAND, C.V. The occurrence of *Cryptosporidium* in environmental waters in the greater Dublin area. **Water Research**, v. 34, n. 15, p. 3755-3760, 2000.

- 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, p. 329-331, 1989.
- SMITH, A.; REACHER, M.; SMERDON, W.; ADAK, G.K.; NICHOLS, G.; CHALMERS, R.M. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. **Epidemiol. Infect.**, v. 134, p. 1141-1149, 2006a.
- SMITH, H.V.; CACCIÒ, S.M.; TAIT, A.; McLAUCHLIN, J.; ANDREW THOMPSON, R.C. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **TRENDS in Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 160-167, 2006b.
- SMITH, H.V.; CACCIÒ, S.M.; COOK, N.; NICHOLS, R.A.B.; TAIT, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Vet. Parasitol**, v. 149, p. 29-40, 2007.
- SMITH, H.V.; NICHOLS R.A.B. *Cryptosporidium*: Detection in water and food. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 61-79, 2010.
- SUNDERLAND, D.; GRACZYK, T.K.; TAMANG, L.; BREYSSE, P.N. Impact of bathers on levels of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts in recreational beach waters. **Water Research**, v. 41, p. 3483 – 3489, 2007.
- SUNNOTEL, O.; LOWERY, C.J.; MOORE, J.E.; DOOLEY, J.S.G.; XIAO, L.; MILLAR, B.C. et al. Under the microscope: *Cryptosporidium*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 7-16, 2006.
- THOMPSON, R.C.A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 15-35, 2004.
- TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbiol. Infect.**, v. 4, p. 1047-1058, 2002.
- TUFENKJI, N.; DIXON, D.R.; CONSIDINE, R.; DRUMMOND, C.J. Multi-scale *Cryptosporidium*/sand interactions in water treatment. **Water Research**, v. 40, p. 3315-3331, 2006.
- USEPA – United States Environmental Protection Agency. Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual EPA-815-R-99-014. Washington, DC: Office of Water (4607), 1999, 346p.
- USEPA – United States Environmental Protection Agency. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by filtration/IMS/FA. EPA-815-R-05-002. Washington, DC: Office of Water (4607), 2005, 76p.
- VESEY, G.; SLADE, J.S.; BYRNE, M.; SHEPHERD, K.; DENNIS, P.J.; FRICKER, C.R. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 75, p. 82-86, 1993.
- XIAO, L.; SINGH, A.; LIMOR, L.; GRACZYK, T.K.; GRADUS, S.; LAL, A.A. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1097-1101, 2001.

- YAO, K.S.; WANG, D.Y.; HO, W.Y.; YAN, J.J.; TZENG, K.C. Photocatalytic bactericidal effect of TiO₂ thin film on plant pathogens. **Surface & Coatings Technology**, v. 201, p. 6886-6888, 2007.
- YUAN, F.; HU, C.; HU, X.; QU, J.; YANG, M. Degradation of selected pharmaceuticals in aqueous solution with UV and UV/H₂O₂. **Water Research**, v. 43, p. 1766-1774, 2009.
- WEIR, S.C.; POKORNY, N.J.; CARRENO, R.A.; TREVORS, J.T.; LEE, H. Efficacy of Common Laboratory Disinfectants on the Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Cell Culture. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 68, n. 5, p. 2576-2579, 2002.
- WIELINGA, P.R.; VRIES A.; VAN DER GOOT, T.H.; MANK, T.; MARS, M.H.; KORTBEEK, L.M.; VAN DER GIESSEN, J.W.B. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 809–817, 2008.
- ZALAZAR, C.S.; LABAS, M.D.; LOVATO, M.E.; BRANDI, R.J.; CASSANO, A.E. Modelling the kinetics of UV/H₂O₂ oxidation of dichloroacetic acid. **Water Science & Technology**, v. 55, n. 12, p. 31-35, 2007.
- ZIA, K.M.; BHATTI, I.A.; BHATTI, H.N.; SHEIKH, M.A. Kinetics of microbial inactivation by UV-disinfection in water treatment. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 30, p. 463-467, 2008.
- ZINI, R.M.; SANTOS, C.C.M.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; PERESI, J.T.M.; MARQUES, C.C.A. Atuação do laboratório de Saúde Pública na elucidação do surto de diarreia causado por *Cyclospora cayetanensis* no município de General Salgado – SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** v. 63, p. 116-121, 2004.